

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

TEMA:

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE REACCIONES ADVERSAS
DE DERIVADOS MORFOLÍNICOS DEL FENOL EN RATAS
WISTAR, MEDIANTE UN ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

TESIS

QUE PARA OBTENER ÉL TITULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MARÍA DE LOURDES GARCÍA MATURANO

ASESORES:

M. en F. C. MA. EUGENIA R. POSADA GALARZA
M. V. Z. JORGE TORRES MARTÍNEZ

Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Evaluación Experimental de Reacciones Adversas de
Derivados Morfolínicos del Fenol en Ratas Wistar,
mediante un estudio Histopatológico.

que presenta la pasante: María de Lourdes García Maturano
con número de cuenta: 9555 736-8 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Méx. a 7 de junio de 2006

PRESIDENTE

QFI. Leticia Zúñiga Ramírez

VOCAL

MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza

SECRETARIO

QFB. Martha Patricia Campos Peón

PRIMER SUPLENTE

MFC. Cecilia Hernández Barba

SEGUNDO SUPLENTE

MFC. Beatriz de Jesús Maya Monroy

[Handwritten signatures and initials of the board members]

INDICE

INDICE DE TABLAS
INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN		1
OBJETIVOS		3
CAPÍTULO	1.GENERALIDADES.	4
	1.1 Desarrollo de nuevos fármacos.	4
	1.2. Obtención de nuevos fármacos.	5
	1.2.1. Extracción de fuentes naturales.	5
	1.2.2. Serendipitía.	5
	1.2.3. Prueba y Error.	6
	1.2.4. Modificación Estructural.	6
	1.2.5. Diseño molecular y asistido por inteligencia artificial.	7
	1.3. Experimentación clínica.	8
	1.3.2. Fase 0 o preclínica.	9
	1.3.3. Fase I	9
	1.3.4. Fase II	9
	1.3.5. Fase III	10
	1.3.6. Fase IV	10
CAPÍTULO	2. COMPUESTOS DE NUEVA SÍNTESIS DERIVADOS MORFOLÍNICOS DEL FENOL.	11
CAPÍTULO	3. REACCIONES ADVERSAS DE MEDICAMENTOS.	14
	3.1 Clasificación de las reacciones adversas.	15
	3.1.1. Tipo A o previsibles.	15
	3.1.2. Tipo B o imprevisibles.	16
	3.2. Reacciones tipo A.	16
	3.2.1. Efecto farmacológico del medicamento.	16
	3.2.2. Relacionadas con la dosis.	17
	3.2.3. Dependientes de un efecto tóxico.	18
	3.3. Reacciones tipo B	19
	3.3.1. Dependientes del metabolismo de cada individuo.	19
	3.3.2. Debidas a mecanismos inmunológicos.	19
	3.4. Reacciones adversas como fenómenos diferidos.	21
CAPÍTULO	4. FACTORES PREDISPONENTES PARA LAS RAM.	22
	4.1. Edad.	22
	4.2. Sexo.	23
	4.3. Peso y composición corporal.	24

	4.4. Características genéticas.	24
	4.5. Cumplimientos de régimen de dosificación.	25
	4.6. Patologías concomitantes.	25
	4.7. Polifarmacia.	26
	4.8. Habituaación.	26
CAPÍTULO	5. PROBABILIDAD DE UN EVENTO ADVERSO.	28
CAPÍTULO	6. ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICOS.	30
	6.1. Histología.	30
	6.1.1. Intestino Delgado.	31
	6.1.2. Estómago.	34
	6.1.3. Hígado.	37
	6.1.4. Riñón.	39
CAPÍTULO	7. DESARROLLO EXPERIMENTAL	41
	7.1. Material	41
	7.2. Metodología	43
	7.2.1. Fase de Inducción.	43
	7.2.1.1. Desarrollo de actividades y duración de los estudios.	43
	7.2.2. Evaluación de reacciones adversas.	46
	7.2.2.1. Muestra de tejido.	47
	7.2.2.2. Fijación.	48
	7.2.2.3. Procesamiento de las muestras.	48
	7.2.2.4. Deshidratación.	49
	7.2.2.5. Aclaramiento.	49
	7.2.2.6. Inclusión.	49
	7.2.2.7. Corte.	50
	7.2.2.8. Tinción.	50
	7.2.2.9. Montaje.	51
	7.2.2.10. Observación al microscopio.	51
	7.2.2.11. Parámetros evaluados.	52
CAPÍTULO	8. RESULTADOS Y OBSERVACIONES.	53
CAPÍTULO	9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
CAPÍTULO	10. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	62
CAPÍTULO	11. CONCLUSIONES.	69
	ANEXO 1.	
	BIBLIOGRAFÍA.	

INDICE DE TABLAS

TABLA	A. Dosis terapéutica de los compuestos derivados morfolínicos del fenol.	44
TABLA	B. Dosis máximas recomendadas de los compuestos derivados morfolínicos del fenol.	44
TABLA	C. Número de ratas sacrificadas	45
TABLA	1. Parámetros evaluados.	53
TABLA	2. Peso promedio para LQM 305	54
TABLA	3. Peso promedio para LQM 309	55
TABLA	4. Daños histopatológicos encontrados en Estómago.	56
TABLA	5. Daños histopatológicos encontrados en Intestino delgado	57
TABLA	6. Daños histopatológicos encontrados en Hígado	58
TABLA	7. Daños histopatológicos encontrados en Riñón	58

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	A. Estructura química LQM 305	11
FIGURA	B. Estructura química LQM 309	11
FIGURA	1. Corte histológico de estómago de una rata control.	65
FIGURA	2. Corte histológico de estómago de una rata tratada.	65
FIGURA	3. Corte histológico de intestino delgado de una rata control.	66
FIGURA	4. Corte histológico de intestino delgado de una rata tratada.	66
FIGURA	5. Corte histológico de riñón de una rata control.	67
FIGURA	6. Corte histológico de riñón de una rata tratada.	67
FIGURA	7. Corte histológico de hígado de una rata control.	68
FIGURA	8. Corte histológico de hígado de una rata tratada.	68

INTRODUCCIÓN

Los fármacos pueden ser obtenidos de fuentes naturales, pero además muchos son producidos por síntesis; aunque también deben distinguirse los fármacos semisintéticos, obtenidos por síntesis parcial, es decir por modificación química de los fármacos naturales; para lo cual las nuevas moléculas pueden ser creadas mediante el diseño molecular asistido por computadora, esta estrategia para obtener nuevos fármacos, busca un diseño específico de las propiedades moleculares, del incremento de la potencia de un fármaco o el aumento de la vida media, así como de las relaciones estructura química – actividad biológica, entre otras.

La estructura química de un compuesto es de suma importancia ya que su estudio puede prever la acción farmacológica y este hecho ha sido el punto de partida de la obtención por vía sintética de fármacos nuevos; por esto en el laboratorio de Química Medicinal (Unidad Postgrado) de la FES-Cuautitlán, UNAM; se está llevando a cabo el diseño asistido por computadora para la síntesis de los derivados **morfólicos del fenol** que son compuestos con actividad antihipertensiva, ya que en la actualidad la hipertensión se ha vuelto un problema de suma importancia para el sector salud, debido a que comprende una variedad de desordenes cardíacos que conllevan a la muerte.

Para que un fármaco nuevo cumpla con los criterios de aceptación debe pasar por una serie de pruebas antes de su comercialización, una de esas pruebas son las preclínicas dentro de las cuales es imprescindible conocer los riesgos que conlleva la utilización; es decir la producción de efectos no deseados, conocidos como reacciones adversas; para lo cual se realizan estudios detallados de los efectos de distintas dosis y de la administración de dicho fármaco. Este estudio se efectúa en animales de laboratorio con diferentes niveles de dosificación y períodos; observando comportamientos, síntomas y efectos adversos. Al término del período, los animales son sacrificados y algunos de sus órganos (intestino delgado,

estómago, hígado, riñón) son extraídos y estudiados macroscópicamente y microscópicamente por medio de un análisis histopatológico, lo cual se realizó en el presente trabajo para poder evaluar los daño histológicos en el caso de presentarse con los compuestos de nueva síntesis de la FES-C.

OBJETIVOS

Observar los posibles daños histopatológicos por medio de la revisión empleando microscopia óptica, en tejidos de estómago, intestino delgado, hígado y riñón para evaluar a compuestos de nueva síntesis de la FES-C.

Administrar diferentes dosis de los compuestos LQM 305 y 309 por vía oral para ver si se presenta alguna reacción adversa.

CAPITULO 1. GENERALIDADES

1.1. DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS

La investigación química basándose en el aislamiento, identificación y síntesis de fármacos ha producido muchas sustancias farmacéuticas buscando que sean efectivas y específicas.

Es importante el desarrollo de nuevos conocimientos que sirven de base para un nuevo fármaco; implicando progreso en las metodologías e instrumentación científica, mayor comprensión de un estado patológico o importantes adelantos científicos básicos.

La farmacología es la ciencia biológica que estudia las acciones y propiedades de los fármacos; es decir estudia su interacción con el organismo vivo, por medio de procesos químicos, en especial cuando se unen con moléculas reguladoras y activan o inhiben procesos corporales normales. ⁽²¹⁾

Un fármaco según la OMS es toda sustancia que puede utilizarse para la curación, mitigación, tratamiento o prevención de las enfermedades del hombre u otros animales. Los fármacos pueden sintetizarse en el cuerpo; por ejemplo, las hormonas o ser sustancias química no sintetizadas en el organismo. Para poder interactuar de modo químico con su receptor, la molécula de un fármaco debe tener tamaño, carga eléctrica, forma y composición atómica apropiada. El diseño de fármacos implica la capacidad de predecir la estructura molecular apropiada de un fármaco con base en la información sobre su receptor biológico. ⁽²¹⁾

Dentro del diseño de fármacos, la farmacología juega un interesante papel, ya que esta ciencia se encarga de la acción de los fármacos sobre el organismo. Las nuevas moléculas creadas bajo el concepto antes mencionado, deberán someterse a estudios farmacológicos, que incluyen pruebas in vivo, in vitro y pruebas preclínicas sobre individuos de

diferentes especies, y que la farmacología tomará en cuenta para estimar que tan importante fue la modificación de las nuevas moléculas y podrá entonces aportar ideas para una nueva modificación que lleve a la obtención de un fármaco de características superiores a sus antecesores (fármaco base).

(21)

1.2. OBTENCIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS

Dichos fármacos deben de poseer una acción biológica muy específica, además de efectos tóxicos nulos. Para lograr este objetivo, se han seguido diversas estrategias entre las que podemos mencionar las siguientes:

1.2.1. EXTRACCIÓN DE FUENTES NATURALES

La cual tiene una gran cantidad de compuestos en el tratamiento de diversos padecimientos debido a que la humanidad ha utilizado los extractos de los vegetales y los extractos minerales. (21)

1.2.2. SERENDIPITÍA

Algunos principios activos y nuevos usos de los ya existentes, se descubrieron como accidente o casualidad. Estas observaciones originaron la introducción de nuevas identidades químicas en la terapéutica.

1.2.3. PRUEBA Y ERROR

Esta metodología sirve para determinar si una sustancia presenta actividad biológica; las sustancias viables se someten a una variedad de pruebas biológicas en espera de que alguna de ellas muestre poseer una actividad útil. (21)

1.2.4. MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL

Este método es actualmente el más utilizado para la producción de nuevos fármacos. La modificación química es un proceso muy común en la química orgánica y básicamente consiste en tomar una sustancia química de actividad biológica conocida, como estructura prototipo, sintetizar y probar congéneres estructuralmente análogos. (21)

Mediante la aplicación de HOMÓLOGOS que son una serie de análogos que difieren en estructura por el simple incremento en la fórmula molecular; la FRAGMENTACIÓN MOLECULAR, útil para determinar que porción de la molécula se necesita para una actividad biológica dada; AGREGACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES a una molécula con actividad biológica conocida, los REEMPLAZOS ISÓSTERICOS para el diseño de antimetabolitos utilizando a los isostéros que son moléculas o grupos de átomos que tienen el mismo número y tipo de electrones, lo que les confiere propiedades físicas similares y los bioisostéros como compuestos que tienen un tipo similar de actividad biológica. (2)

La IONIZACIÓN también es utilizada, ya que muchas de las sustancias usadas como fármacos son ácidos o bases débiles; dato importante para saber si se fija al receptor la forma cargada o no del fármaco; la ESTEREOQUÍMICA considera la interacción fármaco-receptor, tomando en cuenta la ubicación correcta de los grupos funcionales para que interactúen óptimamente con la enzima o receptor. Es de suma

importancia en el diseño de fármacos que la molécula sea conformacionalmente flexible y convertirla en rígida para descubrir la conformación recomendable para la fijación a un receptor del fármaco y así introducir selectividad a los receptores, eliminar efectos colaterales indeseables; y por último la disposición de los fármacos que toma en cuenta a: la absorción, distribución, metabolismo(biotransformación) y excreción. (2)

1.2.5. DISEÑO MOLECULAR ASISTIDO POR COMPUTADORA

Las herramientas empleadas incluyen a la mecánica cuántica, mecánica molecular, dinámica molecular y otras simulaciones empíricas de energía, así como también gráficas computacionales, manejo de bases de datos, relaciones estructura química – actividad biológica.

Las moléculas que pueden ser desarrolladas abarcan a los fármacos, proteínas, polímeros, catalizadores, materiales cromatográficos, pesticidas, etc. Existen 3 áreas del proceso del diseño molecular en química computacional: 1. La predicción teórica de las propiedades moleculares; 2. La predicción correcta de las propiedades deseadas de un problema específico, tales como el incremento de la potencia de un fármaco o el aumento de la vida media, el hallazgo de correlaciones entre las propiedades fisicoquímicas o teóricas con la actividad biológica, así como la explicación racional del porque de la actividad o inactividad de un compuesto dado. 3. Representa la cristalización del diseño asistido por computadora, aplicación de los valores obtenidos de la etapa anterior permitiendo al investigador establecer los lineamientos de trabajo de forma dirigida en el diseño específico que beneficiará al proceso de investigación optimizando recursos materiales y humanos. (21)

1.3. EXPERIMENTACIÓN CLÍNICA

De modo independiente al origen de la molécula candidato, las pruebas que se realizan con ella incluyen una secuencia de experimentación y caracterización llamada selección del fármaco. Se usa una diversidad de ensayos biológicos a niveles molecular, celular, de órganos y en animales para definir la actividad del fármaco, así como su selectividad. Cuando se investigan fármacos nuevos para uso médico, existe un modo sistemático para llegar a la comprobación de su eficacia e inocuidad, que comprenden las fases de investigación que siguen y que corresponden al estudio preclínico de los fármacos, la farmacología experimental que es el paso previo indispensable a la aplicación humana del fármaco, pues provee la base para su empleo terapéutico racional y estudia la farmacocinética y la toxicidad en los animales. (18,9)

El criterio para aceptar un nuevo fármaco ha ido evolucionando, antes se requería que fuera seguro principalmente en animales, después se exigió que demostrará su eficacia y seguridad en el hombre antes de su comercialización. En la actualidad se pide al nuevo fármaco, además de ser eficaz y seguro, aporte algo a los tratamientos ya existentes: mayor eficacia, menor riesgo, mejor cumplimiento terapéutico, menor probabilidad de errores, mayor facilidad de dosificación o mayor comodidad de administración.

Entonces el desarrollo de un nuevo fármaco se inicia en la fase 0 de evaluación preclínica, continúa en las fases I, II y III de evaluación clínica precomercialización y finaliza en la fase IV de evaluación clínica poscomercialización. (19)

1.3.1. FASE 0 Ó PRECLÍNICA

El objetivo de esta fase es estudiar las acciones farmacológicas del nuevo fármaco, con el fin de definir su índice terapéutico; incluye también estudios de toxicidad aguda, subaguda y crónica, carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis.

Se estudian sus características farmacocinéticas para estimar las posibles dosis e intervalos de administración que se utilizarán en el ser humano. (19)

1.3.2. FASE I

Su objetivo es verificar la seguridad del nuevo fármaco en el ser humano y establecer un rango de dosis seguras. Se estudian aspectos farmacocinéticos como biodisponibilidad, cinética de eliminación, y tiempo que tarda en alcanzarse el nivel estable necesarios para establecer una pauta de administración en posteriores ensayos clínicos.

Se realiza en voluntarios adultos sanos que no tomen alcohol, drogas, ni medicamentos y que tras la adecuada información, den su consentimiento por escrito. Se excluyen niños, embarazadas y ancianos. Se realizan en un pequeño número de voluntarios, dentro de unidades de ensayos clínicos que garantizan control médico continuo, monitorización semiintensiva y tratamiento de posibles urgencias médicas. (19)

1.3.3. FASE II

Su objetivo es demostrar la eficacia del nuevo fármaco, delimitar un rango de dosis terapéuticas y la variabilidad individual dentro de ese rango, verificar la seguridad de dichas dosis y valorar la relación eficacia – toxicidad. Así mismo, determinar la escala de dosis que son capaces de producir fenómenos indeseables, observando siempre con todo cuidado dichas reacciones adversas cuando se producen.

Se realizan en un número pequeño de pacientes, con estricta supervisión médica y del cumplimiento terapéutico y suelen ser de corta duración. (19)

1.3.4. FASE III

Su objetivo es verificar la eficacia y seguridad del nuevo fármaco a corto y largo plazo en un número mayor de pacientes y en condiciones clínico terapéuticas más próximas a las de la población en que se utilizara en el futuro.

Se compara el nuevo fármaco con otros tratamientos en uso y se analizan otros datos, como número de tomas al día, preferencia del paciente y necesidad de controles clínicos o analíticos. Una vez verificadas la eficacia y seguridad de la medicación en adultos; se deben realizar estudios en niños, ancianos y pacientes con otras patologías diferentes a la estudiada; incluso embarazadas (siempre que los datos previos no indiquen riesgos para el feto) (19)

1.3.5. FASE IV

Su objetivo es vigilar la aparición de reacciones adversas que no se hayan detectado en las fases de precomercialización debido a su baja frecuencia o a que requieran un tiempo de exposición prolongada, así como los efectos teratógenos y las interacciones.

Es importante valorar la relación beneficio-riesgo del nuevo medicamento en la práctica clínica y conocer la influencia de diversos factores fisiológicos, patológicos y iatrogénicos no estudiados en las fases de precomercialización, para perfilar el valor terapéutico del nuevo fármaco, las pautas de dosificación y las precauciones que deben adoptarse en situaciones especiales. (19)

CAPITULO 2. COMPUESTOS DE NUEVA SÍNTESIS

DERIVADOS MORFOLINICOS DEL FENOL

LQM 305

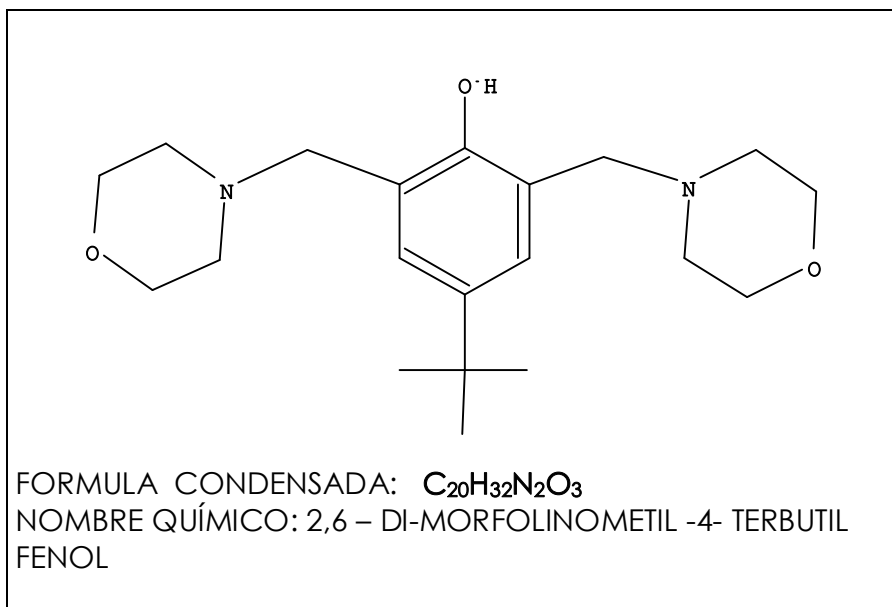


Figura A. Estructura química diseñada en el laboratorio de Química Medicinal (Unidad Postgrado), FES-Cuautitlán.

LQM 309

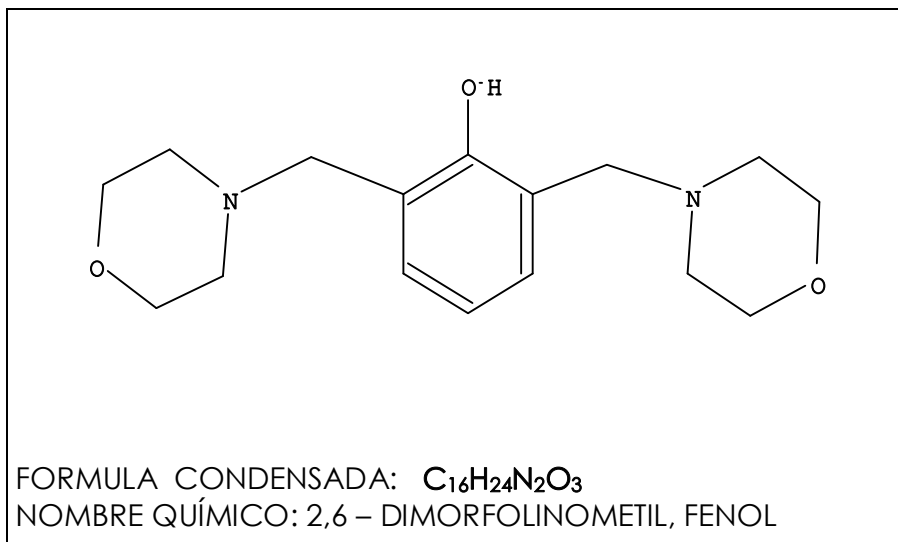


Figura B. Estructura química diseñada en el laboratorio de Química Medicinal (Unidad Postgrado), FES-Cuautitlán.

*

El origen de este tipo de compuestos comienza con el empleo del término arritmia que abarca una variedad de desordenes cardíacos incluyendo irregularidades en el ritmo, incremento o decremento de la frecuencia de los latidos y anormalidades en la propagación de los latidos. Los fármacos disponibles para tratar arritmias cubren un amplio espectro tanto en mecanismos de acción como en estructura. Desgraciadamente todos los fármacos antiarrítmicos también presentan efectos no deseados, los más notables son: la cardiotoxicidad, las complicaciones gastrointestinales y los efectos adversos en el SNC.

Por la naturaleza compleja de las arritmias y en parte los efectos perjudiciales de los ya conocidos agentes antiarrítmicos, se trabaja en la búsqueda de nuevas estructuras químicas. Las modificaciones que presentan las moléculas pueden dar como resultado un antiarrítmico potente buscando la disminución de los efectos adversos y en gran medida actividad antihipertensiva eficaz para la afección del enfermo hipertenso.

Basándose en conocimientos previos que se tienen de este tipo de compuestos, la síntesis de los derivados morfólinicos del fenol, mediante el diseño por computadora consiste en realizar cálculos teóricos empleando métodos semiempíricos *ab initio** y funcionales de la densidad de los compuestos sintetizados, los cuales se caracterizan empleando métodos espectroscópicos y espectrométricos como Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de Masas y Espectroscopia de Infrarrojo. Esto ha permitido obtener nuevas moléculas como los compuestos LQM 305 y 309, a las cuales se les pretende probar su posible actividad biológica (antihipertensiva), así como las posibles reacciones adversas que pueden presentarse en animales de experimentación.

* *ab initio* (al inicio del origen)

Los compuestos químicos LQM 305 y LQM 309 son polvos blancos, hidrosolubles de derivados morfolínicos con acción farmacológica antihipertensiva.

Tienen como grupos funcionales a la morfolina y al fenol.

La morfolina que antes se consideraba como una base relacionada con la morfina, por su agrupación atómica; hoy se admite, que es un compuesto derivado de la piperidina por sustitución de un grupo CH₂ por un átomo de oxígeno.

El fenol es otro grupo funcional que resulta de la sustitución de uno o varios átomos de hidrogeno del benceno por grupos hidróxilo (-OH).

El fenol y derivados se utilizan como antisépticos, desinfectantes, cáusticos, germicidas, anestésicos superficiales, antioxidantes y conservadores.

El fenol desnaturaliza y precipita las proteínas celulares, por lo cual intoxica todas las células. En pequeñas cantidades tiene un efecto estimulante en el centro respiratorio. ⁽³³⁾

CAPITULO 3. REACCIONES ADVERSAS A MEDICAMENTOS

En la búsqueda de nuevos fármacos es imprescindible conocer con la mayor exactitud los riesgos que conlleva su utilización, ya que todos los fármacos tienen la posibilidad de producir efectos no deseados conocidos como reacciones adversas.

Las reacciones adversas a medicamentos (RAM) han constituido una preocupación desde los orígenes de la terapéutica.

El efecto terapéutico de los fármacos está unido al riesgo de producción de efectos indeseables.

Las reacciones adversas a medicamentos es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como cualquier respuesta a un fármaco que sea nocivo e indeseable y que se observa con la dosis utilizada en el hombre para la profilaxis, diagnóstico o tratamiento de las enfermedades.⁽²⁾

Los medicamentos son sometidos antes de su comercialización, a una serie de estudios en animales y en el hombre que definen sus características farmacológicas; existen una serie de efectos del fármaco inesperados infrecuentes y desconocidos, etc., que no pueden determinarse totalmente hasta que se utilicen de una forma general, en la práctica médica. ⁽⁸⁾

La toxicidad de los fármacos es difícil de valorar por la cantidad de factores que intervienen, modo de aparición, duración y gravedad de reacciones adversas. Estas pueden ser:

- Aparecer inmediatamente después de iniciar el tratamiento, a lo largo, o al suspenderlo.

- Ser muy frecuente o poco frecuente.
- Ser evitada ajustando la dosis o no.
- Presentarse con dosis terapéuticas o solo con dosis mayores a estas, por sobredosificación.
- Ser leve, grave y a veces mortales.

La importancia de las reacciones adversas dependerá tanto de su frecuencia como de su gravedad. (8)

3.1. CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES ADVERSAS

La clasificación de las reacciones adversas se realiza tomando en consideración varios parámetros.

El autor británico, el doctor Rawlins, diferencia dos tipos de reacciones adversas:

3.1.1. Tipo A o previsibles:

- En relación con el mecanismo de acción del medicamento, es decir, de etiopatogenia conocida, ya que es de esperar su presencia en cada individuo tratado, al administrar una dosis suficiente para que se manifiesten los efectos farmacológicos del medicamento.
- Generalmente predecibles.
- De frecuencia relativamente alta.
- Suelen ser leves.
- Habitualmente dependientes de la dosis.

3.1.2. Tipo B o imprevisibles:

- De mecanismo desconocido.
- No se pueden predecir.
- De baja incidencia.
- En su mayoría muy graves.
- Generalmente no dependientes de la dosis.

(27)

3.2. REACCIONES DE TIPO A

3.2.1. Efecto farmacológico del medicamento

La propia actividad farmacológica de la molécula es responsable de la reacción adversa y el efecto que se presenta puede ser:

- a) El mismo por el que se empleo el medicamento (Ej. Diarrea provocada por un laxante) y entonces la causa es una sobredosificación relativa.

- b) Otro distinto al buscado por el medicamento como es un efecto colateral producido con dosis adecuadas del fármaco y no deseadas en un momento dado, como la somnolencia producida por algunos fármacos por Ej. Antihistamínicos no selectivos, que atraviesan en gran proporción la barrera hematoencefálica o un efecto secundario, aunque no deseados son consecuencia de la acción farmacológica del medicamento por Ej. La aparición de taquicardia y cefalea tras la administración de adrenalina en una crisis de asma.

(27)

3.2.2. Relacionadas con la dosis

Generalmente son predecibles y evitables. Pueden afectar el órgano diana u otros órganos.

Pudiendo ser las causas:

a) MODIFICACIONES FARMACOCINÉTICAS: Implica diversos factores que pueden modificar la concentración de un fármaco en los sitios de acción, explicándose así las diversas respuestas que se pueden presentar en diferentes individuos frente a una misma dosis. Estos factores pueden ser fisiológicos (modificaciones genéticas en los mecanismos de metabolización) o factores patológicos que pueden alterar a los procesos farmacocinéticos, provocando incrementos excesivos de las concentraciones plasmáticas del fármaco. Por ellos se debe tener especial atención a cierto tipo de pacientes:

- ENFERMEDAD HEPÁTICA. En la mayoría de los casos disminuye su capacidad de metabolización y excreción de los fármacos por el daño parenquimatoso.
- ENFERMEDAD RENAL. Existen fallas en los mecanismos de filtración, secreción, o bien ambos, además que puede existir alteración en la capacidad de unión a proteínas.
- ENFERMEDAD CARDIACA. La insuficiencia cardiaca congestiva puede modificar la absorción gastrointestinal, a causa del edema de la mucosa o del menor flujo esplácnico, la circulación hepática o la perfusión renal, y el volumen de distribución. ⁽²⁷⁾

b) MODIFICACIONES FARMACODINÁMICAS: A veces provocadas por estados fisiológicos o patológicos, los cuales pueden incrementar la respuesta a un fármaco, tanto al nivel de la unidad celular como en órganos y sistemas; que pueden deberse a modificaciones en el número de receptores, pero en otras intervienen mecanismos muy variados y no siempre conocidos. Un ejemplo son los ancianos, ellos muestran una mayor sensibilidad a la acción sobre el Sistema Nervioso de los depresores centrales o de los anticolinérgicos. ⁽²⁷⁾

3.2.3. Dependientes de un efecto tóxico

Esta acción puede causarla el medicamento o sus metabolitos, y depende de dos factores:

a) SOBREDOSIFICACIÓN

Es la presencia excesiva del fármaco en la biofase (lugar o lugares de acción) que a su vez puede ser:

1. ABSOLUTA: Por un exceso de dosis.

Administración excesiva → ocurre por ejemplo en un fármaco que se administra por vía IM y que se absorbe bien, pero si se inyecta por vía IV llega a los lugares de acción en elevadas cantidades; o como sucede en la hipoglucemia insulínica donde si se pasa por alto una comida, después se da una sobredosis de glucosa.

2. RELATIVA: Dosis correcta que se administra a sujetos hipersensibles o por algún proceso patológico.

Sujetos hipersensibles → ej: sordera provocada por estreptomycin.

Patologías → ej: antibiótico que se excreta por la vía renal y hay una insuficiencia renal que evita que el fármaco se excrete, permanecerá en la corriente sanguínea por más tiempo. ⁽²⁷⁾

b) DETERIORO DE ALGUNA FUNCIÓN ORGÁNICA: como sucede en la filtración glomerular, proceso que se reduce a partir de los 65 años en un 30%.

3.3 REACCIONES DE TIPO B

Se clasifican según su causa en:

3.3.1 Dependientes del metabolismo de cada individuo.

Debidas a una alteración del metabolismo del fármaco en el organismo, aumento de toxicidad por falla en la degradación y/o excreción del fármaco, por condicionamiento genético, esto se puede originar por alguna interferencia en la actividad enzimática o deficiencias enzimáticas. Trastorno enzimático que dan lugar a una hipersensibilidad.

Aquí se encuentran porfirias, hemofilias, déficit de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. (1,8)

3.3.2. Debidas a mecanismos inmunológicos.

Consiste en una reacción inmunológica en la que el fármaco o sus metabolitos adquieren un carácter antigénico pero como muchos fármacos presentan un bajo peso molecular, no tienen capacidad de presentarla. El complejo fármaco + proteína plasmática adquiere un carácter antigénico.

Debe haber un primer contacto entre el organismo y el antígeno en el que el organismo produce anticuerpos. La estructura del fármaco (como fenoles o núcleos aromáticos) facilita la reacción antigénica.

Hay un contacto sensibilizante en el que el organismo produce los anticuerpos. En el segundo contacto, que es el contacto

desencadenante, el antígeno reacciona con el anticuerpo. Lleva a la liberación por parte de los mastocitos de los factores mediadores. Ej: histamina en el mastocito. La histamina es vasodilatador, puede producir un shock anafiláctico, urticaria, síndrome asmático.

El fármaco, por su bajo peso molecular, no tiene capacidad de actuar como un antígeno.

Dentro de estas tenemos varios tipos:

La hipersensibilidad de tipo I y II son las más importantes.

TIPO I Ó ANAFILÁCTICA: La hipersensibilidad tipo I puede dar un shock anafiláctico y la muerte inmediata.

El fármaco actúa como alérgeno y hace que el individuo reaccione de manera peculiar, desencadenando procesos de anafilaxia; son frecuentes y características de personas atópicas, se mide por la inmunoglobulina E, que aumenta en individuos tras la exposición al alérgeno. (8)

TIPO II Ó CITOTÓXICA: La hipersensibilidad tipo II puede dar hemólisis. El antígeno se une a la superficie de ciertas células (sanguíneas, endotelios) y al anticuerpo (IgM, IgG); al reaccionar con el antígeno provoca la destrucción de estos. Dentro de estas reacciones adversas se encuentra la anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica, leucopenia, vasculitis, glomerulonefritis. (8)

TIPO III: En estas reacciones se forma un complejo antígeno-anticuerpo que puede dar lugar a reacciones adversas que afectan principalmente a riñón y piel. Un ejemplo de ésta es la conocida por "enfermedad del suero" caracterizada por fiebre, erupción cutánea, linfadenopatías, nefritis, edemas y neuritis. (8)

TIPO IV: Son los linfocitos, que se sensibilizan, los que pueden dar lugar a esta reacción.

TIPO V: Se forman granulomas cutáneos.

TIPO VI: Llamada de "hipersensibilidad estimuladora". El anticuerpo reacciona con un componente de la superficie corporal. (8)

3.4. Otras reacciones adversas como fenómenos diferidos son:

- Carcinogénesis.
- Teratogénesis.

CARCINOGENESIS

El fármaco se une al DNA del genoma y provoca mutaciones. Puede ser primario (se une el fármaco) o secundario (se une un metabolito)
También puede causar inmunotoxicidad.

TERATOGENESIS

La capacidad de un fármaco de alterar el desarrollo del embrión o feto con la producción de malformaciones estructurales y funcionales durante la gestación.

Teniendo acción sobre la formación del blastocito, organogénesis, histogénesis y maduración de la función.

CAPITULO 4. FACTORES PREDISPONENTES PARA LAS RAM

Existen pocos estudios realizados con una metodología adecuada sobre los factores que predisponen a RAM, algunos ensayos epidemiológicos o de sujetos hospitalizados han identificado algunos de estos factores.

Si un paciente desarrolla una reacción adversa a un fármaco depende de la dosis y la duración de la toxicidad inherente al fármaco y de numerosos factores: edad, sexo, peso y composición corporal, características genéticas, cumplimiento de régimen de dosificación, patologías concomitantes, polifarmacia y habituación.

La dosis de un fármaco administrado determina en gran medida si un paciente experimenta efectos tóxicos. Otro factor importante del efecto producido es como el paciente en particular absorbe, metaboliza y excreta un fármaco. Los fármacos con un índice terapéutico reducido o con efectos farmacológicos múltiples son más propensos a producir reacciones adversas. Los estudios realizados han logrado identificar algunos de estos factores:

4.1 EDAD

La edad es un factor importante de la respuesta a fármacos y por lo tanto puede influir en la incidencia a RAM. Casi todos los estudios revelan que sujetos de edad avanzada (mayores de 60 años) son más susceptibles a efectos adversos; sin embargo debido a que padecen más enfermedades concomitantes y se les administra simultáneamente más fármacos que a los pacientes jóvenes entonces estos factores se relacionan con una mayor incidencia a presentar RAM.

El recién nacido, en particular el prematuro también es más sensible a algunas RAM, tal vez como consecuencia del desarrollo incompleto de enzimas que participan en la biotransformación de fármacos. (2,8, 27)

Investigaciones recientes sugieren que la edad no es un factor independiente de las RAM.

Factor condicionante de RAM especialmente:

Niños < edad mayor probabilidad

Ancianos > edad (mas de 60 años) mayor probabilidad

4.2 SEXO

Se han descrito en animales diversas diferencias según el sexo, la distribución de respuestas y el metabolismo de fármacos, pero no son de gran importancia en el hombre (excepto las que se relacionan con el embarazo y la lactancia) (27)

Estudios estadísticos han demostrado que, las mujeres tienen mayor probabilidad que los varones de desarrollar RAM en especial síntomas gastrointestinales inducidos por fármacos. Al parecer ellas también son más susceptibles a los efectos tóxicos de la digoxina. En el grupo de mayores de 60 años, las mujeres tienen mayor probabilidad que los varones de sufrir hemorragia inducida por heparina. (6)

La diferencia de sexos influye en la gravedad de algunas enfermedades, como en el caso de hipertensión arterial, en donde el aumento tensional se acompaña de una lesión mayor en el órgano de "choque" o terminal en los varones, en comparación con las mujeres y por esta razón, en ellos hay una tendencia de utilizar fármacos más potentes. (27)

4.3 PESO Y COMPOSICIÓN CORPORAL

El peso, la composición corporal (grasa) y el grado de adecuación corporal influye en la aparición de reacciones adversas. Ej. El pentobarbital, un fármaco polar, se acumula rápidamente en el tejido adiposo, posteriormente se libera poco a poco de este tejido para actuar en el Sistema Nervioso Central. Por lo expuesto, las pautas y las alteraciones de un efecto farmacológico pueden variar con la cantidad de grasa corporal. ⁽²⁷⁾

4.4. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

Dentro de esta clasificación tenemos las reacciones idiosincrásicas. La idiosincrasia es una reacción propia del organismo característica de un individuo o grupo de individuos. Produce reactividad anormal a una sustancia química que ciertos individuos presentan y que son determinadas por mecanismos genéticos.

La variabilidad biológica y los factores hereditarios predisponen a los individuos a incrementos en la toxicidad de fármacos, algunos pacientes varían en su capacidad para metabolizar los fármacos y esto puede dar concentraciones séricas aumentadas con la consecuente toxicidad.

Es más cualitativa, pudiendo presentarse:

- Exageración del efecto terapéutico o tóxico.
- Disminución del efecto terapéutico.

Existen varios tipos de idiosincrasia:

Idiosincrasia verdadera → es la propia (o inherente) del organismo. Puede tener su origen o base bioquímica en la modificación de mecanismos que intervienen en la metabolización de los fármacos o en su unión a los receptores.

Puede ser de orden fisiológico o patológico.

Fisiológico:

Edad → mayor sensibilidad de los niños a la cafeína porque no pueden desmetilizarla.

Especie → la aspirina se glucoronoconjuga y en los gatos hay problemas en la glucoronoconjugación.

Patológico: hay individuos masculinos de raza negra que tienen una deficiencia en la glucosa-6-P-DH que protege a los eritrocitos. Ellos tienen mayor sensibilidad a la primaquina (antimalárico) lo que les ocasiona una anemia hemolítica.

Idiosincrasia adquirida → es una hipersensibilidad o reacción de alergia después de un primer contacto con un fármaco.

4.5 CUMPLIMIENTO DE REGIMEN DE DOSIFICACIÓN

La incapacidad o renuencia de los pacientes para el uso apropiado de los medicamentos, es un factor importante en las RAM. El mal cumplimiento del paciente puede dar como resultado una dosis excesiva de fármaco o el uso del medicamento más allá de un periodo de tiempo razonable. (2)

4.6 PATOLOGÍAS CONCOMITANTES

La enfermedad puede alterar las funciones normales del organismo y puede suponerse que la farmacocinética y la farmacodinamia de muchos fármacos también varíen como resultado de ello. Pueden producirse variaciones en la respuesta farmacológica por alteraciones en la eliminación o metabolismo del fármaco, o bien la respuesta puede estar afectada por otros estados patológicos. Las alteraciones patológicas del organismo pueden provocar que ciertos sistemas orgánicos sean más sensibles a los efectos farmacológicos de un fármaco.

(2)

Patologías → Ej. : antibiótico que se excreta por la vía renal y hay una insuficiencia renal que evita que el fármaco se excrete, permanecerá en la corriente sanguínea mucho tiempo.

4.7 POLIFARMACIA

El factor de mayor prevalencia en la producción de enfermedades inducidas por fármacos, es la terapia con varios de estos. Los enfermos bajo tratamiento con varios fármacos simultáneamente tienen mayor probabilidad de desarrollar RAM; esto puede ser causa del riesgo aditivo de las RAM cuando se administran más de dos fármacos o una mayor oportunidad para interaccionar entre ellos y producir dichas reacciones.

(2,8)

La evaluación de un evento adverso en un paciente particular es establecer si existe una relación casual entre el evento clínico no deseado y el fármaco bajo sospecha. Es indispensable un diagnóstico correcto antes de practicar una evaluación adicional. Las posibilidades diagnósticas para una reacción medicamentosa incluyen casi toda enfermedad conocida y algunos síndromes específicos relacionados con fármacos. (6)

4.8. HABITUACIÓN

La tolerancia consiste en la necesidad de dosis cada vez mayores para obtener un mismo efecto.

La tolerancia farmacocinética (Ej: fenobarbital, rifampicina) pueden inducir el metabolismo. El fármaco permanece en el organismo en contacto con el receptor en menos tiempo y se disminuye el efecto.

La tolerancia farmacodinámica consiste en que el organismo cada vez se habitúa y disminuye el efecto del fármaco. Ocurre principalmente con fármacos del SNC. Puede ser a nivel del acoplamiento o al nivel de los mediadores.

El acoplamiento consiste en que si hay 3 moléculas de fármaco que se unen a 3 receptores, en la segunda administración puede ser que un receptor se modifique y sólo hay dos receptores a los que se puede unir el fármaco, aunque la dosis sea la misma.

Los mediadores se dan en fármacos que se administran y ejercen a través de mediadores. La adrenalina desencadena la respuesta. Si se suministra la segunda dosis antes de que se repongan los mediadores, o la respuesta es más baja o no hay respuesta. Ej: morfina, cafeína, amfetamina, alcohol.

La taquifilaxia es el desarrollo agudo de tolerancia debida a la administración rápida y continuada de un fármaco. Ej: nitroglicerina se absorbe por la piel y causa vómitos y náuseas. Se usa para regenerar la musculatura cardíaca.

También puede haber tolerancia cruzada donde está inducido el metabolismo. Ej: los individuos tolerantes al alcohol también pueden ser tolerantes a los barbitúricos.

La dependencia puede ser física y, a veces, psíquica. La dependencia se puede dar en dos formas:

Adicción → cada vez hay más necesidad del fármaco con tendencia a dosis altas. Ej: los corticosteroides son producidos por la hipófisis. Si se dan exógenos, la hipófisis deja de estimularse. Si se dejan de dar, la hipófisis no estimula la producción y todos los organismos estarán afectados, debe haber una retirada paulatina para que la hipófisis establezca la estimulación.

Habitación → no hay necesidades físicas. Hay ansiedad por el deseo. Ej: tabaco.

CAPITULO 5. PROBABILIDAD DE UN EVENTO ADVERSO

El grado de probabilidad de que un evento adverso se relacione con la administración de un fármaco particular se clasifica como:

CLARO:

Una reacción que:

- 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 del cuerpo.
- Sigue el patrón de respuesta conocido del fármaco bajo sospecha.
- Se confirma por la mejoría que se observa al suspender el fármaco y su reaparición al volver a administrarlo.
- No puede explicarse por las características conocidas de la enfermedad del paciente.

(6)

PROBABLE:

Una reacción que:

- Sigue una secuencia temporal razonable después de la administración del fármaco.
- Sigue un patrón de respuesta conocido.

- Desaparece al interrumpir el medicamento, pero no reaparece al volverlo a administrar.
- No puede explicarse por las características conocidas de la enfermedad del sujeto.

(6)

POSIBLE:

Una reacción que:

- Sigue una secuencia temporal razonable.
- Puede o no ajustarse a un patrón de respuesta conocido; pero...
- Podría explicarse por las características conocidas del estado clínico del paciente.

DUDOSA: es más probable que la alteración se relacione con factores distintos al fármaco bajo sospecha. (6)

CAPITULO 6. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

La mayoría de los fármacos tienen numerosas acciones farmacológicas, algunas de las cuales pueden ser responsables tanto de los efectos terapéuticos buscados como de los efectos no buscados o adversos. Si bien ningún fármaco puede ser declarado completamente inocuo (libre de riesgo), puesto que todo fármaco es tóxico en alguna dosis; es posible evaluar daños histológicos de algunos tejidos orgánicos ante la exposición experimental de nuevos fármacos, en organismos vivos (animales de laboratorio); para lo cual se emplea la histología que nos permite estudiar la función de los tejidos junto con su estructura microscópica utilizando los procedimientos básicos de la técnica histológica (ANEXO 1); así mismo es de gran utilidad y necesario el conocer lo normal antes de estudiar lo patológico; por lo tanto, el estudio de la histología brinda una base indispensable para el estudio de la histopatología.

6.1 HISTOLOGIA

La histología es el estudio del tejido, refiriéndose al análisis de la composición microscópica y la respectiva función del material biológico. Las primeras investigaciones histológicas fueron posibles a partir del año 1600 cuando se incorporaba el microscopio (recientemente inventado) a los estudios anatómicos. A partir del estudio de la célula, se descubrió que estas siempre se forman por división de otras células y que el proceso se origina en el núcleo; así mismo se arribó a la importante conclusión de que solo existen 4 tejidos fundamentales: **tejido epitelial, tejido conectivo, tejido muscular y tejido nervioso.**

El tejido se forma por la agrupación de células con la misma función; los órganos son unidades funcionales mayores compuestos por distintos tipos

de tejido (ejemplo hígado, bazo); los sistemas comprenden varios órganos con funciones relacionadas, por ejemplo aparato respiratorio formado por nariz, laringe, traquea, bronquios y pulmones; los sistemas difusos definen grupos celulares con funciones relacionadas localizadas en varios órganos distintos, por ejemplo sistema inmune.

Así la histología incluye además de las estructuras celulares y de los órganos, el estudio de las células o citología, el estudio de los tejidos o histología propiamente dicha y el estudio de la estructura de los órganos o histología especializada (organografía)

En este estudio histopatológico se revisaron 4 órganos de interés farmacológico que fueron: intestino delgado, estómago, hígado y riñón los cuales son descritos en las siguientes páginas.

6.1.1 INTESTINO DELGADO

Tiene una longitud de 3 a 6.5 metros. Su principal función es la absorción de nutrientes. Se divide anatómicamente en tres segmentos sucesivos: **Duodeno, yeyuno e íleon.**

La pared del intestino delgado está formada por cuatro capas concéntricas: **Mucosa, submucosa, muscular y serosa.**

MUCOSA

Tiene un incontable número de vellosidades intestinales que son diminutas prolongaciones digitiformes, tienen una longitud de 0.5 a 1.5 mm (según el grado de estiramiento de la pared intestinal); cubren toda la superficie de la mucosa, su número varía de 10 a 40 por mm², son más numerosas en el duodeno y en el yeyuno proximal. También existen invaginaciones que forman glándulas tubulares entre las bases de las vellosidades llamadas criptas de Lieberkühn o glándulas intestinales. ^(23,24)

La mucosa se divide en cuatro capas: **Epitelio, membrana basal, lámina propia y muscular de la mucosa.**

EPITELIO:

La superficie de la mucosa es un epitelio columnar simple con microvellosidades y exocinocitos caliciformes en el que se pueden distinguir tres tipos celulares : células absorbentes, células caliciformes y células enteroendocrinas.

CÉLULAS ABSORBENTES: (Enterocitos), son células columnares, con una altura de 20 a 26 micras, y su núcleo es alargado en sentido vertical y localizado en la parte central de la célula. La superficie laminal presenta un prominente borde en cepillo (borde estriado). Este borde estriado está formado por microvellosidades, las cuales tienen una longitud de 1 a 1.4 micras y un diámetro de aproximadamente 80 nm. ^(23,25)

CÉLULAS CALICIFORMES: Son glándulas unicelulares secretoras de moco (es un líquido viscoso, o un gel fino formado por macromoléculas de glucoproteínas), que aparecen distribuidas de forma difusa entre las células absorbentes del epitelio intestinal. La secreción de moco se lleva a cabo en forma continua, aunque se incrementa por la irritación química y por estímulos nerviosos parasimpáticos. ^(22,25)

CÉLULAS ENTEROENDOCRINAS: Son células secretoras de hormonas. Estas células conforman una población celular muy heterogénea, entre las que destacan las células S productoras de secretina, las células CCC productoras de colecistocinina, y las células K productoras de péptido insulino-trópico dependiente de la glucosa, aparecen muy dispersas en forma individual. A pesar de sus diferencias, comparten varias características morfológicas; su forma es muy variable, de manera que en las criptas tienden a ser ovoideas o piramidales mientras que en las vellosidades pueden ser casi cilíndricas. ^(25,50)

LÁMINA PROPIA:

Es el tejido conjuntivo colágeno laxo que ocupa los intersticios que quedan entre las criptas de Lieberkühn y las zonas centrales de las vellosidades intestinales formadas por células fijas y móviles que se sitúan

sobre una delicada trama de fibras colágenas, elásticas, reticulares y que contienen una rica red de capilares situados bajo el epitelio. También se pueden observar células con características de fibroblastos y con morfología fusiforme, que se denomina fibroblastos subepiteliales. ^(23,25)

MUSCULAR DE LA MUCOSA:

Mide un promedio de 38 micras de grosor y está formada por redes de fibras elásticas y por dos capas de músculo liso, una interna circular y otra externa longitudinal. ⁽²⁴⁾

SUBMUCOSA

La submucosa está formada por tejido conjuntivo colágeno laxo, rico en fibras elásticas. ⁽²⁵⁾

MUSCULAR DEL ÓRGANO

La muscular del intestino delgado está formada por las capas longitudinal externa y circular interna de músculo liso, aunque también existen algunas bandas de fibras musculares lisas que pasan de una a otra capa. ⁽²⁵⁾

SEROSA

La capa más externa de la pared intestinal, la serosa, consiste en una cubierta continua formada por células planas, el mesotelio, y está separada de la capa muscular subyacente por una fina capa de tejido conjuntivo colágeno laxo. ⁽²⁵⁾

6.1.2 ESTÓMAGO

En el estómago humano se pueden distinguir cuatro zonas distintas. La estrecha región de 2 a 3 cm que rodea al orificio esofágico se denomina **cardias**. La región en forma de cúpula que sobresale en la parte izquierda del estómago por encima del nivel de la unión esófago-gástrica es el **fundus**. La espaciosa región central es el **centro**, y la porción más distal en la zona del orificio gastroduodenal se denomina **píloro**. ⁽²²⁾

La superficie interna del estómago está cubierta por epitelio columnar simple, que presenta numerosas invaginaciones tubulares llamadas foveolas o criptas, en donde desembocan las glándulas gástricas. Los principales componentes de la glándula gástrica son las células aprietales (oxínticas), que producen y secretan HCl y factor intrínseco y las células principales que secretan pepsinógeno, también se encuentran células enteroendocrinas y las mucosas del cuello. ⁽³⁾

Es un órgano tubular compuesto por cuatro capas:

Mucosa, submucosa, muscular del órgano, y serosa.

MUCOSA

La mucosa gástrica está cubierta por una capa lubricante de moco que protege al epitelio de la abrasión producida por los alimentos ingeridos y del pH gástrico. Esta capa de moco la produce las células mucinosas que forman el epitelio de superficie. La mucosa está a su vez formada por cuatro porciones: **Epitelio de membrana basal, lámina propia y muscular de la mucosa**. ⁽²²⁾

En el estómago existen una gran cantidad de glándulas por lo tanto no se aprecia mucho la lámina propia, la cual conforma el espacio que rodea

las glándulas y que queda entre sus bases, está ocupada por tejido conjuntivo colágeno laxo que consiste en una trama laxa de fibras reticulares y colágenas con un componente muy escaso de fibras elásticas. Además de fibroblastos, se pueden observar en la lámina propia linfocitos, eosinófilos, células cebadas y algunas células plasmáticas.

La muscular de la mucosa tiene también tejido conectivo colágeno laxo y envía algunas bandas delgadas de músculo liso hacia la lámina propia en forma vertical. ⁽²²⁾

SUBMUCOSA

Capa relativamente gruesa de tejido conjuntivo colágeno laxo; contiene haces más toscos y gruesos de fibras colágenas y abundantes fibras elásticas. En su interior se encuentran numerosas células errantes como linfocitos, eosinófilos, células cebadas sésiles y células plasmáticas; también es frecuente observar en la misma algunas células adiposas, así como abundantes arteriolas, un plexo venoso y una rica red de linfáticos. ⁽²²⁾

MUSCULAR DEL ORGANNO

La gruesa capa muscular de la pared gástrica se divide habitualmente en tres capas del músculo liso cuya orientación es, respectivamente, longitudinal interna, circular media y oblicua interna, no obstante, estas capas se entremezclan en sus zonas de interfaz y no están tan claramente definidas como las de la capa muscular del intestino. ⁽²²⁾

SEROSA

Llamado también peritoneo, recubre todo el estómago salvo una pequeña zona en la parte posterior, cerca del cardias. Se compone de mesotelio y tejido conectivo colágeno laxo submesotelial. ⁽²²⁾

6.1.3 HÍGADO

El hígado es la glándula con mayor peso en el cuerpo, cercano a 1.4 Kg. El hígado está cubierto casi completamente por el peritoneo visceral y lo está de manera total por una capa de tejido conjuntivo compacto e irregular que forma una cápsula bien definida. La cápsula se engruesa en el hilio, conocido como el portal hepático y su tejido conectivo fibroso entra al órgano para formar la mayor parte de la red, el estroma. El hígado está lobulado por dicho estroma fibroso, dividido en dos lóbulos principales: el lóbulo derecho, grande y el izquierdo, más pequeño. Los lóbulos del hígado se componen de numerosas unidades funcionales llamadas lobulillos. El **lobulillo hepático** está compuesto de varias placas de células hepáticas que se ramifican y anastomosan irregularmente, los **hepatocitos**, organizados en forma radial alrededor de la vénula central. En muchos sitios, las placas tienen el espesor de una célula, las cuales miden aproximadamente 1 mm de ancho por 2 mm de largo. Los hepatocitos poliédricos, en general, presentan dos superficies hacia los espacios perisinusoidales, en tanto que sus otras superficies están en íntimo contacto entre sí, excepto en el canalículo biliar. ^(33,35)

Cada célula hepática tiene un núcleo y ocasionalmente dos de ellos. Cada uno contiene por lo menos un nucléolo bien definido, pero muy poca cromatina. El citoplasma es algo basófilo y al microscopio de luz tiene una apariencia granular, métodos especiales de tinción muestran cantidades variables de partículas de glucógeno y gotas de lípidos, dependiendo del estado funcional de la célula y de su localización en el lobulillo hepático. El citoplasma contiene ambos tipos de retículo endoplásmico, liso y rugoso, hay ribosomas libres y polisomas. Tienen múltiples complejos de Golgi de pequeño tamaño que están localizados

en la periferia de la célula, poseen numerosas mitocondrias, lisosomas y peroxisomas. (23,33)

En lugar de capilares, el hígado posee grandes espacios epiteliales con revestimiento de endotelio, los **sinusoides** por los cuáles circula la sangre. Además contienen fagocitos fijos, las células reticuloendoteliales estrelladas (de Krupffer), que se encargan de la destrucción de leucocitos y eritrocitos viejos, bacterias y otros materiales extraños en la sangre venosa que proviene del tubo digestivo. (55)

El principal vaso sanguíneo aferente del hígado es la vena porta; entra al hilio hepático para dividirse en ramas que se distribuyen a través de las trabéculas del estroma hepático. Las ramas de la vena porta están acompañadas por pequeñas arterias hepáticas, conductillos biliares, y vasos linfáticos, lo mismo que algunas fibras nerviosas. Las ramas de la vena porta hepática, arteria hepática y vías biliares generalmente se acompañan en su distribución por el hígado. En forma conjunta, a estas tres estructuras se les ha denominado **triada porta**. (33,35)

Su función como glándula accesoria del tubo digestivo, consiste en la producción continua de bilis, así como también almacena hidratos de carbono en forma de glucógeno y libera glucosa, sintetiza proteínas del plasma sanguíneo, retira de la sangre fármacos y otras sustancias potencialmente nocivas y les priva de su toxicidad mediante su oxidación o formación de conjugados inocuos que son excretados de nuevo con la bilis al intestino. (23)

6.1.4 RIÑÓN

Consiste en un par de órganos encapsulados localizados en el espacio retroperitoneal, tienen una longitud de 10 a 12 cm, una anchura de 5 a 6 cm y un espesor anterior posterior de 3 a 4 cm. El borde interno del riñón es cóncavo y en su centro hay una hendidura denominada hilio; en el cual ingresa una arteria renal y sale una vena renal. ^(22,23)

En el riñón seccionado por la mitad se reconoce fácilmente a simple vista una corteza renal de color pardo rojizo oscuro y una médula más pálida.

La corteza renal está formada por 1.5 a 3 millones de subunidades tubulares denominadas **NEFRONAS** que es la unidad anatomofuncional de la función renal. Cada una de ellas tiene varios segmentos que difieren en cuanto a su estructura y función. Se trata del corpúsculo renal, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle y el túbulo contorneado distal. Cada nefrona se continúa con un túbulo colector que se une a un conducto colector. La corteza renal contiene los corpúsculos renales los túbulos contorneados proximales y distales y una parte de los túbulos colectores. El asa de Henle y la mayor parte de la longitud de los conductos colectores se encuentran en la médula.

En cada nefrona hay una expansión de paredes finas del túbulo proximal que se invagina profundamente para formar una estructura hueca en forma de copa denominada Cápsula de Bowman. La concavidad de esta cápsula está ocupada por el ovillo de capilares contorneados que se conoce como glomérulo. ⁽²³⁾

El **glomérulo** consiste en una arteriola aferente y otra eferente y el ovillo de capilares interconectados, tapizados con células endoteliales y cubiertas con células epiteliales que forman la capa continua con las correspondientes a la cápsula de Bowman con epitelio plano y el túbulo renal con epitelio cúbico. El glomérulo y su cápsula epitelial de doble pared constituyen juntos un corpúsculo renal.

El material que conforma la membrana basal se localiza entre las células capilares y las células epiteliales, denominadas **podocitos** que tienen varias prolongaciones primarias radiales que rodean a los capilares subyacentes y dan lugar a numerosas ramificaciones secundarias denominadas pedicelos. ^(22,23)

El citoplasma de los **podocitos** contiene un pequeño aparato de Golgi, una moderada cantidad de retículo endoplásmico rugoso y abundantes ribosomas libres. ⁽²³⁾

Los espacios que quedan entre los capilares glomerulares están ocupados por el mesangio, un tejido conjuntivo formado por células mesangiales sobre una matriz extracelular en gran parte desprovista de elementos fibrosos, aparte de la fibronectina. El mesangio contiene dos tipos de células: Las **glomerulares intrínsecas** y los **macrófagos tisulares**. ^(22,23)

CAPITULO 7. DESARROLLO EXPERIMENTAL

7.1. MATERIAL

Material biológico:

- 42 ratas wistar macho, jóvenes.

Compuestos químicos:

- Compuestos derivados morfolínicos del fenol (LQM 305 y LQM 309)

Material:

- Cámara de anestesia.
- Estuche de disección.
- Charolas.
- Equipo de venoclisis.
- Frascos de vidrio con tapa de rosca y boca ancha.
- Dispositivos de administración del fármaco (sondas).
- Agujas de insulina
- Portaobjetos y cubreobjetos de vidrio
- Frascos viales.
- Cajas para animales.
- Pipeta volumétrica de 5ml.
- Pipetas graduadas de 5ml y 1ml.
- Agitadores de vidrio.
- Matraz aforado de 10ml y 5 ml.

- Gasas no estériles.
- Algodón.
- Masking tape
- Periódico

Reactivos:

- Éter etílico
- Reactivo de Bouin (fijador)
- Solución salina fisiológica
- Alcohol en diferentes concentraciones (70%, 80%, 90%, 96% y 100%)
- Monómero de estireno (aclarante)
- Cera parafinada
- Colorantes hematoxilina y Eosina
- Dimetil sulfóxido.
- Aceite de maíz.

Equipo:

- Balanza analítica.
- Micrótopo.
- Histokinette.
- Dispensador de parafina.
- Baño de flotación.
- Platina térmica.
- Microscopio óptico.
- Balanza granataria con jaula para animales.

*

7.2. METODOLOGÍA

7.2.1. FASE DE INDUCCIÓN.

Derivados morfolínicos del fenol.

7.2.1.1. DESARROLLO DE ACTIVIDADES Y DURACIÓN DE LOS ESTUDIOS.

ACTIVIDADES	DURACIÓN
1. Formación y aclimatación de lotes.	1 semana
2. Evaluación histopatológica de los órganos.	3 semanas

1. Formación y aclimatación de lotes:

- Se marcaron y se pesaron todas las ratas.
- Los pesos se ordenaron de manera ascendente.
- Se formaron lotes de 6 ratas cada uno, (3 lotes por cada uno de los compuestos) mediante una distribución aleatoria.
- Los lotes formados se etiquetaron con las dosis correspondientes de cada compuesto (3 dosis de cada uno)
- De igual modo se formó un lote de ratas como grupo control para todos los compuestos administrados en el mismo mes.
- Se dejó transcurrir una semana antes de comenzar el tratamiento para dar tiempo a la adaptación de las ratas.
- Las ratas fueron alimentadas con nutricubos y agua ad libitum*.

* ad libitum (la que quieran)

2. Plan de administración:

- Se calcularon las dosis de acuerdo al peso de cada rata y de acuerdo a la dosis efectiva.

COMPUESTO	DE ₅₀ (mg/Kg)
LQM 305	0.05
LQM 309	0.05

TABLA A. Dosis terapéutica de los compuestos derivados morfolínicos del fenol.

Dosis utilizadas de los compuestos derivados morfolínicos del fenol para evaluar el posible daño histológico, calculadas a partir de la DE₅₀. triplicándose la dosis.

DOSIS	COMPUESTO LQM 305 (mg/Kg)	COMPUESTO LQM 309 (mg/Kg)
1	0.075	0.075
2	0.15	0.15
3	0.225	0.225

TABLA B. Dosis máximas recomendadas.

- Los lotes fueron dosificados dentro del margen de seguridad a dosis terapéuticas (ver tabla A) y de acuerdo a la posología adecuada para cada animal. Las condiciones de alimentación y cuidado durante el periodo de estudio fueron iguales para todos los lotes.

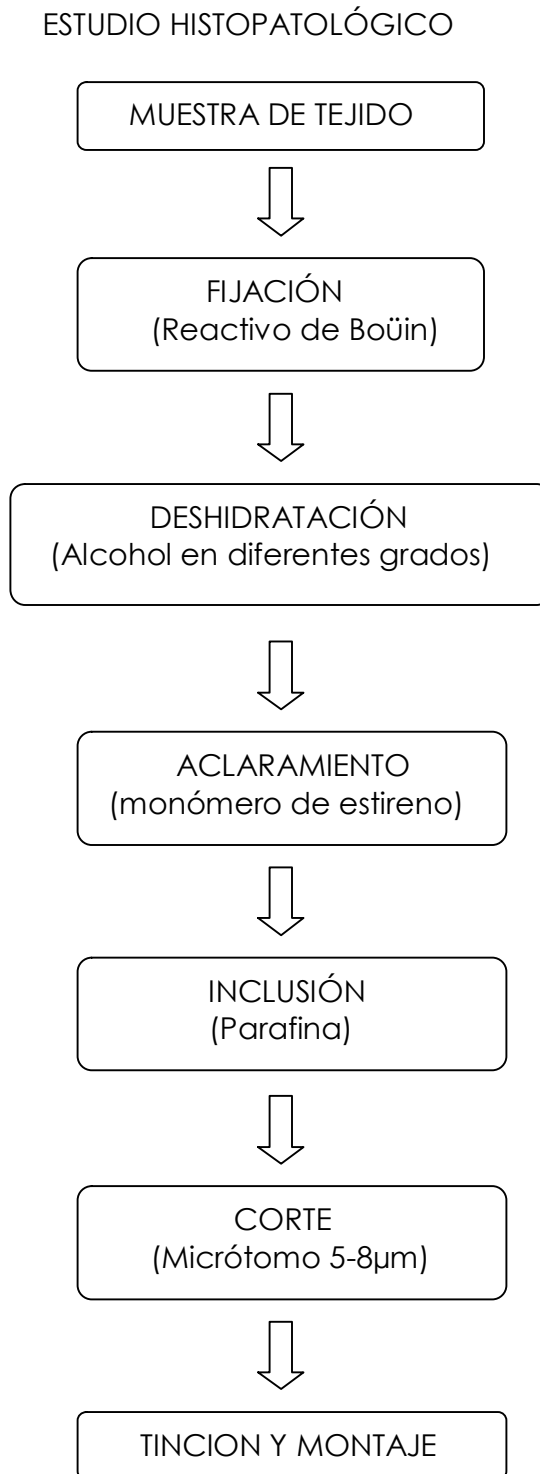
- La dosis de los compuestos morfolínicos fueron las máximas recomendadas (ver tabla B), adecuándolas a las características del animal de experimentación; preparándose una solución de cada compuesto en aceite de maíz, de concentración conocida. (Agregando dimetil sulfóxido a los compuestos LQM 305 y LQM 309, para lograr su disolución)
- La administración se realizó por vía oral para los lotes tratados, con el volumen de solución correspondiente a la dosis para cada rata.
- A las ratas del lote control, se les administró por vía oral el volumen correspondiente, de una mezcla de aceite de maíz con dimetil sulfóxido en proporción igual a la utilizada para disolver el compuesto.
- La administración se realizó diariamente, administrando una toma cada 24 horas.
- El sacrificio de animales y la toma de muestras se realizó después de 4 días de administración, sacrificando 2 animales por cada lote con el objeto de tomar muestras para que por medio del estudio histopatológico se pueda cuantificar el efecto de los compuestos administrados.

COMPUESTOS MORFOLINICOS DEL FENOL	DERIVADOS	NUMERO DE SACRIFICIOS SEMANALES		
		Semana 1	Semana 2	Semana 3
	Dosis (mg/kg)			
Lotes: LQM 305 LQM 309.	0.075	2	2	2
	0.15	2	2	2
	0.225	2	2	2
Lote	Control	2	2	2

TABLA C. Número de ratas sacrificadas al término de cada semana de tratamiento.

7.2.2. EVALUACIÓN DE REACCIONES ADVERSAS

Derivados morfolínicos del fenol



7.2.2.1. MUESTRA DE TEJIDO:

Toma de muestras y sacrificio de animales:

- Fueron seleccionadas 2 ratas de cada uno de los lotes en tratamiento y 2 ratas control.
 - Se Preparó el sistema de infusión de la solución salina y el reactivo de Boüin (fijador) Conectando las venoclisis en forma de Y.
 - Las ratas correspondientes se anestesiaron en la cámara de anestesia, con éter etílico (hasta que el animal se encontró en el plano III de la anestesia quirúrgica)
 - Se colocó a la rata anestesiada en una charola, en posición decúbito-dorsal (boca arriba), sujetándola de las cuatro extremidades anteriores y posteriores.
 - Se realizó una incisión sobre la línea media, teniendo cuidado de no cortar o lesionar, los órganos abdominales.
 - Se abrió la caja torácica para exponer el corazón (aún latiendo)
 - Se puncionó el corazón en el vértice y hacia el ventrículo izquierdo con el sistema de venoclisis preparado.
 - Se dejó pasar un poco de solución salina fisiológica para "lavar" el sistema circulatorio, y al mismo tiempo se localizó la vena de una extremidad torácica (pata), a la cual se le hizo una incisión para que la sangre fluyera (desangrado)
 - Inmediatamente después se dejó pasar el reactivo de Boüin (para la fijación *in vivo* de los tejidos) de manera lenta, hasta que el corazón dejó de latir.
 - Enseguida se abrió un poco más el paso del fijador hasta notar una coloración amarilla en los órganos y tejidos de la rata.
 - Se retiró el sistema de infusión y se tomaron muestras de los órganos de interés con el debido cuidado; utilizando las pinzas, tijeras y el bisturí.
- La manipulación de los tejidos fue la menor posible, tratando de no tocar las partes de interés.

Para lograr una buena fijación el tamaño de la muestra fue:

HÍGADO: Se cortó a la mitad de uno de los lóbulos y luego se cortó una porción de 1.5cm de largo y 1.0cm de altura aproximadamente.

RIÑÓN: Se cortaron por la mitad tomando una de estas o en algunas ocasiones se tomo por completo el órgano.

ESTÓMAGO: Se tomó de la porción baja que conecta ya al Intestino delgado; aproximadamente 1cm del área.

INTESTINO DELGADO: Se cortó, tomando un fragmento de 2cm aproximadamente, de la parte del duodeno y si acaso yeyuno.

7.2.2.2. FIJACIÓN:

Las muestras de los órganos se enjuagaron con agua corriente, y se colocaron en un frasco para cada rata (etiquetados correctamente con fecha, fármaco, dosis y a que animal pertenecía), con reactivo de Bouin en proporción aproximada de 9 a 1, por un tiempo de 48 horas.

Después del tiempo especificado se retiró el reactivo de Bouin, enjuagando con agua corriente las muestras y colocándolas en alcohol al 70% hasta su procesamiento histológico.

7.2.2.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El procesamiento de todas las muestras se lleva a cabo en el laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FES – Cuautitlán. Campo 4) se procedió de la siguiente manera:

Se cortaron del tamaño adecuado las muestras, con dos cuchillas perfectamente afiladas para evitar alterar la estructura celular y se colocaron en casetes (contenedor para la porción de muestra a analizar) debidamente identificados, introduciéndolos en un frasco que contenía alcohol al 70%.

7.2.2.4. DESHIDRATACIÓN:

Los órganos fueron pasados a diferentes concentraciones de alcohol en orden creciente como se muestra en la siguiente tabla, y exponiéndolos a una temperatura de 55°C aproximadamente dentro de un microondas y por un tiempo de 15 minutos.

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

7.2.2.5. ACLARAMIENTO:

Deshidratados los órganos, se pasaron a un aclarante (monómero de estireno), hasta que se incluyeron en la parafina.

7.2.2.6. INCLUSIÓN:

Se colocaron las muestras en el histokinete con una mezcla de monómero de estireno y parafina a 56 °C, durante una hora.

Se calentó la parafina a 56°C en el dispensador de parafina.

Se armaron sobre la base móvil del dispensador, con moldes de tamaño adecuado, vertiendo un poco de parafina fundida e inmediatamente fueron insertadas las muestras lo más rápido posible (tratando que quedaran sobre el mismo plano todas las muestras) y se cubrió completamente con parafina fundida, colocando la identificación correspondiente y dejando solidificar por completo el bloque formado con la parafina.

Una vez frías y extraídas de los moldes los bloques se conservaron en un refrigerador hasta su corte.

7.2.2.7. CORTE:

Los bloques se rebajaron en caso necesario, para facilitar su corte y obtener las tiras o series, mediante el empleo del micrótomo.

El grosor del corte fue de 6 micras.

Se preparo el baño de flotación con agua limpia a una temperatura de 40 °C.

Se agrego al baño de flotación grenetina para la adhesión de los cortes al portaobjeto, que también fueron untados con una mezcla de glicerina y albúmina.

Después de seccionar el bloque en el micrótomo, la tira obtenida se pone a flotar en el baño de flotación, donde se pueden separar los cortes mediante el uso de un pincel.

El corte se extiende, cuidando que no se hagan pliegues o burbujas y se saca del baño de flotación ya adherido al portaobjetos.

La laminilla se escurre y se seca en la platina térmica. Se marcan con tinta indeleble para su identificación; se deja la laminilla de 12 a 24 hrs en la estufa o platina a 40 °C, para que este lista, posteriormente a la tinción usando colorantes permanentes.

7.2.2.8. TINCIÓN:

Se usa la tinción de Hematoxilina-eosina para todos los cortes.

1. Se colocan las laminillas en una canastilla para tinción.
2. Se introducen en xilol para eliminar el exceso de parafina.
3. Se deshidratan en alcohol absoluto durante 5 minutos.
4. Se deshidratan en alcohol al 96° durante 5 minutos.

5. Se hidratan con un poco de agua.
6. Se introducen en Hematoxilina de Harris durante 10 minutos.
7. Se lavan con agua.
8. Se sumergen durante 30 segundos en Carbonato de Litio en solución concentrada.
9. Se lavan con agua.
10. Se decoloran con alcohol ácido, con 2 o 3 inmersiones rápidas.
11. Se lavan con agua rápidamente.
12. Se introducen en Eosina alcohólica durante un minuto.
13. Se lavan con alcohol de 96° y 100°.
14. Se sumergen en xilol durante 5 minutos.

7.2.2.9. MONTAJE:

- Se secan y limpian perfectamente las laminillas.
- Se les coloca una gota de resina sintética sobre el corte.
- Se coloca un cubreobjetos apropiado al tamaño del corte, presionando suavemente para eliminar las burbujas de aire, el exceso de resina, y dejar secar a la intemperie.
- Se guarda la laminilla y posteriormente se observa al microscopio.

7.2.2.10. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO:

Se realizó la observación en el microscopio de las diferentes preparaciones de tejido enfocando la muestra con el ocular de 10x, después con el de 40x y posteriormente con el de 100x para poder analizar los daños histológicos encontrados.

7.2.2.11. PARAMETROS EVALUADOS

a) COMPORTAMIENTO GENERAL:

- ALIMENTACIÓN: Se controló diariamente la cantidad de alimento que se les proporcionaba a cada lote.
- ACTIVIDAD Y ESTADO GENERAL: El comportamiento de cada animal se observó diariamente manipulándolos y examinándolos para observar cualquier cambio en su comportamiento.
- CONSISTENCIA DE LAS HECES: Diariamente se observó la consistencia de las heces, de los animales.

b) PESO:

Se pesaron las ratas al inicio de cada semana de tratamiento para poder evaluar su tendencia.

c) MORFOLOGÍA GENERAL MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA:

Se lleva a cabo la revisión física de los diferentes tejidos a estudiar (Estómago, intestino delgado, hígado, riñón) y posteriormente la microscópica que se realiza con el procesamiento de las muestras para evaluar los daños histológicos provocados por los compuestos administrados LQM 305 y LQM 309 y mediante la observación al microscopio.

CAPITULO 8. RESULTADOS Y OBSERVACIONES

Los lotes tratados con los compuestos LQM 305 y LQM 309 mostraron actividad motora tranquila y comportamiento aparentemente normal.

El control de la alimentación fue de dos nutricubos para cada animal y agua *ad libitum*¹, buen apetito.

Algunos animales de los lotes experimentales presentaron diarreas, aunque solo algunos y no fue siempre.

El lote control se mostró aparentemente normal.

PARAMETRO	<i>LQM 305</i>	<i>LQM 309</i>	<i>CONTROL</i>
ALIMENTACIÓN	Ingesta normal	Ingesta normal	Ingesta normal
ACTIVIDAD	<i>Normal</i>	Normal	Normal
ESTADO GENERAL	Normal	Normal	Normal
CONSISTENCIA EN HECES	Diarrea	Diarrea	<i>Normal</i>

TABLA 1. Muestra el estado general que presentaron las ratas al ser administradas con los compuestos morfolínicos derivados del fenol.

La tendencia del peso que mostraron los lotes tratados con los compuestos administrados LQM 305 fue en forma creciente, parecida al lote control y LQM 309 disminuye de peso a la tercera semana para la dosis 0.075 y 0.15 mg/kg, como se puede corroborar en las siguientes tablas y graficas 1 y 2.

¹ *ad libitum* (la que quieran)

TABLA 2. Peso promedio (en gramos) que presentaron las ratas administradas con el compuesto LQM 305 y ratas control.

SEMANA	DOSIS 0.075 (mg/kg)	DOSIS 0.15 (mg/kg)	DOSIS 0.225 (mg/kg)	CONTROL
1	372.58grs.	386.86grs.	363.83grs.	224.56grs.
2	380.75grs.	406.5grs.	392.33grs.	236.78grs.
3	404.9grs.	457.57grs.	460grs.	270.2grs.
4	465.75grs.	465.8grs.	514grs.	303.5 grs.

GRAFICA 1. Control de peso semanal de los lotes tratados con el compuesto morfólinico derivado del fenol LQM 305.

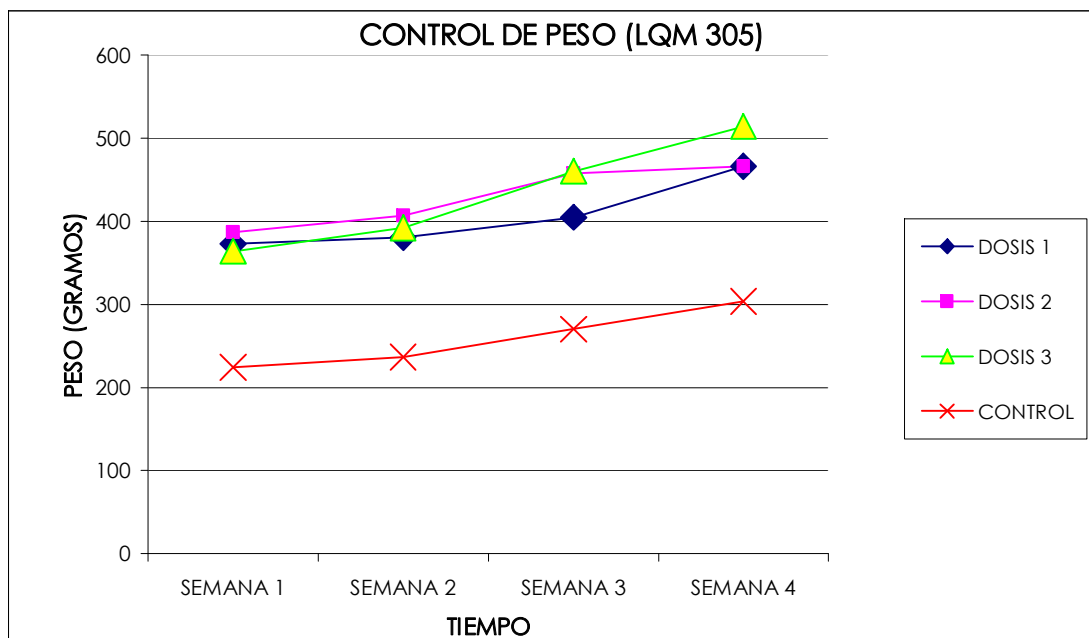
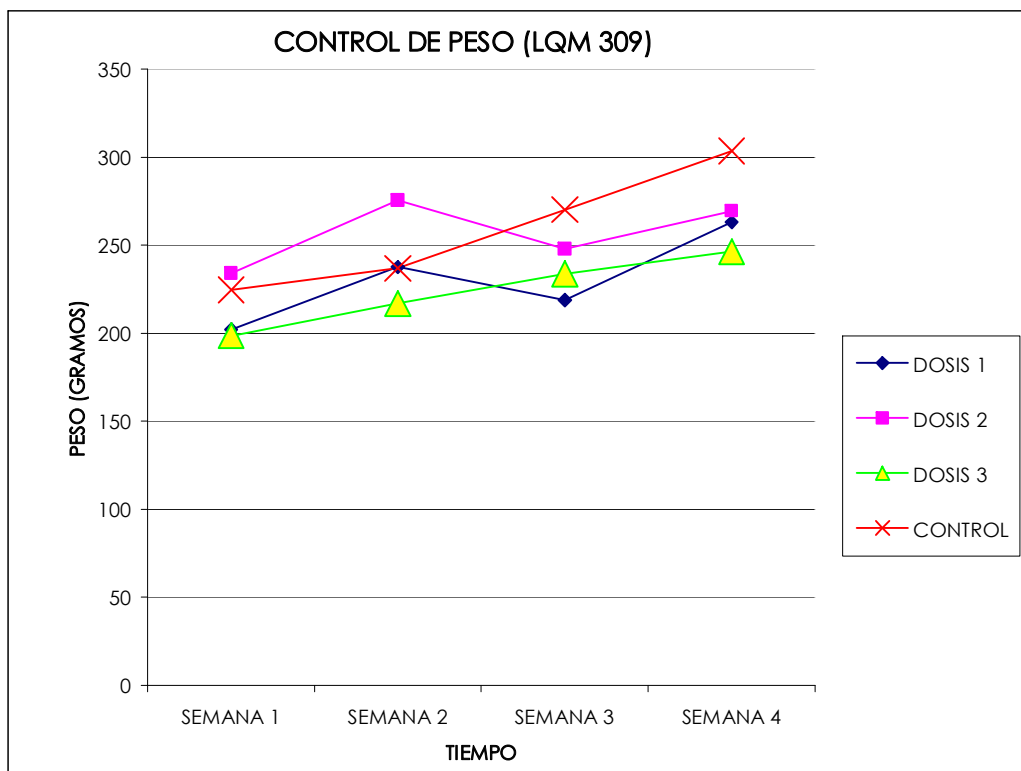


TABLA 3. Peso promedio (en gramos) que presentaron las ratas administradas con el compuesto LQM 309 y ratas control.

	DOSIS	DOSIS	DOSIS	CONTROL
SEMANA	0.075 (mg/kg)	0.15 (mg/kg)	0.225 (mg/kg)	
1	202.2grs.	233.9grs.	198.5grs.	224.56grs.
2	237.6grs.	275.7grs.	216.9grs.	236.78grs.
3	218.7grs.	247.9grs.	233.8grs.	270.2grs.
4	263grs.	269.5grs.	246.3grs.	303.5grs.

GRAFICA 2. Control de peso semanal de los lotes tratados con el compuesto morfólinico derivado del fenol LQM 309



En la revisión macroscópica de los diferentes órganos observamos un aspecto normal del estómago encontrando a algunos con un tamaño superior al normal, debido a que estaban llenos con el alimento que ingirieron; el intestino delgado mostró un aspecto amarillento debido a la fijación del reactivo de Bouin, así como la aparición de algunas nodulaciones conocidas como placas de peyer; el hígado mostró un aumento en su tamaño y una coloración pálida; los riñones también mostraron un ligero aumento en su tamaño.

Los resultados significativos del estudio histopatológico para la caracterización de las reacciones adversas que presentaron los compuestos LQM 305 y LQM 309 en los diferentes órganos fueron:

En estómago se manifestaron lesiones superficiales en el epitelio de la mucosa, restos celulares, atrofia de las células, respuesta inflamatoria, congestión y proceso de necrosis en zonas aisladas del epitelio.

En la siguiente tabla se resumen los daños significativos encontrados en estómago con las diferentes dosis y compuestos administrados:

DOSIS (mg/kg)	COMPUESTO LQM 305	COMPUESTO LQM 309
0.075	Sin cambios patológicos aparentes	Congestión
0.15	Respuesta inflamatoria	Sin cambios patológicos aparentes.
0.225	Destrucción superficial de la mucosa, atrofia de las células.	Destrucción superficial de la mucosa, atrofia celular y necrosis en zonas aisladas.

TABLA 4. Daños histopatológicos encontrados al administrar los compuestos derivados morfolínicos del fenol.

En el intestino delgado se apreció destrucción apical de las vellosidades, hipersecreción de moco, respuesta inflamatoria y desprendimiento de epitelio para ambos compuestos administrados.

En la siguiente tabla se resumen los daños significativos encontrados en intestino delgado con las diferentes dosis y compuestos administrados:

DOSIS (mg/kg)	COMPUESTO LQM 305	COMPUESTO LQM 309
0.075	Hipersecreción de moco	Hipersecreción de moco
0.15	Sin cambios patológicos aparentes.	Sin cambios patológicos aparentes.
0.225	Respuesta inflamatoria	Destrucción apical de las vellosidades, hipersecreción de moco, respuesta inflamatoria.

TABLA 5. Daños histopatológicos encontrados al administrar los compuestos derivados morfólinicos del fenol.

En el hígado se hallaron núcleos de forma irregular, vaciamiento del citoplasma, hepatocitos hinchados, marginación de la cromatina y necrosis coagulativa en focos aislados, así como núcleos picnóticos en ambos compuestos administrados.

En la siguiente tabla se resumen los daños significativos encontrados en hígado con las diferentes dosis y compuestos administrados:

DOSIS (mg/kg)	COMPUESTO LQM 305	COMPUESTO LQM 309
0.075	Núcleos irregulares, marginación de la cromatina y congestión.	Marginación de la cromatina.
0.15	Vaciamiento de citoplasma, marginación de la cromatina y congestión.	Núcleos irregulares, vaciamiento del citoplasma y marginación de la cromatina.
0.225	Vaciamiento de citoplasma hepatocitos hinchados, marginación de la cromatina y congestión.	Núcleos irregulares y marginación de la cromatina.

TABLA 6. Daños histopatológicos encontrados al administrar los compuestos derivados morfolínicos del fenol.

En el riñón se encontró glomerulitis en ambos compuestos, destrucción glomerular, edema, focos inflamatorios y congestión.

En la siguiente tabla se resumen los daños significativos encontrados en hígado con las diferentes dosis y compuestos administrados:

DOSIS (mg/kg)	COMPUESTO LQM 305	COMPUESTO LQM 309
0.075	Sin cambios patológicos aparentes.	Glomerulitis, destrucción glomerular.
0.15	Sin cambios patológicos aparentes.	Sin cambios patológicos aparentes.
0.225	Glomerulitis.	Sin cambios patológicos aparentes.

TABLA 7. Daños histopatológicos encontrados al administrar los compuestos derivados morfolínicos del fenol.

CAPITULO 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

PRUEBA POR PROPORCIONES

1. Los datos se obtienen a partir de los daños histopatológicos de 6 animales de laboratorio (4 lotes; 3 dosis diferentes y un control), tomando en cuenta la lesión histopatológica encontrada, por ejemplo en el intestino delgado con el compuesto LQM 305 se presento una respuesta inflamatoria (RI) de la cual, en la siguiente tabla se visualiza el número de animales que la presentaban:

# RATA	DOSIS 0.075 mg/kg	DOSIS 0.15 mg/kg	DOSIS 0.225 mg/kg	CONTROL
1			RI	RI
2	RI		RI	
3			RI	RI
4	RI	RI	RI	
5	RI	RI	RI	
6			RI	
PROPORCIÓN	3/6	2/6	6/6	2/5

Es decir, las siguientes proporciones:

DOSIS	PROPORCIÓN (P)	PORCENTAJE (%)
0.075(mg/kg)	0.5	50
0.15(mg/kg)	0.33	33
0.225(mg/kg)	1	100
CONTROL	0.4	40

2. SUPUESTOS:

La distribución normal de P, sigue una distribución normal de acuerdo con el teorema del límite central, es decir se compara el valor calculado de z con el valor de la distribución normal estándar, en lugar de con la distribución de t.

3. HIPÓTESIS:

$$H_0 : P_1, P_2, P_3 = P_{\text{control}} (P_0)$$

$$H_a : P_1, P_2, P_3 \neq P_{\text{control}} (P_0)$$

4. ESTADÍSTICA DE PRUEBA

$$Z_i = \frac{P - P_0}{D_p}$$

$$D_p = \frac{pq}{n}$$

$$\text{Donde: } q = 1 - P_0$$

p = proporción observada

n = tamaño de la muestra

5. DISTRIBUCIÓN DE LA ESTADÍSTICA DE PRUEBA

Si la hipótesis nula es verdadera la estadística de prueba sigue una distribución aproximadamente normal con una media de cero.

6. REGLA DE DECISIÓN

Sea $\alpha = 0.05$, a un 95 % de confianza.

Los valores críticos de $Z_{\alpha/2}$ son (-1.96, 1.96)

Se rechaza H_0 , si Z_{exp} No Pertenece al intervalo (-1.96, 1.96)

7. CALCULO DE LA ESTADÍSTICA DE PRUEBA

$$P_0 = 0.4 \quad q = 1 - 0.4 = 0.6$$

Aplicando las formulas de la prueba estadística:

$$D_p = 0.2191$$

$$Z_{i1} = 0.456 \quad \text{se acepta } H_0$$

$$Z_{i2} = -0.319 \quad \text{se acepta } H_0$$

$$Z_{i3} = 2.74 \quad \text{se rechaza } H_0$$

8. DECISIÓN ESTADÍSTICA

Con dosis 0.075 mg/kg y 0.15 mg/kg se acepta H_0 o esta dentro del intervalo (-1.96, 1.96) por lo tanto no hay diferencia significativa entre los lotes tratados y el lote control.

Con dosis 0.225 mg/kg se rechaza H_0 o esta fuera del intervalo (-1.96, 1.96) por lo tanto hay diferencia significativa entre el lote tratado y el control.

9. DECISIÓN ADMINISTRATIVA

Se concluye que el 50% y 33% de la afección encontrada como repuesta inflamatoria en la lamina propia de intestino delgado con dosis 0.075 mg/kg y 0.15 mg/kg no son debidas a los compuestos administrados. Por el contrario el 100% de la afección encontrada con dosis 0.225 mg/kg si es debida al compuesto administrado.

CAPITULO 10. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las lesiones histopatológicas encontradas al administrar los compuestos derivados morfólicamente del fenol dieron lugar a lesiones celulares reversibles como lo es la **respuesta inflamatoria** que es una reacción de la microcirculación caracterizada por desplazamientos de líquido, ya que la pared vascular se encuentra alterada y distintos componentes del plasma fluyen a los tejidos, esta respuesta se presentó en **estómago**, tratado con LQM 305; también en glomérulos del riñón, dando lugar a una **glomerulitis** con ambos compuestos, LQM 305 a dosis 0.225 mg/kg y LQM 309 a dosis 0.075 mg/kg . (Fig. 6); así también en la respuesta inflamatoria se da la exudación de células fagocitarias entre las que destacan los neutrófilos, macrófagos y monocitos, como los encontrados en lámina propia de intestino delgado. (Fig. 4)

También se logró detectar **hipersecreción de moco** manifestada sobre el epitelio de **intestino delgado y estómago**, pero que no fue causada por la administración de los compuestos, sino que se puede atribuir al estrés de las ratas al ser administradas.

La **destrucción del epitelio y la atrofia celular** que es una respuesta adaptativa en la que existe una reducción de tamaño y pérdida de la función de las células se observa como destrucción apical de las vellosidades y atrofia de la célula. (Fig. 2 Y 4)

Así mismo dentro de las lesiones celulares reversibles podemos apreciar **alteraciones nucleares** como es, la deformación de su estructura apareciendo estas alteraciones en los núcleos de las células hepáticas con la administración del compuesto LQM 305 a dosis 0.075 mg/kg y con LQM 309 a dosis 0.15 y 0.225 mg/kg. (Fig. 8)

La **tumefacción o hinchazón celular** aparece siempre que las células son incapaces de mantener su homeostasis de iones y fluidos; ésta es una de las manifestaciones de lesión celular reversible caracterizada por un citoplasma pálido, grande producido por compromiso de la regulación del volumen celular, proceso que controla las concentraciones iónicas en el citoplasma en particular para el sodio que al acumularse en la célula hace que el agua aumente y la célula se hincha, como lo observado en células de hígado con el compuesto LQM 305 a dosis 0.225 mg/kg en donde el hepatocito aumenta de tamaño y por consiguiente desaparecen los sinusoides hepáticos. (Fig. 8)

Desde el punto de vista microscópico se pudo observar pequeñas vacuolas claras en el citoplasma, estas vacuolas representan segmentos distendidos del retículo endoplásmico; esta lesión no letal en ocasiones la denominan **degeneración vacuolar**, pero aquí la denominamos **citoplasma vacuolado** presentándose en células hepáticas a dosis 0.15 y 0.225 mg/kg con el compuesto LQM 305 y a dosis 0.15 mg/kg con el compuesto LQM 309. (Fig. 8)

La congestión caracterizada por la presencia de eritrocitos en las venas y en los tejidos observados, es una lesión no significativa que pudo ser causada por la técnica histológica de rutina utilizada. (Fig. 8)

Las lesiones irreversibles en los tejidos causan la muerte celular (necrosis) La **necrosis** se acompaña de alteraciones bioquímicas y estructurales.

Las células necróticas cesan de funcionar, cuando la necrosis es suficientemente extensa se producen enfermedades clínicas. Su manifestación más frecuente es la **necrosis por coagulación o necrosis coagulativa** causada por desnaturalización de las proteínas citoplasmáticas y con la aparición de **núcleos picnóticos**

caracterizados por constricción nuclear es decir, el núcleo se torna más pequeño.

Apoptosis señalada por la condensación de la cromatina y que se manifestó en ambos compuestos y en las dosis administradas. Esta necrosis sólo se encontró en focos aislados.

No obstante, las manifestaciones histopatológicas anteriores, no hubo alteración significativa en el peso de los animales, con el compuesto LQM 305, observando una tendencia a incrementar su peso, igual al lote control, (tabla 2, gráfica 1 en resultados); aunque, con el compuesto LQM 309 si hubo una variación en 2 de los 3 lotes tratados (tabla 3, gráfica 2 en resultados) bajando de peso a la tercera semana y aumentó en la cuarta, esta variación es no significativa y todo lo anterior se asegura con un 95 % de confianza.

CORTES HISTOLÓGICOS DE ESTÓMAGO

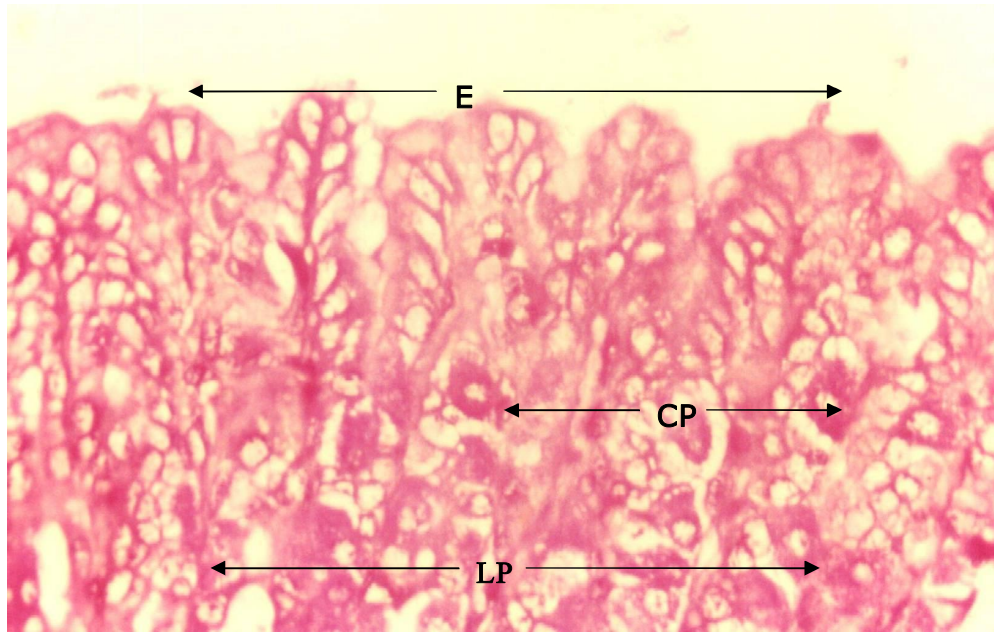


FIGURA 1. Esta imagen corresponde a un corte de estómago de una rata control. Se aprecia el epitelio (E), parte de la lamina propia (LP), célula parietal (CP), Arquitectura normal. Tinción H-E (40x)

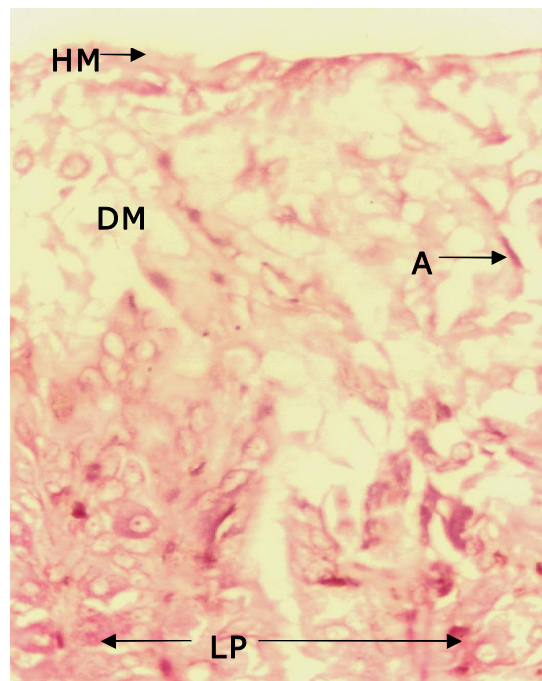


FIGURA 2. Esta imagen corresponde a un corte de estómago de una rata experimental. Se observa destrucción de la superficie de la mucosa (DM), hipersecreción de moco (HM), atrofia celular (A), en lámina propia (LP) aún hay conservación de la arquitectura celular. Tinción H-E (40x)

CORTES HISTOLÓGICOS DE INTESTINO DELGADO

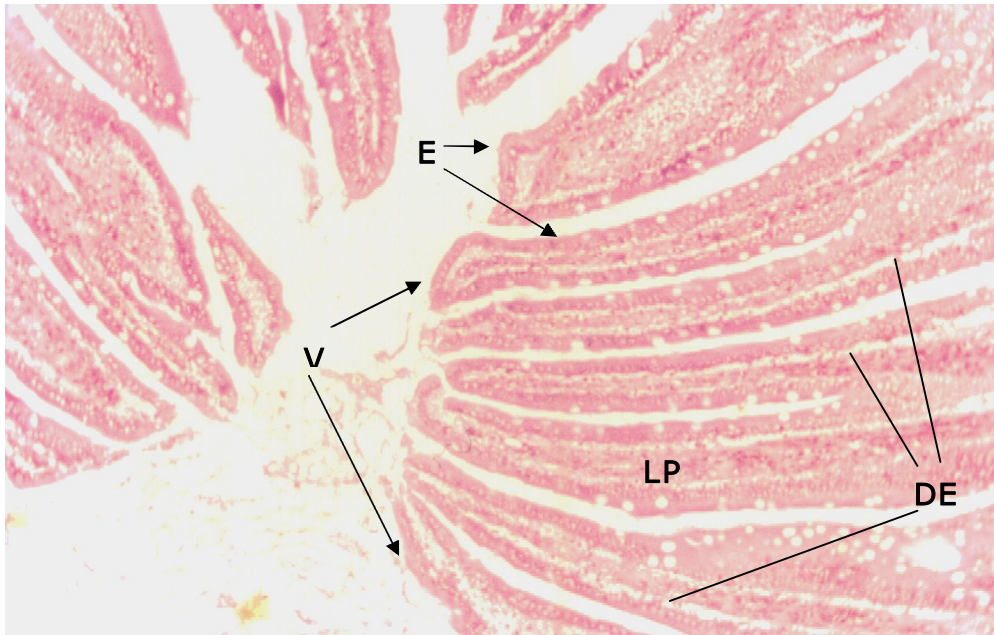


FIGURA 3. Esta imagen corresponde a un corte de intestino delgado de una rata control donde se aprecian vellosidades (V), epitelio (E), lámina propia (LP), y desprendimiento de epitelio (DE), tejido normal. Tinción H-E (40x)

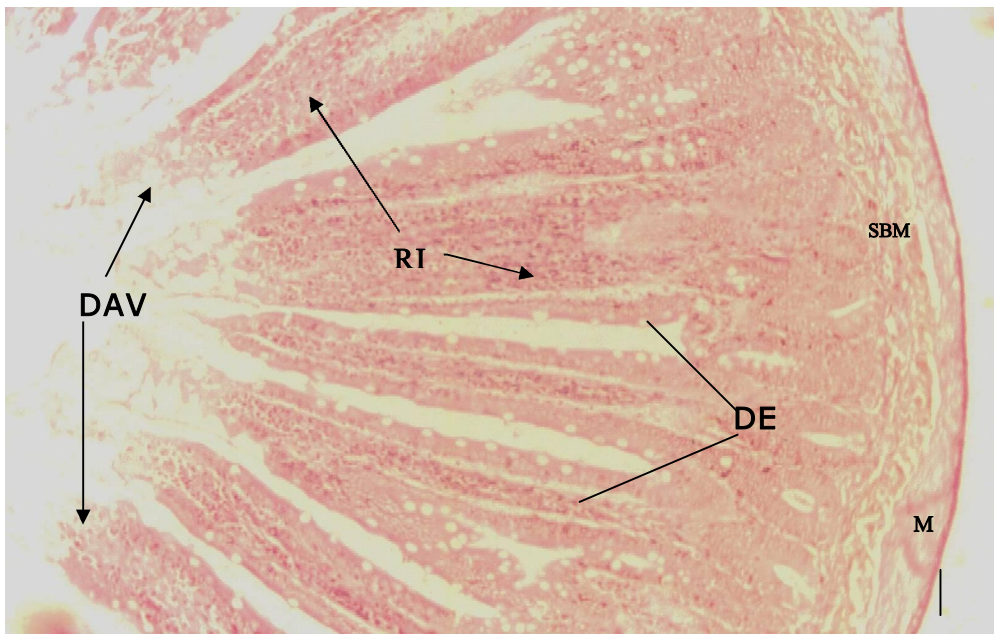


FIGURA 4. Esta imagen de intestino delgado de una rata experimental se observa destrucción apical de las vellosidades (DAV), desprendimiento de epitelio (DE), respuesta inflamatoria (RI), y la conservación de las demás estructuras, submucosa (SBM), muscular (M) y serosa (S), tinción H-E (40x)

CORTES HISTOLÓGICOS DE RIÑÓN

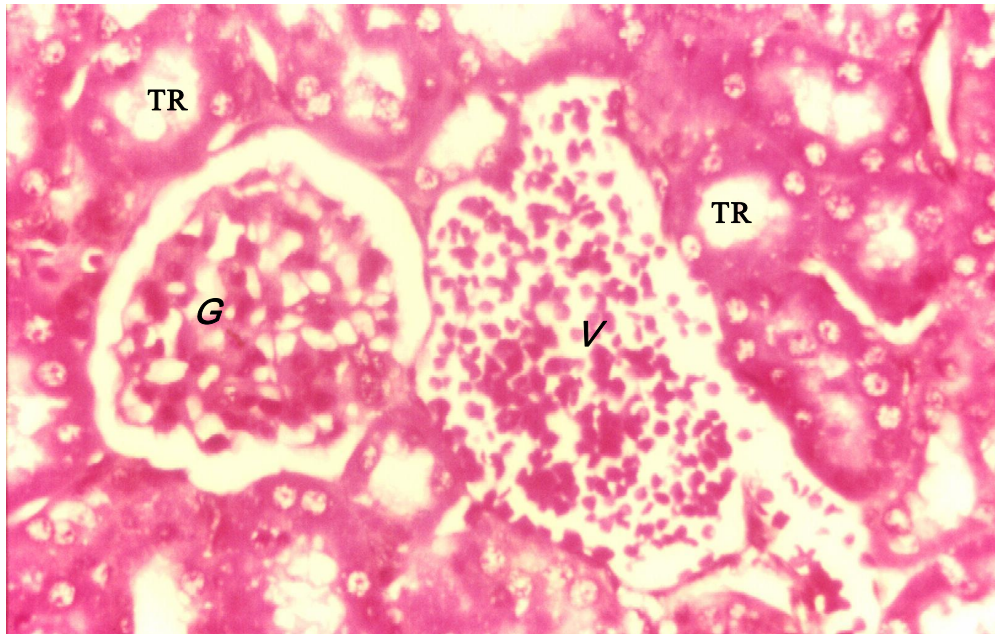


FIGURA 5. Esta imagen corresponde a un corte de riñón de una rata control donde se observa un glomérulo (G), tubulos renales (TR), y una vena (V), tejido normal. Tinción H-E (40x)

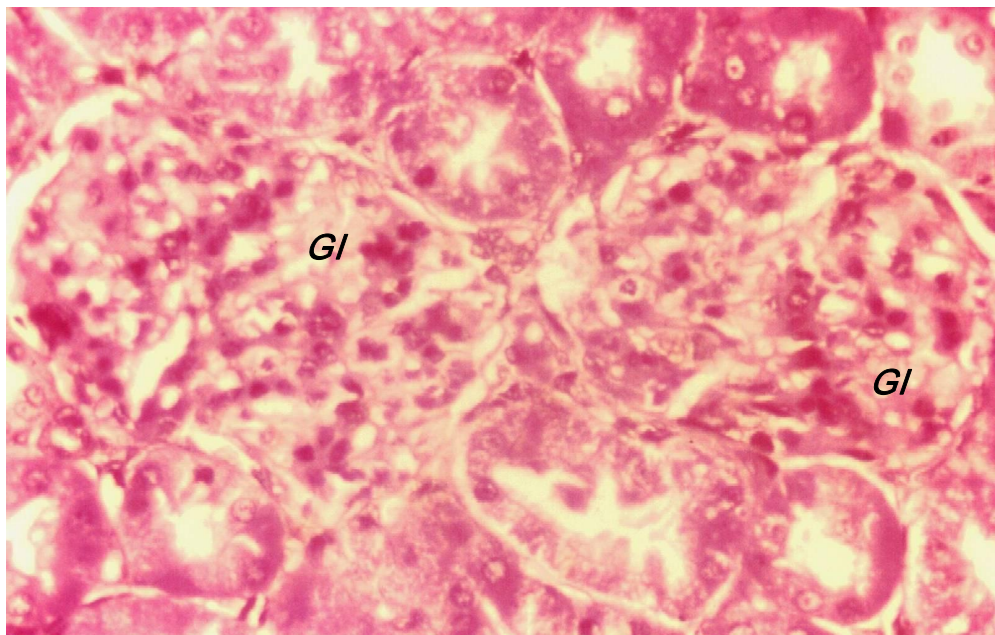


FIGURA 6. Este corte pertenece a un corte de riñón de una rata experimental donde se aprecia glomerulitis (GI) Tinción H-E (40x)

CORTES HISTOLÓGICOS DE HÍGADO

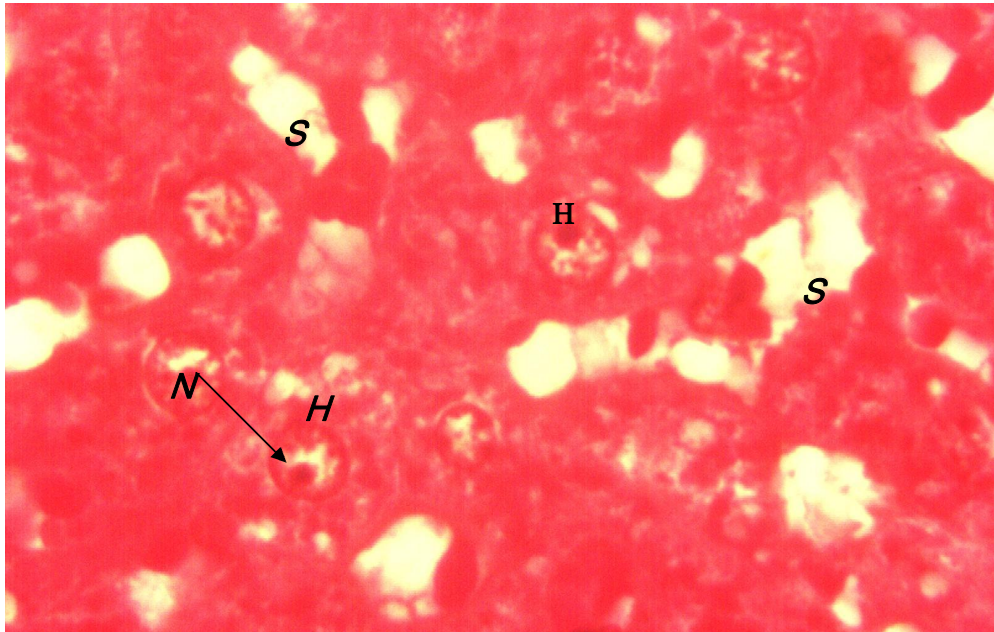


FIGURA 7. Esta imagen corresponde a un corte de hígado de una rata control; se aprecian hepatocitos (H), sus núcleos (N), y los sinusoides hepáticos (S), tejido normal. Tinción H-E (40x)

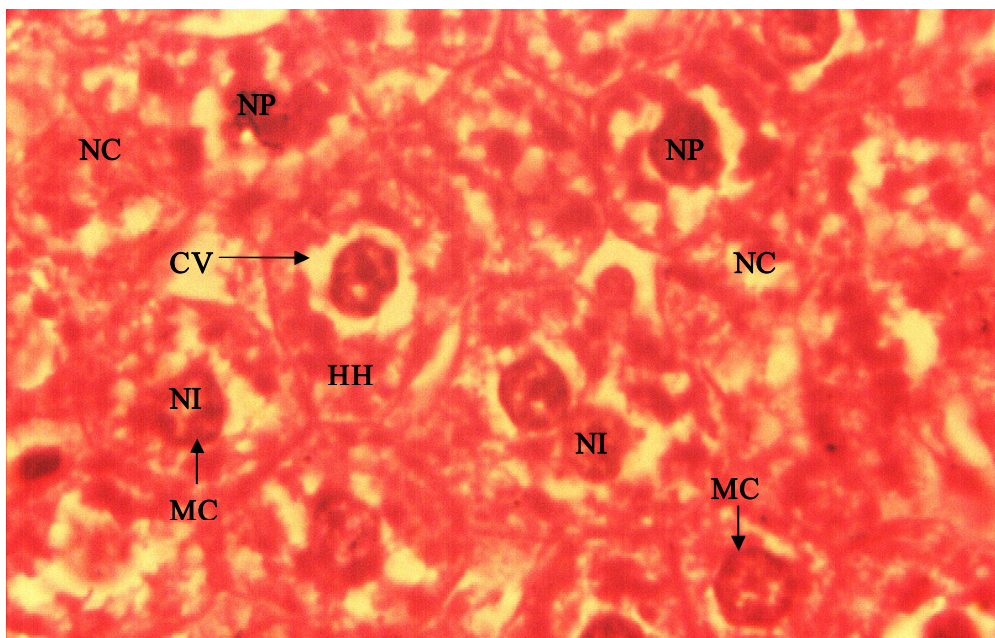


FIGURA 8. Esta imagen corresponde a un corte de hígado de una rata experimental donde se observan núcleos irregulares (NI), núcleos picnóticos (NP), citoplasma vacío (CV), marginación de la cromatina (MC), necrosis coaglativa (NC), además de que los sinusoides no son evidentes debido a los hepatocitos hinchados (HH), tinción H-E (40).

CAPITULO 11. CONCLUSIONES

Los cambios morfológicos causados por los compuestos administrados LQM 305 y LQM 309 se refirieron a una lesión orgánica con alteraciones estructurales en la arquitectura celular de los diferentes tejidos estudiados.

La revisión al microscopio muestra los daños histopatológicos causados por los compuestos LQM 305 y LQM 309 como una reacción adversa de tipo A.

Las lesiones histopatológicas encontradas con el microscopio óptico nos ayudaron a reconocer patrones de lesión celular reversibles e irreversibles esta última sólo en un órgano y en focos aislados pudiendo determinar que los compuestos son seguros a la dosis efectiva.

El tiempo de administración y las diferentes dosis administradas no influyeron en las lesiones celulares encontradas.

De acuerdo con lo obtenido se propone el seguimiento de la evaluación de las reacciones adversas de estos nuevos compuestos derivados morfolínicos del fenol mediante el uso de una vía de administración diferente como puede ser la IV, utilizando la dosis efectiva para el efecto deseado.

ANEXO 1

TÉCNICA HISTOLÓGICA

Se denomina técnica histológica al conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico (animal o vegetal) con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar examinar y analizar sus componentes morfológicos a través del microscopio. ⁽²⁹⁾

La técnica histológica comprende los diferentes métodos de estudio que se aplican en los tejidos vivos o muertos para obtener mayores detalles morfológicos de sus estructuras, e incluye los siguientes pasos:

⁽³⁰⁾

- | | |
|---------------------|--------------|
| A) TOMA DE MUESTRAS | E) INCLUSIÓN |
| B) FIJACIÓN | F) CORTE |
| C) DESHIDRATACIÓN | G) TINCIÓN |
| D) ACLARACIÓN | H) MONTAJE |

- A)** **La toma de muestras** corresponde a la obtención de tejido por el patólogo para remitirlo al departamento de anatomía patológica para su estudio. Existen diversos procedimientos que permiten obtener muestras de tejidos y órganos para conseguir preparaciones histológicas de buena calidad. Estos son:

^(29,30)

1. **Biopsia** (del griego bios = vida y ophis = visión): Consiste en la toma de un fragmento de tejido u órgano de un ser vivo.

Puede ser incisional, excisional, por sacabocado, por punción y absorción, por raspado, por trepanación.

2. Necropsia: Las muestras se obtienen de seres muertos.

(29)

TAMAÑO DE LA MUESTRA:

El tamaño de la muestra es de acuerdo al tipo de órgano.

ORGANOS PARENQUIMATOSOS: (Hígado, riñón)	0.5cm de grosor. 1.0cm de altura. 1.5cm de largo aprox.
ORGANOS TUBULARES: (Estómago, intestino delgado e intestino grueso)	2.0cm de largo y en estómago 1.0cm de lado x lado.

CONDICIONES DE LA MUESTRA:

La toma de muestra se debe realizar con el debido cuidado, utilizando pinzas, tijeras y bisturí. Se debe de evitar la mayor manipulación de los tejidos para no alterar los resultados.

El examen de los elementos vivos puede efectuarse, bien en líquidos orgánicos, en tejidos dissociables y en membranas transparentes manteniéndose en un reactivo inofensivo, o bien mediante el método de los cultos celulares.

Para el examen de tejidos privados de vitalidad se utiliza en términos generales, fijación, corte, coloración y conservación.

B) La fijación es el procedimiento cuya finalidad es detener la vida de las células e impedir modificaciones postmortem que estas pueden sufrir (procesos autolíticos); además de interrumpir el

proceso natural de lisis o descomposición celular de los tejidos al ser cortada su irrigación sanguínea; así como, endurecer el tejido de manera que pueda cortarse más fácilmente en secciones delgadas y matar todas las bacterias o gérmenes patógenos presentes, que podrían destruir el tejido; manteniendo la estructura morfológica de las células y de los tejidos, sin que ocurran cambios notables en ellos. Esto se consigue inmovilizando las moléculas proteínicas haciéndolas insolubles e inhibiendo principalmente las enzimas, que de otro modo iniciarían la autodigestión o autólisis y conducirían a la degeneración postmortem. La inmovilización (fijación) de las proteínas se produce por coagulación o precipitación de las mismas; por medio de un agente químico o una mezcla de ellos, se detiene el metabolismo celular y se conserva la estructura celular para su futuro tratamiento, al coagular las proteínas que abundan en células y tejidos. Los fijadores químicos establecen enlaces cruzados entre moléculas de proteínas o las desnaturalizan y precipitan al sustituir el agua que llevan consigo, lo que endurece al tejido.

(26,27,30)

Toda esta actividad la realizan los agentes químicos denominados fijadores, que se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- 1) OXIDANTES: Como el tetraóxido de osmio (ácido ósmico), el bicromato de potasio, ácido crómico, bicloruro de mercurio, ácido pícrico, ácido acético y otros.
- 2) REDUCTORES: Como el formaldehído, el glutaraldehído, el alcohol metílico, entre otros.

Los fijadores son sustancias químicas que generalmente se emplean diluidas y que, de acuerdo con su estado físico, pueden ser:

- **Gaseosos:** como el formaldehído
- **Líquidos:** como el ácido acético, el alcohol etílico o la acetona
- **Sólidos:** como el bicloruro de mercurio o el bicromato de potasio entre otros.

(29)

Se han desarrollado diversas técnicas para preparar los tejidos para su estudio, de modo que se parezcan muy de cerca a su estado viviente natural, así la rapidez en la acción del fijador es esencial, por lo que la perfusión a través de los canales vasculares es preferible a la sola inmersión de los tejidos en el fijador.

Fijación por perfusión.- que se puede aplicar a animales de experimentación. Se inyecta el fijador en el torrente sanguíneo del animal vivo anestesiado y el fijador llega por vía hematogena rápidamente a todo el tejido; de esta manera se logra que el fijador llegue a todas las células de un órgano completo en forma casi instantánea después de interrumpir la administración de oxígeno y se obtiene una fijación más rápida y uniforme.

CONDICIONES IDEALES DE UN BUEN FIJADOR: Debe ser fácil de conseguir y de manipular, no disolver componentes celulares, producir cierta dureza a los tejidos sin que provoque excesiva retracción o llegue a hacerlos quebradizos y friables, y ser de bajo costo. (29)

Las soluciones fijadoras se emplean solas, como fijadores simples, o asociándolas entre sí para formar los fijadores compuestos (mezclas fijadoras), que son las que se usan con mayor frecuencia. Un ejemplo de fijador simple lo representa el formol o formalina. Se lo emplea en una solución al 10% (10 partes de formol comercial y 90 partes de agua).

Algunos ejemplos de fijadores compuestos o mezclas fijadoras son: formol-fosfato (formol amortiguado), formol-bicloruro de mercurio, formol-cloruro de calcio, líquido fijador de Boüin, líquido fijador de Zenker, líquido de Zenker, fijador de Carnoy. ⁽²⁹⁾

Los agentes fijadores empleados con mayor frecuencia para la microscopia de luz son formaldehído amortiguado neutro y líquido fijador de Boüin. Ambas sustancias se fijan de manera cruzada con las proteínas, por lo que conservan una imagen de tejido como si estuviera vivo, aunque el más utilizado es el reactivo de Boüin.

REACTIVO DE BOÜIN

Mezcla que contiene ácido pícrico, ácido acético y formol; se trata de las mezclas más empleadas y a menudo se designa con el nombre de fijador corriente.

El líquido de Boüin (1902) de uso más común; destruye el condrioma, aparato de golgi, y los lípidos, pero conserva la cromatina; después de este tipo de fijación las reacciones nucleares son muy difíciles de conseguir, por lo cual son malos fijadores citológicos, sin embargo estas mezclas preparan muy bien los tejidos para emplear los métodos generales. Las piezas pueden tener tamaños considerables por lo que este fijador es el

indicado para el estudio morfológico y de anatomía microscópica; así también penetra bastante bien con lo cual las piezas pueden ser relativamente gruesas, no son probables fenómenos de fijación por lo que las piezas pueden mantenerse como máximo en el fijador hasta 48 horas. ⁽³¹⁾

Tras la fijación no se requiere ningún lavado acuoso; según algunos autores el agua tendría una acción desastrosa, lo cual es discutible. Cuando al ácido pícrico dificulta las tinciones posteriores puede eliminarse el exceso pasando las piezas a alcohol del 95%, o bien sometiendo los cortes a una solución de alcohol de 70% ⁽³¹⁾

- C) **La deshidratación** tiene como fin eliminar el agua intra y extracelular de los tejidos, así como el excedente de fijador. Se utiliza una serie graduada de baños sucesivos de alcohol etílico iniciando con una concentración de 70% y progresan en etapas graduadas hasta alcohol al 100% para retirar el agua. La duración del tiempo de deshidratación dependerá del tamaño y naturaleza de los tejidos y de la cantidad de agitación en cada grado de alcohol.

⁽³⁰⁾

- D) **La aclaración** permite eliminar el alcohol de los tejidos sustituyéndolo por una sustancia soluble con la sustancia de inclusión, en el paso siguiente; el líquido diafanizador que se emplea con más frecuencia es el xilol.

⁽³⁰⁾

- E) **La inclusión** proporciona al tejido consistencia y un medio de soporte que permita al micrótomo cortar la muestra; ya que los tejidos fijados adquieren cierta consistencia y dureza, que es la suficiente para que de ellos se puedan obtener secciones

delgadas, que al ser atravesadas por los rayos luminosos del microscopio ofrezcan la imagen adecuada de sus componentes, esto se consigue cuando las muestras adquieren la consistencia adecuada que facilite mediante el filo de una navaja, hacer laminas sumamente delgadas y transparentes, infiltrando los tejidos en sustancias de inclusión que tienen la propiedad de incorporarse en el interior de los tejidos y entre sus componentes más pequeños con la finalidad de servirles de soporte. Existe una serie de sustancias de inclusión que se han empleado o que se utilizan actualmente. Unas son solubles en agua (gelatina, carbowax, metacrilato de glicol); otras solubles en solventes orgánicos (parafina, celoidina, resinas epóxicas)

(29,30)

Los pasos previos a seguir para la inclusión de las muestras son:

- DESHIDRATACIÓN
- ACLARACIÓN O DIAFANIZACIÓN (impregnación en el solvente)
- INCLUSIÓN Y FORMACIÓN DEL BLOQUE

(29)

INCLUSIÓN Y FORMACIÓN DEL BLOQUE

La selección del material de inclusión es un paso fundamental. El método de embebimiento ordinario es el de la parafina.

METODO DE CERA PARAFINADA

La cera parafinada quizá constituye el material más común usado para incluir tejidos; es una sustancia que resulta de la mezcla de hidrocarburos saturados provenientes de la destilación del petróleo. Tiene la útil propiedad de ser sólida y razonablemente dura a la temperatura ambiente, pero se licua al ser calentada. Puede obtenerse como cera parafinada pura o con aditivos que hacen menos probable que se desmorone, siendo por lo tanto más fácil hacer cortes delgados. Mientras más alto es el punto de fusión de las ceras más fáciles son de cortar. (32)

Antes de incluir a los tejidos en las ceras, deberán de ser deshidratados a través de su paso por grados ascendentes de alcohol después de su fijación. Es necesario expresar que los tejidos deberán estar debidamente deshidratados, pero se evitará la permanencia prolongada en los grados elevados de alcohol ya que se endurecen los tejidos, volviéndose difíciles de cortar. (32)

Después de su deshidratación, los tejidos deberán de ser depurados, transferidos a cualquier líquido que sea miscible con alcohol absoluto y cera parafinada caliente. Cuando los tejidos han sido depurados, son colocados en la cera fundida; es importante que todo el agente depurante haya sido eliminado y que los tejidos estén meticulosamente incluidos en la cera.

Para ayudar en la remoción del agente depurante y mejorar la impregnación. El tejido no deberá permanecer en la parafina caliente más de lo necesario o se enjutará o endurecerá. (32)

La inclusión o formación del bloque de parafina se efectúa empleando una serie de moldes de diversos materiales, así como de diferentes áreas y profundidades; pueden ser de metal, papel o plástico. El bloque de parafina que se forme debe ser de tamaño apropiado para que contenga la muestra correctamente orientada y así facilitar la obtención de las secciones o cortes. ⁽²⁹⁾

- F) **Los cortes** o secciones delgadas se obtienen utilizando instrumentos mecánicos diseñados para que, en forma más o menos automática, seccione el bloque de parafina en cortes delgados y de grosor uniforme. El cumplimiento de esta condición se consigue con ciertos aparatos llamados **micrótomos**, cuya función es la ejecución de cortes finos, regulares, extensos y abundantes de los tejidos u órganos. ⁽²⁹⁾

Muy numerosos son en la actualidad los modelos de micrótomos usados en los laboratorios, pero considerando el mecanismo mediante el cual impulsan el objeto seccionable, casi todos caen en la categoría de micrótomos de deslizamiento. Estos micrótomos tienen variaciones en precisión, automatismo, tamaño, etc., y pueden ser muy específicos de acuerdo al material de inclusión. ⁽²⁶⁾

Existen dos micrótomos que se consideran más útiles en la práctica histológica el micrótomo para cortes por parafina y el de cortes por congelación.

- G) **La tinción** es importante para la diferenciación y contraste de las estructuras del tejido en estudio. ⁽³⁰⁾

Se ha establecido que los diversos elementos de los tejidos poseen, un índice de refracción casi igual, de modo que su diferenciación óptica es difícil; el hecho de que las imágenes

que dan las preparaciones coloreadas son más fáciles de interpretar que las imágenes dadas por las preparaciones incoloras, esto nos revela la importancia que tiene en la técnica histológica la tinción, para el estudio morfológico de células y tejidos. ⁽²⁶⁾

La coloración es la propiedad que poseen ciertos cuerpos de ejercer sobre la luz una absorción selectiva, es decir que un cuerpo aparece coloreado por que transmite, por transparencia o difusión, las radiaciones complementarias de aquellas que absorbe.

Un colorante es un cuerpo coloreado que puede comunicar su coloración a otros cuerpos. Se sabe que existe una relación entre la constitución de las sustancias y la absorción selectiva de radiaciones que producen el color; cualquier configuración de la molécula que produce absorción de la luz se denomina cromófila y el grupo general se denomina cromóforo. ⁽²⁶⁾

La clasificación de los colorantes desde el punto de vista químico estará dada por los grupos cromóforos, los cuales se dividen en dos grupos: **los ácidos y los básicos**.

En la práctica existen dos tipos de colorantes, unos que se unen directamente a los tejidos y otros que necesitan intermediarios, es decir se unen indirectamente.

Las **coloraciones directas** son aquellas que se producen simplemente por inmersión en el baño colorante y se denominan también coloraciones sustantivas.

En las **coloraciones indirectas** es necesario que el objeto a colorear sea tratado previamente con otra sustancia que lo prepara para recibir el colorante, a esta sustancia intermedia se le llama **mordente**; también se les llama **coloraciones adjetivas o**

por mordanza. La combinación que el mordente forma con el colorante se denomina laca.

Se ha discutido mucho sobre la interpretación del fenómeno de las tinciones, sin llegarse a un acuerdo satisfactorio y que se aplique a todos los casos, por lo que actualmente se tiende más a considerar a las coloraciones como fenómenos muy complejos, en los cuales las acciones físicas y químicas son cinérgicas.

Por su origen los colorantes se clasifican en dos grupos: **los naturales y los artificiales.**

COLORANTES NATURALES

Son extraídos de productos animales y vegetales como el carmín, la hematoxilina, la orceína, el tornasol, etc.

Estos colorantes tienen poca importancia en la actualidad porque la mayor parte de estos, son preparados sintéticamente.

(26,34)

COLORANTES ARTIFICIALES

Son conocidos también como colorantes de anilina, de carbón o sintéticos. De acuerdo a la naturaleza de su cromóforo pueden ser: colorantes nitrados, azoicos, oxiquinonas, quinona-oxinas, quinona-imidas, fenilmetanos, quinoleínas, acridinas, tiazoles, oxicetonas, xantonas y flavonas.

Estos colorantes corresponden casi a la totalidad de los colorantes usados en la técnica microscópica. (26,34)

Existe otra clasificación de acuerdo a Ehrlich que los ha dividido en dos grupos según sus afinidades para el núcleo y el citoplasma: **nucleares o básicos** cuando el compuesto colorante es una base y **citoplásmicos o ácidos** cuando el compuesto

colorante es un ácido. También distingue a los colorantes neutros, en los cuales la base y el ácido son coloreados, como el pícato de azul de metileno.

No todos los colorantes pueden servir indistintamente a la técnica histológica, por lo que los métodos de coloración se dividieron en categorías de acuerdo a las relaciones entre el colorante y los tejidos en: **coloraciones generales y específicas, directas e indirectas, progresivas y regresivas, panópticas, en bloque, impregnaciones metálicas, simples y combinadas.** ⁽²⁶⁾

Las coloraciones combinadas pueden ser practicadas haciendo actuar diversos colorantes, ya sea sucesiva o simultáneamente. En las coloraciones sucesivas cada colorante simple puede actuar independientemente y fijarse sobre un elemento dado, como en las coloraciones de **hematoxilina-eosina.** ⁽³⁰⁾

HEMATOXILINA-EOSINA

La coloración de **hematoxilina – eosina** está considerada como la técnica de tinción de uso más frecuente en el estudio de células y tejidos por medio del microscopio fotónico. Consiste en la tinción de los núcleos mediante una hematoxilina previamente oxidada y transformada en hemateína, a la que se le añade una sustancia mordente para formar laca (para tal fin se utilizan sales metálicas de aluminio, plomo o hierro) Los núcleos se colorean de azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro, dependiendo de los agentes oxidantes y mordientes que se

utilizaron. A continuación se colorea el citoplasma y el material extracelular utilizando la eosina que le confiere diversos grados de color rosado. ⁽²⁹⁾

H) El montaje consiste en reservar los cortes teñidos indefinidamente para observarlos cuantas veces sea necesario, aplicados a la superficie de una laminilla o portaobjetos. ⁽³⁰⁾

Para la conservación de las preparaciones se utilizan resinas sintéticas o el bálsamo de Canadá. Estos reactivos deberán reunir algunos requisitos:

- a. Ser miscibles con el último líquido usado.
- b. Mantener el cubreobjetos en su lugar.
- c. Tener un índice apropiado de refracción.
- d. No permitir el crecimiento de mohos ni diluir la tinción usada.
- e. No deberá enjutar ni cristalizar el tejido al secarse.
- f. Preservar el tejido en un estado de depuración y ser lo más incoloro que sea posible. ⁽³²⁾

I) La observación al microscopio se puede realizar en los laboratorios de diagnóstico e investigación en áreas tan diversas como bacteriología, micología, histología, patología, y otras más. El microscopio fotónico es un apoyo fundamental para establecer el diagnóstico preciso de diferentes daños como

afecciones, procesos degenerativos y neoplásicos; estas y otras aplicaciones más hacen necesario para el estudio.

El microscopio se trata de un instrumento óptico que proporciona imágenes amplificadas y detalladas de estructuras no visibles a simple vista. Los microscopios se clasifican en simples que son aquellos que están constituidos por una sola lente y en compuestos o integrados que son aquellos constituidos por dos o más lentes. Precisamente se conocen como fotónicos o de "luz" a los microscopios compuestos, que usan como fuente luminosa luz blanca o ultravioleta.

Se conocen varios tipos de microscopios fotónicos según el tipo de luz e iluminación que utilicen y así está disponible el de **campo oscuro, contraste de fases, fluorescencia, luz polarizada, estereoscopia e interferencias de Normarski y Jamin Lebedeff.** ⁽³⁰⁾

El uso del microscopio óptico funciona en forma óptima cuando los trayectos de los haces de iluminación y la observación están centrados y tienen un ajuste correcto. El uso de ajustes y alineaciones adecuados, contribuye sustancialmente al reconocimiento de detalles muy diminutos de la muestra y a la fiel manifestación de los colores para la visión directa o la microfotografía. ⁽¹¹⁾

La iluminación Koehler es una de las claves de la buena microscopia y está incorporada en el diseño de casi todos los microscopios modernos que se usan en laboratorios o para la investigación. Los ajustes necesarios para conseguir una buena iluminación Koehler son pocos y sencillos. Los pasos a seguir son:

- Enfocar la muestra.
- Cerrar el diafragma de campo.

- Enfocar el condensador, moviéndolo hacia arriba o hacia abajo hasta que el contorno de su diafragma aparezca bien nítido.
- Centrar el diafragma de campo con los controles de centrado de la subplatina (donde está el condensador) Luego abrir el diafragma de campo hasta que cubra todo el campo observado.
- Retirar el ocular y observar la pupila de salida del objetivo. Se verá un campo circular iluminado cuyo radio es directamente proporcional a la apertura numérica del objetivo. A medida que se cierra el diafragma del condensador, su contorno aparece dentro de este campo circular. Para la mayoría de los preparados teñidos se debe cerrar el diafragma del condensador hasta cubrir aproximadamente dos tercios de la apertura del objetivo. El resultado de este ajuste es la avenencia máxima entre resolución y contraste.

BIBLIOGRAFÍA:

- 1.** PELTA F. REACCIONES ADVERSAS MEDICAMENTOSAS, VALORACIÓN CLÍNICA. DÍAZ DE SANTOS. MADRID. (1992) PÁGS. 3-13.
- 2.** REMINGTON. FARMACIA. 19ª.ED. TOMO I. MEDICA PANAMERICANA. BUENOS AIRES. (1998) PÁGS. 83-93, 611-623, 1126-1145.
- 3.** URIBE E. TRATADO DE MEDICINA INTERNA. 2ª.ED. TOMO I. PANAMERICANA. MÉXICO. (1995) PÁGS. 837-843.
- 4.** KATZUNG B. G. FARMACOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA. 3ª.ED. EL MANUAL MODERNO. MÉXICO. (1987) PÁGS. 47-54.
- 5.** LITTER. FARMACOLOGÍA EXPERIMENTAL Y CLÍNICA. 7ª.ED. EL ATENEO. BUENOS AIRES. (1988) PÁGS. 3-13.
- 6.** HAROL K. PRINCIPIOS DE FARMACOLOGÍA MÉDICA. 6ª.ED. OXFORD UNIVERSITY PRESS. MÉXICO. (1998) PÁGS. 777-795.
- 7.** JUNQUEIRA. HISTOLOGÍA BÁSICA. SALVAT EDITORES. BARCELONA. (1973). PAGES. 1-4, 11-14.
- 8.** ARRAZOLA S. M. FARMACOLOGÍA APLICADA FORMACIÓN CONTINUADA. LOGOS S. L. (2001) PÁGS. 241-257.
- 9.** HOLTZMAN E. ESTRUCTURA Y DINAMICA CELULAR. 3ª. ED. INTERAMERICANA. MÉXICO. (1986) PÁGS. 5-12.
- 10.** KATZUNG B. G. FARMACOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA. EL MANUAL MODERNO. MÉXICO. (1984) PÁGS. 773-778.
- 11.** ROSS/ROMRELL/KAYE. HISTOLOGÍA TEXTO Y ATLAS COLOR. 3ª.ED. PANAMERICANA. MÉXICO. (1997) PÁGS. 1-8, 16,17.
- 12.** CORMACK. HISTOLOGÍA DE HAM. 9ª. ED. HARLA. MÉXICO. (1988). PAGES.10-23.
- 13.** HAM A. W. TRATADO DE HISTOLOGÍA. 4ª. ED. INTERAMERICANA. (1963) PÁGS. 4-10.

14. LESSON. HISTOLOGÍA. 4º. ED. INTERAMERICANA. MÉXICO. (1984) PÁGS. 6-14.
15. LITTER. COMPENDIO DE FARMACOLOGÍA. 4º. ED. EL ATENEO. BUENOS AIRES. (1992) PÁGS. 1-4.
16. UNAM. MANUAL DE BIOQUÍMICA CELULAR. FES-CUAUTITLAN. CD. UNIVERSITARIA. MÉXICO. (1993) PÁGS. 84-86.
17. UNAM. GUÍA PRÁCTICA PARA EL MANEJO DE ANIMALES DE LABORATORIO. FES-CUAUTITLAN. CD. UNIVERSITARIA. (1993) PÁGS. 45-60.
18. KATZUNG B. G. FARMACOLOGÍA BÁSICA Y CLÍNICA. 8º.ED. EL MANUAL MODERNO. MÉXICO. (2002) PÁGS. 81-87.
19. FLORES J. FARMACOLOGÍA HUMANA. 2º.ED. SALVAT. BARCELONA. (1992) PÁGS. 1-3, 63-73, 172, 173, 145-153.
20. BOWMAN WC. FARMACOLOGÍA. JIMS. (1970) PÁGS. 427-432, 507-509, 524-541.
21. FLORES H. A. CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE DERIVADOS MONO Y BIS (1-PIPERIDINILMETIL) SUSTITUÍDOS. TESIS. UNAM. FES-C. (1996)
22. FAWCETT. M. D. TRATADO DE HISTOLOGÍA. 12º.ED. INTERAMERICANA Mc GRAW-HILL. MÉXICO. (1995) PÁGS.103, 104, 655-673.
23. GARTHER L. P. HISTOLOGÍA TEXTO Y ATLAS. Mc GRAW-HILL. MÉXICO. (1997) PÁGS. 222-226, 252-255.
24. GANONG. FISIOPATOLOGÍA MÉDICA, INTRODUCCIÓN A LA MEDICINA CLINICA. 3º.ED. EL MANUAL MODERNO. MÉXICO. (2001). PÁGS. 438-440.
25. BLOOM – FAWCETT. COMPENDIO DE HISTOLOGÍA. Mc GRAW-HILL INTERAMERICANA. MEXICO. (1999) PÁGS. 675-696.
26. ESTRADA F. E. ET. AL. MANUAL DE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS. AGT EDITOR. MEXICO. (1982) PÁGS. 38-56.

- 27.** MERCADO A. N. FHYC. RECOPIACION BIBLIO-HEMEROGRAFICA SOBRE FARMACOS POTENCIALMENTE HEPATOTOXICOS. TESIS. UNAM. FES-C. (2000) PÁGS. 1-5, 10-13.
- 28.** GONZALEZ P. M. FHYC. NEFROTOXICIDAD COMO REACCION ADVERSA A MEDICAMENTOS. TESIS. UNAM. FES-C. (2000) PÁGS. 7-20.
- 29.** VILORIA C. M. MANUAL DE LABORATORIO DE HISTOLOGIA. EDINOVA. JALISCO. (1999) PÁGS. 5-9.
- 30.** FORTUOL V. T. LA PRACTICA HISTOLOGICA. MANUALES DEPARTAMENTALES. Mc GRAW-HILL. UNAM. MEXICO. (1998) PÁGS. 11-14.
- 31.** MARTOJA. TECNICAS DE HISTOLOGIA ANIMAL. MASSON. BARCELONA. (1970) PÁGS. 10, 11, 309.
- 32.** GRAY. LO ESENCIAL DE LA MICROTOMIA. EL MANUAL MODERNO. MEXICO. (1976) PÁGS. 83-110.
- 33.** WINDLE W. F. HISTOLOGIA. 5ª. ED. Mc GRAW-HILL. MEXICO. (1977) PÁGS 1-3, 428-441.
- 34.** FIORE. DIAGNOSTICO HISTOLOGICO. TOMO I. EL ATENEO. MEXICO. (1963) PÁGS. 98-112.
- 35.** PEREZ. PATOLOGIA MOLECULAR SUBCELULAR Y CELULAR. LA PRENSA MEDICA MEXICANA. D. F. (1975) PÁGS. 643-649.
- 36.** VELASCO A. Y COLS. FARMACOLOGIA FUNDAMENTAL. INTERAMERICANA. MADRID. (2003) PÁGS. 61-75, 81-85.
- 37.** HERNANDEZ B. C. INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL DE LAS REACCIONES ADVERSAS PROVOCADAS POR IBUPROFENO, KETOPROFENO Y NAPROXEN EN RATAS LONG-EVANS. TESIS. UNAM. FES-C. CUAUTITLAN IZCALLI. (1993) PÁGS. 58-70, 89-91.
- 38.** ESPALSA-CALPE. ENCICLOPEDIA UNIVERSALILUSTRADA. EUROPEO-AMERICANA. TOMO 23. MADRID. (1973) PÁGS. 680-682, 684.
- 39.** TRUE/DREISBACH. MANUAL DE TOXICOLOGÍA CLÍNICA DE DREISBACH. PREVENCIÓN, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO. 7ª. ED. EL MANUAL MODERNO. MÉXICO. (2003) PÁGS. 370-371.

40. FRIMMER. FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA VETERINARIA. ACRIBIA. ZARAGOZA. (1973) PÁGS. 203, 204.
41. ROBBIN'S. PATOLOGÍA HUMANA. 7ª ED. ELSEVIER. MADRID (2004) PÁGS. 33-40
42. COTRAN & COLS. PATOLOGÍA ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL 6ª ED. INTERAMERICANA. MÉXICO. (2000) PÁGS. 1-20, 53-55, 89-91.
43. RUBIN & COLS. PATOLOGÍA MÉDICA. PANAMERICANA. MÉXICO (1990) PÁGS. 4, 13, 33, 35, 53-55
44. CHEVILLE. PATOLOGÍA CELULAR. ACRIVIA. ZARAGOZA. (1980) PÁGS. 1-13.
45. STEVENS A. ANATOMÍA PATOBIOLOGÍA. 2ª ED. HARCOURT. MADRID (2001) PÁGS 23-33.
46. LA VÍA. INTRODUCCIÓN A LA PATOBIOLOGÍA GENERAL. 2ª ED. EL MANUAL MODERNO. MÉXICO. (1977) PÁGS 8-35.
47. REMINGTON. FARMACIA. TOMO 1. 20ª ED. MÉDICA PANAMERICANA. MADRID. (2003) PÁGS. 146-167.
48. CHANDRASOMA. PATOLOGÍA GENERAL. EL MANUAL MODERNO. MÉXICO. (1999) PÁGS. 1-5
49. LARA O. M. I. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA DE LOS COMPUESTOS DIMORFOLÍNICOS EN LE MODELO DE RATA ANESTESIADA. TESIS. UNAM. FES CUAUTILÁN IZCALLI. (2003) PÁGS. 30-35.
50. WAYNE W. D. BIOESTADÍSTICA. 4ª ED. LIMUSA WILEY. MÉXICO. (2002) PÁGINAS 250,251.
51. WHEATER'S. HISTOLOGÍA FUNCIONAL. TEXTO ATLAS EN COLOR. 4ª ED. ELSEVIER. MADRID. (2000) PÁGS 92, 215
52. IGLESIAS B. BASES DE LA FISIOLOGÍA. TEBAR DE CASA. MARES. S. L. PÁGS. 265, 301.
53. GENESER F. HISTOLOGIA SOBRE LAS BASES BIOMOLECULARES. 3ª ED. PANAMERICANA. BUENOS AIRES. (2000) PÁGS. 1, 2, 19.
54. GARTNER L. P. TEXTO ATLAS DE HISTOLOGIA. 2ª ED. Mc GRAW-HILL. MEXICO. (2002) PÁGS. 408, 411, 412.

- 55.** TORTORA/GRABOWSKI. ANATOMIA Y FISILOGIA. 9ª ED. OXFORD. MEXICO. (2002) PÁGS. 850-851.
- 56.** SMITH R. FARMACOLOGÍA. MEDICA PANAMERICANA. MÉXICO. (1997) PÁGS. 867.