

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DEL 2, 2, 2-TRIBROMOETANOL
EN RATA (*Rattus norvegicus*) Y RATÓN (*Mus musculus*), TRAS
LA APLICACIÓN ÚNICA POR VÍA INTRAPERITONEAL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

LUIS SANTERVAS SINDE



MÉXICO, D.F.

2008



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.

JURADO ASIGNADO

PROFESORES

Presidente

Prof. Elia Brosla Naranjo Rodríguez

Vocal

Prof. Ana María Vázquez Álvarez

Secretario

Prof. Atonatiu Edmundo Gómez
Martínez

1º. Suplente

Prof. Martha Leticia Jiménez Prado

2º. Suplente

Prof. Alejandro Ortiz Osornio

Sitio donde se desarrollo el tema:

- Bioterio 5º. Piso Edificio "A". Facultad de Química. UNAM
- Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM

Asesor del Tema

M.V.Z. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez

Supervisor Técnico

M.V.Z. José Ramírez Lezama

Sustentante

Luis Santervas Sinde

DEDICATORIA

A mi padre

Gracias, por todo el apoyo que siempre me brindaste, el cariño, el amor, la dulzura, la sabiduría y los momentos felices que siempre pasamos juntos, has de saber lo mucho que te extraño y te necesito, así como necesito de tu presencia y de tus sabios consejos.

Hoy es un día muy especial, has de ver la culminación de mi carrera; carrera la cual está dedicada a ti especialmente, por el esfuerzo que siempre desempeñaste en mí y el aliento que siempre me diste cuando más lo necesitaba. Te amo y te pido me des sabiduría y fuerzas para seguir adelante y cumplir todas mis metas.

GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

A mi madre

Que día con día has sufrido noches de desvelo, mis malos y buenos humores por la escuela, y todos esos detalles; que siempre has estado pendiente de mí, que siempre has dedicado tu vida a mi cuidado y de que nada me falte, que has sido un ejemplo de lucha, entereza y fortaleza. Gracias, por saber comprenderme en los momentos difíciles, por ser fuerte cuando más lo necesitaba, por haberte convertido en mas que una madre en el pilar que dio firmeza a mi vida, por tus valiosos y sabios consejos, gracias por todo eso.

A mi Hermano

Gracias por ser más que un hermano un amigo, un aliado y un confidente – aunque no lo creas–, gracias por compartir conmigo tus conocimientos, apoyarme y escucharme en los momentos que lo he necesitado.

A la profesora Gloria Gutiérrez Piña

A usted que por sus experiencias, la forma de enseñarme y de contribuir con sus conocimientos en la QUÍMICA crearon en mí el interés para estudiarla y dedicarme a ella haciéndola parte fundamental de mi vida.

A mis sinodales

A ustedes que me dieron orientación, guía y ánimo para llevar a cabo la realización de este trabajo; y que sin sus valiosos comentarios, correcciones y ayuda no se vería hoy realizado. En especial a Ruth y Atona que me apoyaron y brindaron de todas las posibilidades existentes en el momento más difícil para volver a iniciar mi trabajo de tesis y que nunca dejaron que me rindiera. Además de un súper agradecimiento a Ppton y al laboratorio de Histopatología de la Facultad de Veterinaria quienes con su participación en este trabajo, me ayudaron y brindaron de sus conocimientos para poder decir que al fin ¡¡¡HOY!!! me titulo.

A Roy, Andy, Monse

Que en las buenas y en las malas siempre me han apoyado y brindado de su cariño incondicional; que han deseado compartir su tiempo conmigo y han estado ahí para escucharme y animarme –miles de veces–; y que aunque no tenemos mucho de conocernos puedo afirmar que los momentos que hemos pasado juntos han sido geniales e inolvidables y espero seguir contando con su amistad y más. Los Ai Lov Yu Tu Moch.

A Angie, Bere, Cris, Gaby, Gina, Vicky y Viole.

Con uds compartí los mejores momentos dentro de mi ámbito estudiantil y con quienes puedo decir pasamos momentos buenos y malos, gratos e inigualables; angustiosos exámenes –vdd Angie–, laboriosos trabajos de investigación en equipos –jajaja– y demás peripecias que vivimos dentro de nuestra segunda casa la facultad. Saben además que siempre podrán contar conmigo. LAS QUIERO MUCHO.

A Erika, Myrna y Wendy

A las famosísimas “*rateras del Bioterio*”, quienes estuvieron presentes no sólo física sino también intelectualmente en la elaboración de este proyecto; que con su ayuda y *expertis* en el manejo de los animales de laboratorio se pudo concluir este experimento. Por supuesto, las maravillosas experiencias compartidas con uds son inolvidables y que me hicieron más fácil y alegre la conclusión de este trabajo por su ingenio y buen humor.

A la UNAM y la Facultad de Química

Mi segunda casa, mi casa fuera de casa donde pasé tanto tiempo, a quien le debo mi preparación, excelente formación, fuente de conocimientos y sabiduría; a quien prometo poner siempre en alto y enorgullecerla con mis méritos y logros académicos y laborales.

A todos los que se me olvidan

GRACIAS

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁG.
Lista de Abreviaturas.....	8
Lista de Tablas.....	9
Lista de Figuras.....	10
Capítulo 1	
INTRODUCCIÓN	11
Capítulo 2	
ANTECEDENTES	12
2.1 Tribromoetanol.....	12
2.1.1 Características físico-químicas.....	12
2.1.2 Caracterización del tribromoetanol.....	12
2.1.3 Uso como anestésico en la investigación biomédica.....	15
2.1.4 Farmacocinética y farmacodinamia.....	15
2.1.5 Factores que modifican la respuesta farmacológica.....	16
2.1.5.1 Género.....	17
2.1.5.2 Relojes biológicos.....	19
2.1.5.3 Reloj interno.....	20
2.1.5.4 Ritmo circadiano.....	21
2.1.6 Toxicidad y reacciones adversas.....	22
2.2 Animales utilizados en la experimentación.....	23
2.2.1 Rata (<i>Rattus norvegicus</i>).....	24
2.2.2 Ratón (<i>Mus musculus</i>).....	25
2.3 Histopatología.....	26
2.3.1 Histotécnicas.....	26
2.3.2 Tinción Hematoxilina-Eosina.....	27
2.3.3 Principales órganos de estudio histopatológico.....	28
2.3.4 Corazón.....	28
2.3.5 Cerebro.....	29
2.3.6 Bazo.....	30
2.3.7 Tracto gastrointestinal.....	31
2.3.8 Riñón.....	32
2.3.9 Pulmón.....	33
2.3.10 Hígado (Órgano blanco del 2,2,2-Tribromoetanol).....	35

2.4 Biotransformación de fármacos.....	37
2.4.1 Fase I.....	38
2.4.1.1 Reacciones de oxidación.....	38
2.4.1.2 Reacciones de reducción.....	39
2.4.1.3 Reacciones de hidrólisis.....	39
2.4.2 Fase II.....	39
Capítulo 3	
OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo General.....	41
3.2 Objetivo Particular.....	41
Capítulo 4	
HIPÓTESIS	42
Capítulo 5	
MATERIAL Y MÉTODO	43
5.1 Material, reactivos y equipo.....	43
5.2 Metodología.....	45
5.2.1 Experimento A (administración en ratas).....	45
5.2.3 Experimento B (administración en ratones).....	48
Capítulo 6	
RESULTADOS	51
Capítulo 7	
ANÁLISIS DE RESULTADOS	57
Capítulo 8	
CONCLUSIONES	60
ANEXOS	61
GLOSARIO	62
Capítulo 9	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

Lista de Abreviaturas

'	minutos
AAG	glicoproteína alfa-1 ácido
ADN	ácido desoxirribonucleico
β_1	receptor tipo β_1
Br	bromo
C	carbono
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
cc	centímetros cúbicos
cm	centímetros
cm^{-1}	centímetros a la menos uno
CAS	chemical abstract service (por sus siglas en inglés)
EtOH	etanol
g	gramos
GABA	ácido gama amino butírico
GABA _A	receptor al ácido gama amino butírico tipo A
h	horas
HBr	ácido bromhídrico
H	hidrogeno
$^1\text{H-NMR}$	resonancia magnética nuclear protónica
i.p.	intraperitoneal
IR	infrarrojo
mg/Kg	miligramos por kilogramo
mL	mililitros
mm	milímetros
μm	micrómetros
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NS	núcleo supraquiasmático
$-\text{NH}_2$	grupo amino
$-\text{OH}$	grupo hidroxilo
O	oxígeno
ppm	partes por millón

p-gp	glicoproteína p
R	radical
S	azufre
-SH	grupo sulfhidrilo
SNC	sistema nervioso central
TBE	tribromoetanol
UDPG	ácido uridin-5'-difosfato- α -D-glucurónico

Lista de Tablas

No. de tabla	PÁG.
Tabla 1. Composición química del TBE.....	13
Tabla 2. Variación de la composición corporal dependiendo de la edad y el género.....	17
Tabla 3. Diferencias de parámetros farmacocinéticas dependientes del género.....	18
Tabla 4. Propiedades peligrosas de los compuestos de degradación del TBE.....	23
Tabla 5. Datos biológicos y reproductivos de la rata.....	24
Tabla 6. Datos biológicos y reproductivos del ratón.....	25
Tabla 7. Reacciones de reducción presentes en la Fase I.....	39
Tabla 8. Condiciones de almacenamiento de los animales.....	43
Tabla 9. Dosificación para el experimento A.....	45
Tabla 10. Dosificación para el experimento B.....	48
Tabla 11. Control íntegro y control vehículo de ratas hembras y machos en turnos de administración matutino (9 a 11 horas) y vespertino (16 a 18 horas).....	51
Tabla 12. Ratas hembras administradas en un horario matutino (9 a 11 horas).....	52
Tabla 13. Ratas hembras administradas en un horario vespertino (16 a 18 horas).....	52
Tabla 14. Ratas machos administradas en un horario matutino (9 a 11 horas).....	53

Tabla 15. Ratas machos administradas en un horario vespertino (16 a 18 horas).....	53
Tabla 16. Control íntegro y control vehículo de ratones hembras y machos en turnos de administración matutino (9 a 11 horas) y vespertino (16 a 18 horas).....	54
Tabla 17. Ratones hembras administradas en turno matutino (9 a 11 horas).....	55
Tabla 18. Ratones hembras administradas en turno vespertino (16 a 18 horas).....	55
Tabla 19. Ratones machos administrados en turno matutino (9 a 11 horas).....	56
Tabla 20. Ratones machos administrados en turno vespertino (16 a 18 horas).....	56

Lista de Figuras

No. de figura	PÁG.
Figura 1. Estructura química del 2,2,2-Tribromoetanol.....	12
Figura 2. Espectro de masas del 2,2,2-Tribromoetanol.....	13
Figura 3. Espectro infrarrojo del 2,2,2-Tribromoetanol.....	14
Figura 4. Espectro de resonancia magnética nuclear ¹ H del TBE.....	14
Figura 5. Reacción de oxidación.....	38
Figura 6. Reacciones de biotransformación de Fase II.....	40
Figura 7. Reacción de degradación del 2,2,2-Tribromoetanol.....	58

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El uso de anestésicos en el área experimental biomédica es de suma importancia debido a que puede ser un factor de riesgo y alteración en el proceso de investigación dado a las interacciones presentes del mismo con el modelo a evaluar.

El 2,2,2-Tribromoetanol es un anestésico que se está utilizando recientemente en estudios con animales de laboratorio debido a la mínima interacción que llega a presentar, aunque en México cabe destacar que no existen estudios reportados al respecto.

Por lo que el presente trabajo se encuentra encaminado a observar cuales son los daños o lesiones que puede llegar a provocar en tejidos como son: corazón, cerebro, hígado, bazo, tracto gastrointestinal, riñones y pulmones, a los que se realizaran cortes histopatológicos. Considerando que estos son los principales órganos que pueden ser indicativos sobre las posibles alteraciones en la absorción, metabolismo y excreción de dicho fármaco.

Por lo que es relevante observar los efectos posibles en dos de las especies (*Rattus norvegicus* y *Mus musculus*) más utilizadas comúnmente en estudios biomédicos y analizar la posibilidad de su utilización en experimentos de investigación crónica o aguda. También contemplamos en este proyecto algunas otras variables que pudiesen afectar la acción de dicho anestésico como el ritmo circadiano y el sexo de los animales, esto con la finalidad de proporcionar un informe mucho más completo de un anestésico que puede ser viable en las prácticas de experimentación biomédica.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 TRIBROMOETANOL

2.1.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

El 2,2,2-Tribromoetanol es una sustancia sintética que deriva del alcohol etílico cuando se reemplazan tres átomos de hidrógeno por tres de bromo (Figura 1); esta inducción de halógenos aumenta la acción depresora sobre el sistema nervioso central, tal como sucede en el caso del cloroformo (Howard, 1952).

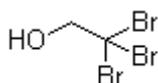


Figura 1. Estructura química del 2, 2,2-Tribromoetanol (www.chemexper.com).

La fórmula empírica de este compuesto es: $C_2H_3Br_3O$ y cuyo registro de acuerdo a su hoja de seguridad tenemos CAS: 75-80-9

El TBE es un polvo blanco cristalino, cuyo punto de fusión es de 79-82 °C, su peso molecular es de 282.78 g/mol; tiene un ligero olor aromático; es muy poco soluble en agua; es soluble en alcohol, éter, cloroformo, benceno y es muy soluble en hidrato de amileno (Litter, 1959). Las soluciones acuosas y alcohólicas deben ser protegidas de la luz y almacenadas a 4°C para evitar su descomposición en ácido bromhídrico y dibromoacetaldehído. No deben calentarse por arriba de 40 °C, y deben ser preparadas inmediatamente antes de su uso (Howard, 1952).

También es conocido como: β -Tribromoetanol; 2,2,2-Tribromoetanol; 2,2,2-Alcohol tribromoetílico; Avertin; Basibrol; Bromethol; Ethobrom; Ethobrome; NSC 2189; Narcolan; Narcotyl; Narkolan; Rectanol; Tribromoetanol.

2.1.2 CARACTERIZACIÓN DEL TRIBROMOETANOL

A continuación se presentan la composición química (Tabla 1) y los espectros más importantes en la caracterización del TBE (perfil espectroscópico) como lo son el de masas, infrarrojo y resonancia.

Tabla 1. Composición química del TBE (www.chemexper.com).

Elemento	Número	Porcentaje
C	2	8.495627
H	3	1.069405
Br	3	84.776615
O	1	5.658352

Enseguida se muestran los picos característicos del 2,2,2-Tribromoetanol en el espectro de masas (Figura 2); siendo el más elevado el que nos indica a la molécula con una ionización simple, es decir con la pérdida de un átomo de hidrógeno, por su parte los otros picos nos indican diferentes ionizaciones de la molécula y la altura de los mismos la estabilidad de dichos fragmentos ionizados.

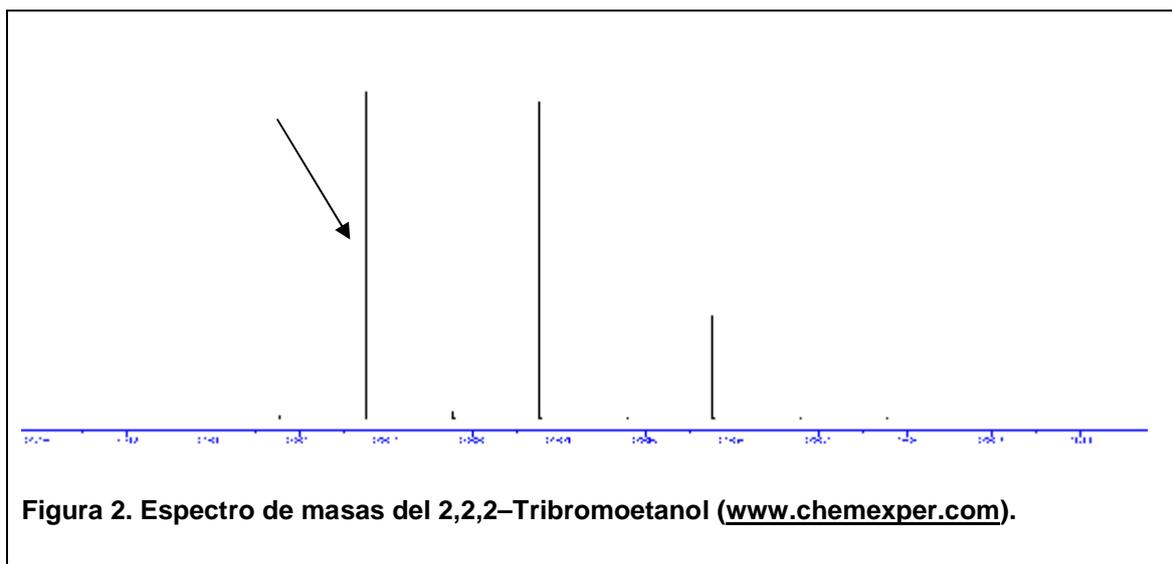


Figura 2. Espectro de masas del 2,2,2-Tribromoetanol (www.chemexper.com).

Así pues, también podemos observar las bandas más representativas en el espectro infrarrojo (Figura 3) correspondientes a los grupos funcionales del compuesto como lo son el grupo hidroxilo una banda ancha y fuerte entre 3400 y 2500 cm^{-1} , luego observamos una banda alrededor de los 1100 cm^{-1} correspondiente a un alcohol primario corroborando la banda del grupo hidroxilo; también se observa una banda en 1550 cm^{-1} que corresponde al grupo etilo y por último se puede observar una banda de intensidad media correspondiente a los bromos en 600 cm^{-1} .

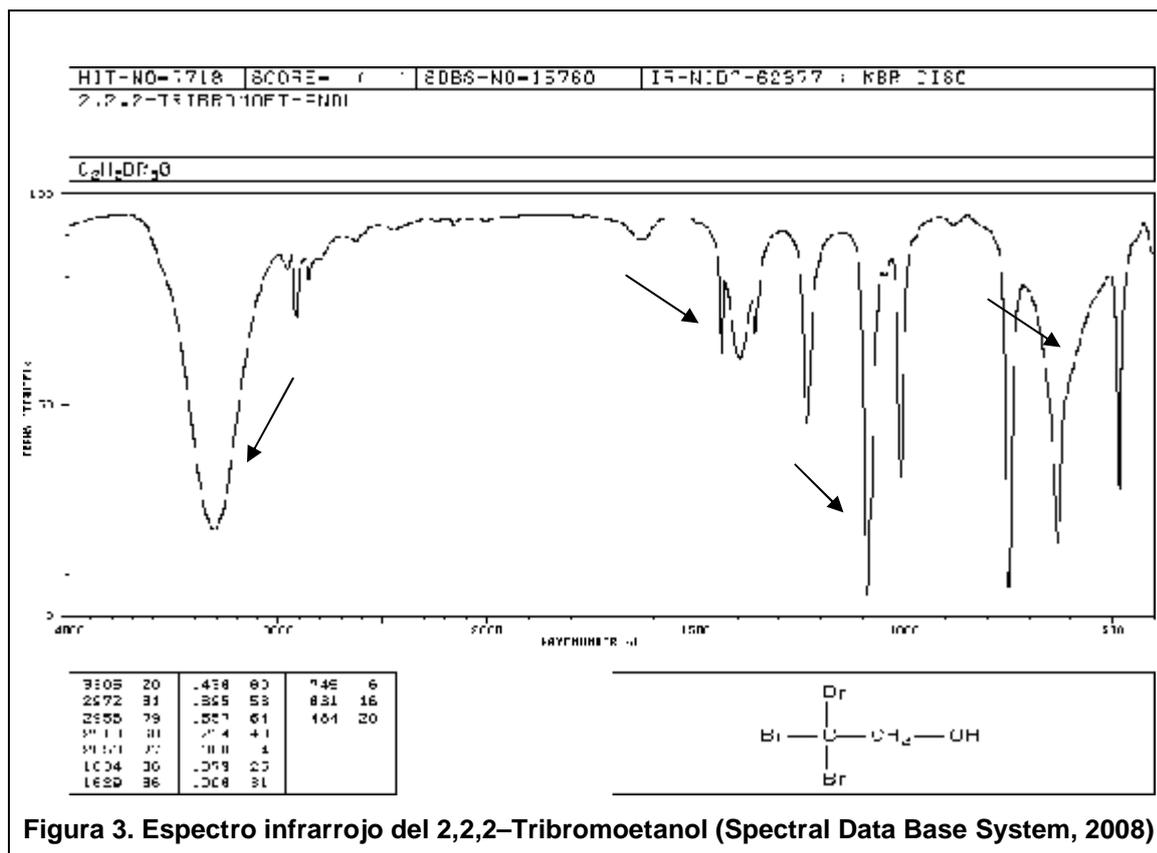


Figura 3. Espectro infrarrojo del 2,2,2-Tribromoetanol (Spectral Data Base System, 2008)

Por su parte, se observan en el espectro de RMN ^1H (Figura 4) las bandas correspondientes a los hidrógenos presentes en la molécula del compuesto apareciendo alrededor de 3 ppm un doblete presentado por el etilo y un singlete alrededor de 4 ppm correspondiente al hidroxilo.

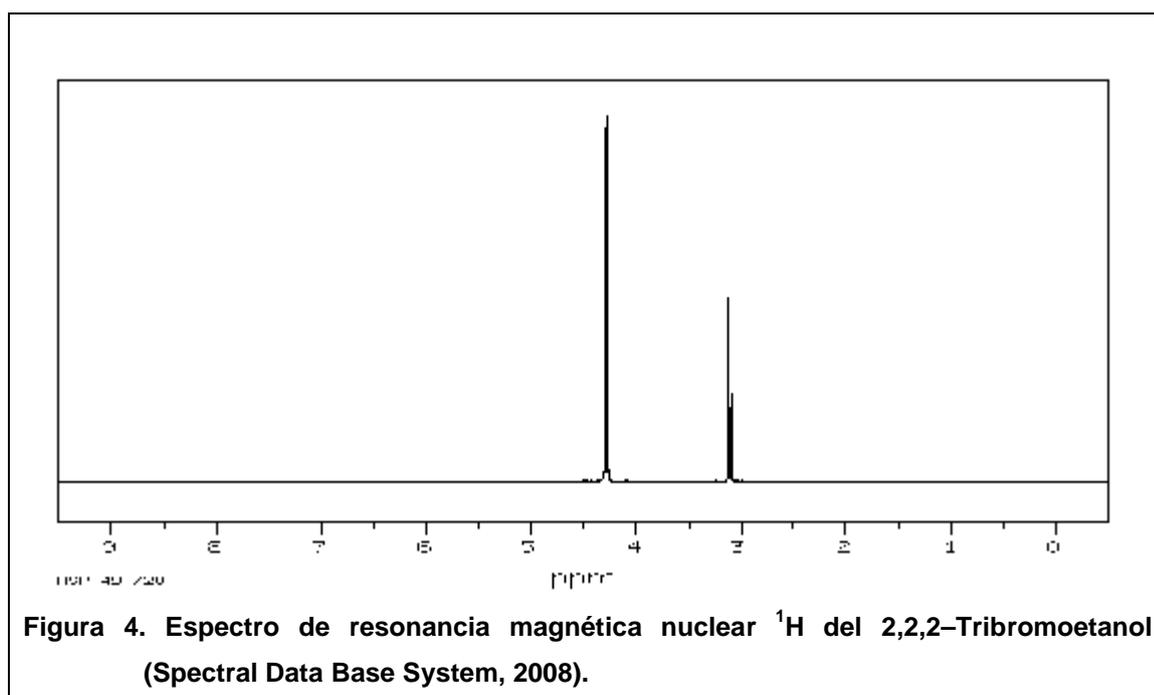


Figura 4. Espectro de resonancia magnética nuclear ^1H del 2,2,2-Tribromoetanol (Spectral Data Base System, 2008).

2.1.3 USO COMO ANESTÉSICO EN LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

El TBE es un anestésico basal que al administrarse vía rectal produce una rápida y placentera anestesia por alrededor de 1 ½ horas y amnesia por un periodo largo de tiempo. Se usó también para controlar estados asmáticos y ataques convulsivos en tétanos y en algunos casos agudos de eclampsia y en estados maniacos en humanos (Martindale, 1973; Douglas, 1953; Santos, 1963).

Éste fármaco se utilizaba en humanos, sin embargo cayó en desuso debido a:

1. La variabilidad de respuesta biológica observada.
2. Irritación rectal.
3. Un periodo prolongado de inducción cuando se utiliza como suplemento con anestésicos inhalatorios.
4. La alarmante depresión inmediata.
5. La imposibilidad de remover con eficiencia el agente tóxico una vez que se presenta DIFUSIÓN TRANSPLACENTARIA causando una depresión profunda sobre el feto.

En el caso de los animales, el TBE produce anestesia quirúrgica en ratas y ratones, con buena relajación muscular y sólo un grado moderado de depresión respiratoria, razón por la cual en la actualidad es el anestésico de elección para investigación biomédica, usado en Europa y recientemente en nuestro país (Thompson, 2002; Norris 1983)

2.1.4 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA

Las soluciones de TBE se absorben rápidamente por la mucosa rectal, en caso de ser administradas vía intraperitoneal; siendo el peritoneo el lugar de absorción; el 50% de la dosis administrada es absorbida rápidamente dentro de los primeros 10 minutos luego de la administración. Este compuesto se conjuga con el ácido glucorónico en el hígado para ser eliminado, casi por completo en 2h, en la orina. El TBE se difunde a través de la placenta (Martindale, 1973; William, 1984; Norman 1963).

Uno de los sitios de acción de este fármaco es a nivel de sistema nervioso central (SNC). En algunos experimentos se ha observado que inhibe la sinapsis en las que la neurotransmisión es mediada por el ácido γ -amino butírico (GABA) que actúa en los receptores GABA_a β_1 ; sin embargo la acción vía esta inhibición es débil, por lo tanto se supone hay otro camino de acción para efectuar el proceso

anestésico, dicha vía aún se encuentra en proceso de investigación. Es importante señalar que no existen estudios especializados que mencionen los mecanismos ni receptores con los que interactúa (Krasowski, 2000).

2.1.5 FACTORES QUE MODIFICAN LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA

Durante la fase experimental de un proyecto, se debe considerar que existen muchos factores que juegan un papel determinante sobre los efectos biológicos cuando un agente químico interactúa con un organismo vivo. Estos pueden alterar la naturaleza o farmacocinética del fármaco, de allí que también pueda alterarse la intensidad de la respuesta. (Levine, 2005)

Se conoce que la mayoría influyen la naturaleza o intensidad de la respuesta de los fármacos y pueden clasificarse dependiendo de su fuente de variabilidad en dos categorías. La primera incluye variables atribuidas al sistema biológico como son (Levine, 2005):

- Peso y talla corporal;
- Edad;
- Género;
- Relojes biológicos;
- Características heredadas y;
- El estado general de salud.

La segunda, variables atribuidas a las condiciones de administración como son (Levine, 2005):

- Dosis;
- Forma de dosificación;
- Vía de administración y;
- El tipo de fármaco a administrar.

En el caso de este trabajo experimental se contemplaron como posibles variables a evaluar, una respuesta biológica, el género y los relojes biológicos que pudieran actuar sobre los efectos histopatológicos del 2, 2, 2-Tribromoetanol.

2.1.1.1 GÉNERO

Aquí debe considerarse que al utilizar individuos hembras cuya constitución o compleción es de menor tamaño comparado con los machos es necesario disminuir la dosis a administrar para obtener un efecto de la misma magnitud. También es necesario puntualizar que hay una diferencia con respecto a esto como se observa en la Tabla 2, donde en humanos se ve claramente la proporción de la masa corporal entre los dos géneros (Levine, 2005). En hembras adultas el tejido adiposo representa un porcentaje mayor que el de agua en el peso total que en el macho adulto. Una diferencia mucho más marcada, en este punto, en el efecto de un fármaco ocurre cuando una hembra se encuentra preñada, que exceptuando los fármacos esenciales para mantener el embarazo; pueden tener peores consecuencias para el feto cuando traspasan la barrera placentaria (Levine, 2005).

Tabla 2. Variación de la composición corporal dependiendo de la edad y el género (Levine, 2005).

	Edad (años)	Masa corporal (Kg)	Porcentaje de agua (%)	Porcentaje de tejido adiposo (%)
Niños	Menos de 3 meses	3.5 – 8.3	70	19
Niños	1	10	57	25
Hombres	20 – 30	72	58	25
	40 – 50	77	56	29
	60 – 70	77	54	35
				45
Mujeres	16 – 30	58	52	45
	40 – 50	62	49	33
	60 – 70	64	42	33
			7	

Así pues se sabe que las diferencias dependientes del género pueden modificar ciertos parámetros farmacocinéticos como lo son: la biodisponibilidad, la distribución, el metabolismo y la eliminación del fármaco como se observa en la tabla 3, donde se citan algunas de las diferencias encontradas para dichos factores (Gandhi, 2004).

Tabla 3. Diferencias de parámetros farmacocinéticas dependientes del género (Gandhi, 2004).

Parámetro farmacocinética	Componentes	Diferencias dependientes del género
Biodisponibilidad	Componente pasivo: fisiología del tracto gastrointestinal	El tiempo de vaciamiento gástrico es menor en hembras que en machos; principalmente secundario al efecto de los estrógenos
	Componente activo: extrusión del fármaco por transportadores; como la p-gp	Los niveles intestinales de la p-gp no varían dependiendo del género
	Metabolismo estomacal: enzimas estomacales como la alcohol deshidrogenasa	Los niveles gástricos de la alcohol deshidrogenasa son mayores en machos que en hembras
Distribución	Composición corporal: índice de masa corporal, porcentaje de grasa, volumen de plasma, perfusión sanguínea de los órganos	Las hembras tienen un menor índice de masa corporal, un mayor porcentaje de grasa, perfusión sanguínea y volumen de plasma mayores que en los machos; aunque este último varía dependiendo del ciclo menstrual
	Unión a proteínas	Las concentraciones de albúmina no parecen variar dependiendo del género, pero los estrógenos endógenos disminuyen los niveles de AAG en el plasma, por lo que las concentraciones de la

Continuación de la Tabla 3.

		misma son menores que en los machos. Los estrógenos exógenos incrementan los niveles de globulinas de unión
Metabolismo	Enzimas hepáticas: Reacciones de Fase I en el hígado mediadas por el sistema de Citocromo P450	No existen datos en cuanto a la variación de los niveles de expresión del Citocromo P450, aunque se sabe que existe una disminución de su expresión mediada por los estrógenos; por lo que su expresión es menor en hembras que en machos
	Transportadores hepáticos	Los machos parecen tener niveles de p-gp mayores que las hembras
Eliminación	Depuración renal: la excreción renal es dependiente de la filtración, secreción y reabsorción	La depuración renal de fármacos que no son activamente secretados o reabsorbidos es dependiente del índice de filtración glomerular, el cual es directamente proporcional al peso; las diferencias dependiendo del género son atribuidas a las variaciones de peso

2.1.1.2 RELOJES BIOLÓGICOS

Existen relojes biológicos que regulan el funcionamiento de todos los organismos vivos y la cronobiología estudia el mecanismo y significado de éstos, mientras que la cronoterapia se encarga de la administración de los medicamentos

basada en los ritmos biológicos. Para complementar estos dos conceptos debemos también entender que la cronofarmacología es la disciplina que estudia la influencia de los ritmos biológicos sobre la cinética y dinámica de los medicamentos. Todo esto nos lleva a la homeostasis del individuo que es sometido a la influencia de un fármaco. En 1981 Enrigh clasificó a los ritmos biológicos en tres grupos de acuerdo con la frecuencia de su oscilación (Ruesga, 1999, Amir, 1996):

1. **Ritmos Ultradianos:** Tienen un periodo inferior a las 19 horas. El término ultra hace referencia a que la frecuencia es alta y la duración es corta; por ejemplo, el ritmo respiratorio, el ritmo cardíaco, las ondas eléctricas cerebrales, etc.
2. **Ritmos Circadianos:** Tienen un periodo cercano a las 24 horas y coinciden con la alternancia de día/noche.
3. **Ritmos Infradianos:** Tienen un periodo superior a las 29 horas. El término infra hace referencia a que la frecuencia es baja y la duración es larga, algunos ejemplos son: el ciclo menstrual de mamíferos y los ciclos reproductivos, etc.

Uno de los grandes retos de la cronoterapia es aplicar los tratamientos de acuerdo con los ritmos circadianos para hacerlos más efectivos (Amir, 1996, Ruesga 1999).

2.1.1.3 RELOJ INTERNO

Los factores más estudiados en los últimos tiempos son los ritmos circadianos (esta palabra se deriva de los vocablos latinos *circa*: alrededor y *dies*: día). El reloj circadiano afecta los ritmos diarios de muchos procesos fisiológicos que presentan fluctuaciones con un ritmo de aproximadamente 24 horas. Entre ellos están el ciclo del sueño-vigilia, las variaciones de la temperatura corporal, el estado de alerta y algunas funciones neuroendocrinas, como la secreción de cortisol y melatonina. Todos ellos se rigen por la actividad del llamado “sistema circadiano”, que está compuesto por una serie de estructuras nerviosas y sus complejas asociaciones, hasta la fecha conocidas de manera parcial. A pesar de que los ritmos circadianos tienden a sincronizarse con los ciclos de luz y oscuridad, otros factores (la temperatura ambiental, horarios de comida, estrés y ejercicio) pueden influenciar el tiempo también (Amir, 1996).

Así pues, siendo el ritmo circadiano uno de los de mayor interés es el que se

analizó en este experimento, debido a que los animales estuvieron bajo condiciones de luz/oscuridad de 12/12 horas.

2.1.1.4 RITMO CIRCADIANO

Los ritmos circadianos o biológicos son recurrencias de fenómenos biológicos en intervalos regulares de tiempo. Todos los animales, las plantas, y probablemente todos los organismos muestran algún tipo de variación rítmica fisiológica (tasa metabólica, producción de calor, floración, etc.) que suele estar asociada con un cambio ambiental rítmico. En todos los organismos eucariontes así como algunos procariontes y hongos se han documentado diferentes ritmos con períodos que van desde fracciones de segundo hasta años. Si bien son modificables por señales exógenas, estos ritmos persisten en condiciones de laboratorio, aun sin estímulos externos (Golombek, 2002).

Se han clasificado de acuerdo a su frecuencia y a su periodo. Los ritmos circadianos han sido los más estudiados y su valor de periodo les permite sincronizar a los ritmos ambientales que posean un valor de periodo entre 20 y 28 horas, como son los ciclos de luz y de temperatura. Los ritmos endógenos circadianos, establecen una fase estable con estos ciclos externos alargando o acortando su valor de periodo e igualándolo al del ciclo ambiental, y poseen las siguientes características (Golombek, 2002):

- ⊕ Son endógenos, persisten durante generaciones sin la presencia de claves temporales.
- ⊕ En condiciones constantes se presenta una oscilación espontánea con un periodo cercano a las 24 horas igualando a los periodos de día–noche.
- ⊕ La longitud del periodo en oscilación espontánea se modifica ligeramente o nada al variar la temperatura, es decir, poseen mecanismos de compensación de temperatura.
- ⊕ Son susceptibles de sincronizar a los ritmos ambientales que posean un valor de periodo aproximado de 24 horas, como los ciclos de luz y de temperatura.
- ⊕ El ritmo puede dejarse de expresar bajo ciertas condiciones ambientales como luz brillante.
- ⊕ En oscilación libre o espontánea, generalmente el período para especies diurnas es mayor de 24 horas y para especies nocturnas el período es menor a las 24 horas (Ley de Aschoff).

Al cambio cíclico ambiental que es capaz de sincronizar un ritmo endógeno se le denomina temporizador o "zeitgeber". Los ritmos circadianos son comandados por relojes circadianos, estructuras cuya complejidad varía según el organismo que corresponda (Golombek, 2002).

El reloj circadiano en los mamíferos se localiza en el núcleo supraquiasmático (NS), un grupo de neuronas del hipotálamo medial. La destrucción de esta estructura lleva a la ausencia completa de ritmos regulares. Por otra parte, si las células del núcleo supraquiasmático se cultivan in vitro, mantienen su propio ritmo en ausencia de señales externas. De acuerdo a esto, se puede establecer que el núcleo supraquiasmático conforma el "reloj interno" o endógeno que regula los ritmos circadianos. La actividad del mismo es modulada por factores externos, fundamentalmente la variación de luz; recibe información sobre la luz externa a través de los ojos; la retina contiene no sólo fotorreceptores clásicos que nos permiten distinguir formas y colores, sino también posee células ganglionares con un pigmento llamado melanopsina, las que a través del tracto retinohipotalámico llevan información al NS, tomando ésta sobre el ciclo luz/oscuridad externo, la interpreta, y la envía a la epífisis o glándula pineal. Esta última secreta la hormona melatonina en respuesta al estímulo proveniente del NS, si éste no ha sido suprimido por la presencia de luz brillante. La secreción de melatonina pues, es baja durante el día y aumenta durante la noche (Golombek, 2002).

Así pues, se ha observado en diferentes estudios que los ritmos circadianos pueden tener un impacto sobre la respuesta farmacológica, disminuyendo o incrementando el efecto de la sustancia administrada a los individuos. Sin embargo, no existen experimentos que demuestren la variación en el grado histopatológico o de toxicidad de los fármacos dependientes del ciclo circadiano (Rebulto, 2002)

2.1.6 TOXICIDAD Y REACCIONES ADVERSAS

Cuando las soluciones de TBE son mal almacenadas éste se descompone en ácido bromhídrico y dibromoacetaldehído, ambos productos son fuertemente irritantes a los tejidos (Tabla 4) (Lieggi, 2005).

Tabla 4. Propiedades peligrosas de los compuestos de degradación del TBE (Lewis, 2001).

Ácido Bromhídrico (HBr)	Dibromoacetaldehído
La sustancia es corrosiva para los ojos, la piel y el tracto respiratorio. La inhalación del gas puede originar edema pulmonar. La evaporación rápida del líquido puede producir congelación.	Es corrosivo y fuertemente irritante al contacto con tejido vivo.

El TBE en dosis anestésicas usuales, en humanos, causaba una caída temporal de la presión cerca de 10 a 15 minutos, siendo raramente peligroso. El anestésico causa parálisis respiratoria y depresión de la función cardiaca. Altas dosis del compuesto causan mal funcionamiento hepático (Martindale, 1973). Da lugar a grave irritación y adherencias peritoneales tras su uso cuando se administran dosis altas y cuando se administra de manera crónica el animal puede presentar tolerancia (Flecknell, 1998). Este fármaco estaba contraindicado en insuficiencia y daño hepático y/o renal; en las afecciones colorectales como inflamación; en las afecciones pulmonares avanzadas; en enfermedades cardíacas graves; en operaciones del recto o ano; en individuos jóvenes y ancianos con acidosis, anemia, sepsis o severo hipertiroidismo o tuberculosis (Norman, 1973).

Se ha observado que este compuesto es hepatotóxico debido al daño apoptótico ocasionado en el hígado (Thompson, 2002), además de la fibrosis peritoneal, perihepática y periesplénica presente post-cirugía (Norris, 1983).

Por lo que es relevante observar los daños o lesiones posibles en dos de las especies (*Rattus norvegicus* y *Mus musculus*) más utilizadas comúnmente en estudios de investigación biomédica.

2.2 ANIMALES UTILIZADOS EN LA EXPERIMENTACIÓN

Los ratones y las ratas son animales dóciles al contacto humano, de fácil y barato mantenimiento y son los modelos biológicos más utilizados en la investigación biomédica.

Ambas especies de roedores, el ratón (*Mus musculus*) y la rata (*Rattus norvegicus*), pertenecen al orden Rodentia, a la familia Muridae, y se encuentran agrupados en el suborden Myomorpha.

2.2.1 *Rattus norvegicus*

La cepa de ratas de laboratorio comúnmente usada en investigación es: *Rattus norvegicus*. Los adultos generalmente pesan entre 300 y 500 g, los machos son ligeramente más grandes que las hembras. La mayoría de las ratas de laboratorio son albinas con pelo blanco y ojos rojos (Hrapkiewicz, 1998). Las ratas utilizadas en este experimento son Wistar de cepa abierta, cuyas características biológicas y fisiológicas se mencionan a continuación (Tabla 5):

Tabla 5. Datos biológicos y reproductivos de la rata (Harkness, 1995; Fox, 1984).

Género:	Rattus
Especie:	norvegicus
Familia:	Muridae
Orden:	Rodentia
Suborden:	Myomorpha
Peso corporal adulto:	
Macho	300 – 520g
Hembra	250 – 300g
Tiempo de vida:	2.5 – 3.5 años
Temperatura corporal:	35.9°C – 37.5°C
Frecuencia cardiaca:	250 – 450 pulsos/min
Frecuencia respiratoria:	70 – 115 reps/min
Consumo de comida:	5-6g / 100g / día
Consumo de agua:	10-12mL / 100g / día
Tipo de ciclo estral:	Poliéstrico continuo
Determinación de las fases del ciclo estral:	Frotis vaginal
Vida reproductiva hembra:	350 – 440 días
Duración del ciclo estral	4 – 5 días
Período de gestación:	21 – 23 días
Tamaño de la camada:	6 – 12 animales
Edad al destete:	21 días
Número de cromosomas (diploide):	42

2.2.2 *Mus musculus*

Los ratones se utilizan en investigación biomédica porque son animales pequeños, proliferan rápidamente, poseen gran diversidad genética y están bien caracterizados anatómica, bioquímica y fisiológicamente. Ellos son los animales vertebrados más ampliamente usados en investigación biomédica y experimentación (Hrapkiewicz, 1998); cuyas características se mencionan enseguida (Tabla 6):

Tabla 6. Datos biológicos y reproductivos del ratón (Harkness, 1995; Fox, 1984).

Género:	Mus
Especie:	musculus
Familia:	Muridae
Orden:	Rodentia
Suborden:	Myomorpha
Peso corporal adulto:	
Macho	20 – 40g
Hembra	25 – 40g
Tiempo de vida:	1.5 – 3 años
Temperatura corporal:	36.5°C – 38°C
Frecuencia cardiaca:	325 – 780 pulsos/min
Frecuencia respiratoria:	60 – 220 reps/min
Consumo de comida:	12-18g / 100g / día
Consumo de agua:	15mL / 100g / día
Tipo de ciclo estral:	Poliéstrico continuo
Determinación de las fases del ciclo estral:	Frotis vaginal
Vida reproductiva hembra:	7 – 9 meses
Duración del ciclo estral	4 – 5 días
Período de gestación:	19 – 21 días
Tamaño de la camada:	10 – 12 animales
Edad al destete:	21 – 28 días
Número de cromosomas (diploide):	40

2.3 HISTOPATOLOGÍA

2.3.1 HISTOTÉCNICAS

El diagnóstico de enfermedades que provocan lesiones macro y microscópicas en diversos órganos de un organismo, es llevado a cabo mediante la utilización y procesamiento de muestras del tejido o tejidos a analizar mediante la utilización de HISTOTÉCNICAS. Generalmente se llevan a cabo en laboratorios especializados de histopatología donde se elabora el procesamiento y aplicación de la técnica histopatológica más adecuada dependiendo de lo que se desea observar y/o investigar. Así pues se pueden enumerar los pasos básicos de las histotécnicas en los siguientes (Ross, 2001):

- A. TOMA DE MUESTRA.** Usualmente las muestras se toman a partir de una biopsia en caso de que se requiera el análisis de un individuo vivo; o bien, la toma de una muestra de una autopsia.
- B. EXAMEN MACROSCÓPICO.** Consiste en la descripción completa de las lesiones o características presentes en la muestra como lo son color, tamaño, variaciones estructurales, etc.
- C. FIJACIÓN.** El propósito de este paso es la preservación del tejido para su posterior utilización; esta debe llevarse a cabo lo antes posible posterior a la extracción del organismo para prevenir la autólisis. Así pues no existe una fijación perfecta; sin embargo, la utilización de formaldehído es una de las mejores debido a que mantiene los órganos en un excelente estado de conservación sin dañar la antigenicidad de los mismos.
- D. PROCESAMIENTO.** Una vez fijado, éste debe de procesarse de tal forma que pueda ser observado en secciones o láminas para el microscopio. Usualmente el método para esto es mediante la inclusión en bloques de parafina; para lo cual la muestra debe de ser deshidratada con la utilización de diferentes agentes químicos generalmente alcohol etílico en diversas concentraciones – desde 20% hasta absoluto – y terminando con una serie de inmersiones en xileno absoluto para la clarificación de la misma. Posteriormente la inmersión en la parafina para así obtener un medio fácil de seccionar mediante la utilización de un microtomo.
- E. SECCIONAMIENTO.** En esta etapa se realizan los cortes histológicos de los bloques de parafina para ser puestos en placas o laminillas y ser observadas posteriormente al microscopio. El microtomo no es más que un mecanismo de

avance de cuchillas hacia el bloque de parafina, permitiendo la obtención de cortes histológicos de 3 a 10 micras, siendo los más comunes de 6 a 8 micras.

- F. TINCIÓN.** El proceso de tinción utiliza una gran variedad de colorantes que han sido seleccionados por su habilidad de teñir diferentes componentes celulares del tejido. La tinción más comúnmente utilizada es mediante Hematoxilina y Eosina. Existen otros tipos de tinciones denominadas como especiales porque son usualmente utilizadas en situaciones específicas de acuerdo al diagnóstico requerido.
- G. MONTAJE.** Las secciones teñidas deben ser cubiertas con una pieza de plástico o vidrio para proteger al tejido del medio externo que puede dañarlo, brindando una calidad óptica mejor para observar al microscopio, y para su conservación. Para lo cual se utilizan medios de montaje, generalmente sustancias resinosas y la colocación de cubreobjetos.
- H. EXAMEN MICROSCÓPICO.** Consiste en la observación de las muestras al microscopio.

2.3.2 TINCIÓN HEMATOXILINA – EOSINA

La hematoxilina es el producto de oxidación del “árbol del palo campeche” conocido como hematina. Este árbol es sumamente raro en nuestros días, por lo que la mayor parte de la hematina utilizada es de origen sintético. En orden para su uso en la tinción, la hematina tiene que ser oxidada, lo cual se obtiene naturalmente poniendo una solución de hematina a la intemperie durante meses, o bien, comprándola comercialmente como hematoxilina. La hematoxilina no tiñe los tejidos directamente, por lo que es necesario la utilización de un mordente o acoplador a tejidos, este es proporcionado por un catión metálico como el hierro, aluminio o tungsteno. La hematoxilina actúa como un colorante básico, por lo que tiene afinidad por los ácidos nucleicos del núcleo de las células. Las tinciones con hematoxilina pueden ser “regresivas” o “progresivas”. Con una tinción regresiva, se realiza primero una sobrecoloración y luego se elimina el resto del colorante por medio de diferenciadores, usualmente soluciones alcohólicas-ácidas. A este proceso se lo denomina diferenciación. Mientras que en una tinción progresiva se deja actuar el colorante hasta que alcance su punto óptimo de intensidad en coloración (Ross, 2001).

Por su parte, la eosina es un colorante sintético ácido con afinidad por los componentes citoplasmáticos de la célula. Existe gran variedad de eosinas variando en la forma de su obtención, pero todas trabajan de la misma manera (Ross, 2001).

2.3.3 PRINCIPALES ÓRGANOS DE ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Han de considerarse a los siguientes tejidos: corazón, cerebro, hígado, bazo, tracto gastrointestinal, riñones y pulmones, como los principales órganos que pueden ser indicativos sobre las posibles alteraciones en la absorción, metabolismo y excreción de dicho fármaco y por consiguiente su estudio histopatológico es necesario.

2.3.4 CORAZÓN

El corazón contiene cuatro cavidades (dos aurículas y dos ventrículos) a través de los cuales bombea la sangre. Las válvulas controlan las salidas de las cavidades e impiden el reflujo de sangre. Un tabique interauricular y un tabique interventricular separan las partes izquierda y derecha del corazón. La aurícula derecha recibe la sangre que retorna al cuerpo a través de las venas cava inferior y superior, las dos venas de mayor calibre del organismo. El ventrículo derecho recibe la sangre de la aurícula derecha y la bombea hacia los pulmones por medio de las arterias pulmonares. La aurícula izquierda recibe la sangre oxigenada que retorna a los pulmones por las cuatro venas pulmonares. El ventrículo izquierdo recibe la sangre de la aurícula izquierda y la bombea a la aorta para su distribución a la circulación sistémica (Ross, 2001).

La pared del corazón está constituido por (Ross, 2001):

- ♥ Una **musculatura** de músculo cardíaco para la contracción que empuja la sangre.
- ♥ Un “**esqueleto**” **fibroso** que fija las válvulas.
- ♥ Un sistema interno de conducción para la sincronización de las contracciones musculares.

El **esqueleto fibroso**, compuesto por tejido conectivo denso, rodea la base de dos arterias que abandonan el corazón (la aorta y el tronco de la pulmonar) y las aberturas entre las aurículas y los ventrículos. Cada disposición anular de tejido fibroso fija las válvulas que permiten el flujo unidireccional de sangre por las aberturas. El esqueleto fibroso se extiende también en parte en el tabique

interventricular. Esta pequeña porción del tabique carece de músculo cardíaco; contiene un corto segmento del haz auriculoventricular (haz de His) no ramificado del sistema de conducción cardíaca. El resto de la pared del corazón contiene músculo cardíaco (Ross, 2001).

La **pared cardíaca** está organizada esencialmente de la misma forma en las aurículas y los ventrículos. Se compone de tres capas (Ross, 2001):

- ♥ El **epicardio** consiste en una capa de células mesoteliales sobre la superficie cardíaca externa y su tejido conectivo subyacente. Los vasos sanguíneos y nervios que irrigan e inervan el corazón transcurren en el epicardio y están rodeados por tejido adiposo que almohadilla el corazón en la cavidad pericárdica.
- ♥ El **miocardio**, el músculo cardíaco, es el principal componente del corazón. El miocardio ventricular es bastante más grueso que el auricular, debido a la gran cantidad de músculo cardíaco presente en las paredes de las dos cavidades que bombean.
- ♥ El **endocardio** consiste de una capa interna de endotelio y de tejido conectivo subendotelial, una intermedia de tejido conectivo y células musculares lisas y una más profunda, también denominada capa subendocárdica de tejido conectivo continuo con el del miocardio. El sistema conductor de impulsos del corazón está localizada en la capa subendotelial del endocardio.

Así pues, desde el punto de vista histopatológico es de suma importancia su estudio ya que es el órgano encargado de la distribución puesto que por medio de éste se desplazan los medicamentos a través del flujo sanguíneo a todo el organismo (Guyton, 200).

2.3.5 CEREBRO

El cerebro, como parte de la anatomía del encéfalo de los animales vertebrados, es el centro supervisor del sistema nervioso, se localiza en la cabeza. El cerebro humano pesa aproximadamente 1300-1500 gramos. Su superficie llamada **corteza cerebral**, si estuviera extendida, cubriría una superficie de 1800-2300 centímetros cuadrados. Se estima que en el interior de la corteza cerebral hay unos 22,000 millones de neuronas, aunque hay estudios que llegan a reducir esa cifra a los 10,000 millones y otros a ampliarla hasta los 100,000 millones. Por otra

parte, es el único órgano completamente protegido por una bóveda ósea y alojado en la cavidad craneal. Está dividido por la fisura longitudinal en dos hemisferios cerebrales, uno derecho y otro izquierdo, encontrándose en cada hemisferio otras fisuras, aunque menos profundas que ésta, que dividen la superficie cerebral en varias partes llamadas lóbulos. Aun cuando ambos hemisferios humanos son inversos, no son la imagen invertida uno del otro, por lo que son asimétricos (Ross, 2001).

El principal tipo de neurona que podemos encontrar en el cerebro es la interneurona (definida como cualquier neurona que no abandona el sistema nervioso central). Sin embargo, también están presentes las neuronas aferentes y las eferentes a través del tronco cerebral. El cerebro contiene cerca de 10 neuroglías por cada neurona, y tradicionalmente se ha visto que su función es la de desarrollar el papel de apoyo de las neuronas y de rellenar el espacio que queda entre ellas (de ahí su nombre, "pegamento" en griego). La mayor parte de las neuroglías del cerebro (y del resto del sistema nervioso central) están presentes en todo el sistema nervioso (a excepción del oligodendrocito). El cerebro de los mamíferos posee, aparte del tejido nervioso citado arriba, una cierta cantidad de tejido conectivo llamado meninges. Se trata de un sistema de membranas que separan el cráneo del cerebro. El cerebro está suspendido en el líquido cefalorraquídeo formado en los plexos coroideos y que circula entre las capas de las meninges, concretamente por el espacio subaracnoideo, y a través de cavidades en el cerebro llamadas ventrículos (Ross, 2001).

2.3.6 BAZO

El bazo es un órgano linfoide, con múltiples funciones siendo las más conocidas las que se refieren a la linfopoyesis (formación de glóbulos blancos), eritropoyesis (formación de glóbulos rojos) y hematólisis (destrucción de los glóbulos rojos). Además de jugar un importante papel en los procesos inmunológicos considerándosele parte del sistema linfático. Está situado en el hipocondrio izquierdo, inmediatamente debajo del diafragma, encima del riñón izquierdo y del colon descendente y detrás del fondo gástrico; tiene una forma ovoide siendo su tamaño variable según la edad y la situación sanitaria del sujeto, siendo mayor durante el curso de las enfermedades infecciosas y atrofiándose con la edad. Se encuentra rodeado de una capa fibrosa que se prolonga hacia el interior dividiendo

el órgano en varios compartimentos. Las arterias que entran en cada uno de estos compartimentos están rodeadas por unas densas masas de linfocitos en desarrollo llamados folículos linfáticos esplénicos. Debido a su color blanco, estas masas reciben también el nombre de pulpa blanca. En la parte más externa de estos compartimentos se observa una red de fibras reticulares sumergidas en sangre procedente de las numerosas arteriolas, formando la pulpa roja. Tras atravesar esta retícula la sangre se concentra en los senos venosos para volver a la circulación en general (Ross, 2001).

Las funciones del bazo están relacionadas con el sistema inmunológico y con el almacenamiento y depuración de la sangre. En los folículos linfáticos esplénicos, los macrófagos eliminan de la sangre los hematíes agotados, recuperando el hierro y la globina que son enviados al torrente circulatorio. Igualmente las plaquetas imperfectas y otras impurezas o gérmenes que puedan ir en la sangre son eliminados por fagocitosis en estas estructuras. De esta forma, el bazo representa un órgano de defensa frente a los microorganismos. Finalmente, la maduración de los leucocitos agranulares (monocitos y linfocitos) terminan su desarrollo en el bazo, siendo activados a granulocitos (Ross, 2001).

2.3.7 TRACTO GASTROINTESTINAL

Considerado desde el esófago hasta el recto, el tracto gastrointestinal es un conducto hueco de diámetro variable. Presenta la misma organización estructural en toda su longitud. La pared del tubo digestivo está formada por cuatro capas distintivas, que son, desde la luz hacia fuera (Ross, 2001):

- ≈ La **mucosa**, que consiste en un epitelio de revestimiento, un tejido conectivo subyacente denominado lámina propia y una muscular de la mucosa, compuesto de músculo liso.
- ≈ La **submucosa**, que consiste de tejido conectivo denso no modelado.
- ≈ La **muscular propia**, compuesta por dos capas de tejido muscular.
- ≈ La **serosa** o **adventicia**, una membrana serosa compuesta por un epitelio simple plano, el mesotelio, y una pequeña cantidad de tejido conectivo subyacente; donde la pared se fija directamente con las estructuras adyacentes, la capa externa es la **adventicia**, compuesta por tejido conectivo.

Debemos considerar que el tracto gastrointestinal es el encargado del proceso de

digestión, es decir, la transformación de los alimentos para que puedan ser absorbidos y utilizados por las células; cabe destacar que no únicamente se lleva a cabo la absorción de nutrimentos sino también la absorción de cualquier sustancia ingerida, o bien, administrada de forma exógena como lo son los medicamentos (Guyton, 2000).

2.3.8 RIÑÓN

Los riñones son órganos grandes, rojizos, con forma de alubia, que se localizan en el retroperitoneo de la cavidad abdominal posterior, a cada lado de la columna vertebral. Cada riñón mide unos 10 cm de largo por 6.5 cm de ancho (desde el borde cóncavo al convexo) por 3 cm de espesor. En el polo superior de cada riñón, incluida en la fascia renal y en una gruesa capa protectora de tejido adiposo perirrenal, se ubica la glándula suprarrenal. El borde medial del riñón es cóncavo y contiene una profunda fisura vertical, denominada hilio, a través de la cual pasan los vasos y nervios renales y el origen expandido, con forma de embudo, del uréter, denominado pelvis renal. Un corte transversal del riñón permite apreciar la relación entre estas estructuras en el seno renal, un espacio dentro del hilio. El espacio entre y alrededor de estas estructuras está ocupado, en su mayor parte, por tejido conectivo laxo y tejido adiposo.

La superficie renal está recubierta por una delgada, pero resistente cápsula de tejido conectivo. La cápsula está compuesta por una capa externa de fibroblastos y fibras colágenas y una capa interna de miofibroblastos. Es posible que la contractilidad de los miofibroblastos contribuya en la resistencia a las variaciones de volumen y presión que acompañan al funcionamiento renal. La cápsula se internaliza a la altura del hilio, donde forma el tejido conectivo que recubre el seno y se continua con el tejido conectivo que forma las paredes de los cálices y la pelvis renal. Así pues, están revestidos por una cápsula fibrosa y constituidos por dos tipos de estructuras diferentes: la **sustancia cortical**, inmediatamente debajo de la cápsula fibrosa y la **zona medular** (Ross, 2001).

La **sustancia cortical**, de color rojo oscuro, envuelve a la sustancia medular que penetra profundamente en ella dando lugar a unas formaciones radiadas llamadas pirámides de Ferrein o radios medulares de Ludwig. La **sustancia medular**, de color más claro, está formada por 8-14 masas piramidales, las pirámides de Malpighio cuyo vértice se abre en cavidades en forma de copa

llamadas cálices renales que convergen en el uréter. Entre las pirámides de Malpighio, se encuentran unas prolongaciones de la sustancia cortical que reciben el nombre de columnas de Bertin (Ross, 2001).

Los riñones contienen numerosísimos ovillos microscópicos de capilares sanguíneos arteriales, los **glomérulos**. Cada uno de ellos recibe la sangre de una arteriola aferente y la vierte en otra arteriola eferente de calibre más pequeño. Estas dos arteriolas son contiguas y constituyen una especie de pedúnculo vascular de sostén. El **glomérulo** está envuelto por una membrana de doble pared, la cápsula de Bowman, que se repliega en el lugar en donde confluyen las arteriolas aferente y eferente. Por el extremo opuesto, la membrana de la cápsula de Bowman continúa por un delgado tubo de curso tortuoso, el túbulo renal. El conjunto de glomérulo y cápsula de Bowman se denominan corpúsculo de Malpighio (Ross, 2001).

El túbulo renal que sale de la cápsula de Bowman, llamado en su porción más próxima al glomérulo túbulo proximal, se prolonga en un largo tubo sinuoso (túbulo sinuoso proximal) al que sigue un segmento en forma de U, el asa de Henle. Finalmente, al asa de Henle, sigue el túbulo sinuoso distal que desemboca en un túbulo colector. La orina formada en la nefrona se recoge en los túbulos colectores, que representan los conductos en los que desembocan los túbulos sinuosos distales. Los túbulos colectores van confluyendo entre sí a distintos niveles haciéndose de mayor calibre a medidas que se adentran en la zona medular. Finalizan en grandes conductos (conductos de Bellini) que abren directamente en los cálices renales (Ross, 2001).

Algunas de las funciones del riñón son (Guyton, 2000):

- ♣ La excreción de desechos.
- ♣ La formación de orina mediante la cual excreta los desechos.
- ♣ Regular la homeostasis total del cuerpo.
- ♣ Regular el volumen de los fluidos extracelulares.
- ♣ Participa en la composición y recuperación de electrolitos.

2.3.9 PULMÓN

Los pulmones están situados dentro de la caja torácica, protegidos por las costillas y a ambos lados del corazón. Son huecos y se encuentran cubiertos por una doble membrana lubricada (mucosa) llamada **pleura**; el mediastino separa a

uno del otro. La **pleura** es una membrana de tejido conjuntivo, que evita que los pulmones rocen directamente con la pared interna de la caja torácica. Posee dos capas, la pleura parietal o externa que recubre y se adhiere al diafragma y a la parte interior de la caja torácica, y la pleura visceral que recubre el exterior de los pulmones, introduciéndose en sus lóbulos a través de las cisuras. Entre ambas capas existe una pequeña cantidad de líquido lubricante denominado líquido pleural (Ross, 2001).

La superficie de los pulmones es de color rosado en los niños y con zonas oscuras distribuidas irregularmente pero con cierta uniformidad en los adultos. Esto es denominado antracosis y aparece con carácter patológico, mostrándose casi en la totalidad de los habitantes de ciudades, como resultado de la inhalación de polvo flotante en la atmósfera que se respira, principalmente carbón. El pulmón derecho está dividido por dos cisuras (mayor y menor) en tres partes, llamadas lóbulos (superior, medio e inferior). A su vez, el izquierdo tiene dos lóbulos (superior e inferior) separados por una cisura (cisura mayor). Esto se debe a que el corazón tiene una inclinación oblicua hacia la izquierda y de atrás hacia adelante; "clavándose" la punta inferior (el ápex) en el pulmón izquierdo, reduciendo su volumen y quitando espacio a dicho pulmón. En ambos se describe un vértice o ápex (correspondiente a su parte más superior, que sobrepasa la altura de las clavículas), y una base (inferior) que se apoya en el músculo diafragma. La cisura mayor de ambos pulmones va desde el cuarto espacio intercostal posterior hasta el tercio anterior del hemidiafragma correspondiente. En el pulmón derecho separa los lóbulos superior y medio del lóbulo inferior, mientras que en el pulmón izquierdo separa los dos únicos lóbulos: superior e inferior. La cisura menor separa los lóbulos superior y medio del pulmón derecho y va desde la pared anterior del tórax hasta la cisura mayor. En cada lóbulo se distinguen diferentes segmentos, bien diferenciados, correspondiéndole a cada uno un bronquio segmentario; estos se subdividen en bronquios propiamente dichos y bronquiolos; siendo estos últimos los que carecen de cartílago y se ramifican en bronquiolos terminales y bronquiolos respiratorios desembocando en los **alvéolos**: las unidades funcionales de intercambio gaseoso del pulmón (Ross, 2001).

La mucosa de las vías respiratorias está cubierta por millones de pelos diminutos, o cilios cuya función es atrapar y eliminar los restos de polvo y gérmenes en suspensión procedentes de la respiración, evitando, en lo posible, cualquier

entrada de elementos sólidos que provoquen una broncoaspiración (Ross, 2001).

La función de los pulmones es realizar el intercambio gaseoso con la sangre, por ello los alvéolos están en estrecho contacto con los capilares. En los alvéolos se produce el paso de oxígeno desde el aire a la sangre y el paso de dióxido de carbono desde la sangre al aire. Este paso se produce por la diferencia de presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono (difusión simple) entre la sangre y los alvéolos (Netter, 1996).

2.3.10 HÍGADO (ÓRGANO BLANCO DEL 2,2,2-TRIBROMOETANOL)

El hígado es la glándula más grande y el órgano interno más voluminoso de todo el organismo. Es singular entre los órganos debido a que recibe la mayor parte de su irrigación a través de la vena porta hepática, que transporta sangre venosa desde el tubo digestivo, el páncreas y el bazo. En consecuencia, el hígado se interpone en el camino de los vasos sanguíneos que transportan las sustancias absorbidas por el tubo digestivo. Esta posición le da al hígado la primera oportunidad de metabolizar estas sustancias, pero también lo convierte en el primer órgano expuesto a los compuestos tóxicos ingeridos. En condiciones normales el hígado tiene la capacidad de degradar o conjugar sustancias tóxicas a metabolitos inofensivos, pero esa capacidad puede ser superada y quedar lesionado el órgano (Ross, 2001).

Los componentes estructurales hepáticos incluyen a (Ross, 2001):

- ⊗ Los hepatocitos, organizados en trabéculas celulares.
- ⊗ Un estroma de tejido conectivo.
- ⊗ Vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y conductos biliares que transcurren por el estroma.
- ⊗ Capilares sinusoidales (sinusoides) entre las trabéculas de hepatocitos.

La estructura hepática, como unidad funcional, se puede describir de tres maneras: el **lobulillo “clásico”**, el **lobulillo portal** y el **ácino hepático**. El lobulillo hepático es la descripción tradicional de la organización del parénquima hepático, que se visualiza con relativa facilidad. Se basa en la distribución de las ramas de la vena portal y de la arteria hepática dentro del órgano y en las vías por las que transcurre la sangre, al perfundir las células del hígado. Se considera que el **lobulillo clásico** consiste en pilas de trabéculas de hepatocitos que se

anastomosan, de 1-2 células de espesor, separadas por el sistema anastomosado de sinusoides que perfunden el tejido con las sangres portal y arterial mezcladas. Mide alrededor de 2,0 x 7,0 mm. En el centro del lobulillo se encuentra una vénula bastante grande, la vénula hepática terminal (vena central), a la cual drenan los sinusoides. En los ángulos del hexágono que forma, se encuentran los espacios portales o de Kiernan (canales portales), compuestas por estroma de tejido conectivo laxo que se caracteriza por la presencia de tríadas portales, dicho tejido conectivo se continua con la cápsula fibrosa hepática; siendo el espacio portal limitado por los hepatocitos más externos del lobulillo. En el espacio portal, entre el estroma de tejido conectivo y los hepatocitos, se encuentra un pequeño espacio, el espacio de Mall; se cree que es uno de los sitios donde se origina la linfa dentro del hígado (Ross, 2001).

Así pues, el **lobulillo portal** destaca las funciones exocrinas hepáticas, siendo la principal funcional secreción de bilis. En consecuencia, el eje morfológico del lobulillo portal es el conducto biliar interlobulillar de la tríada portal del lobulillo “clásico”. Sus márgenes externos son líneas imaginarias trazadas entre las tres venas centrales más cercanas a la tríada portal, esto define un bloque de tejido aproximadamente triangular que incluye las porciones de tres lobulillos “clásicos” que secretan la bilis que drena al conducto biliar axial (Ross, 2001).

Por su parte, el **ácino hepático**, descrito como con forma romboidal o de romboide, es la unidad funcional más pequeña del parénquima hepático. El eje menor del ácino está definido por las ramas terminales de la tríada portal localizada a lo largo del límite de dos lobulillos “clásicos”. El eje mayor es la línea trazada entre las dos venas centrales más cercanas al eje menor. La disposición de los hepatocitos en cada ácino hepático se describe como tres zonas elípticas concéntricas que rodean el eje menor. En consecuencia (Ross, 2001):

- ⌘ La zona 1 es la más cercana al eje.
- ⌘ La zona 3 es la más alejada del eje y la más cercana a la vena terminal hepática.
- ⌘ La zona 2 se encuentra entre las zonas 1 y 3, pero no tiene límites definidos.

Las células de la zona 1 son las primeras en recibir nutrientes y toxinas por la

sangre y son las primeras en mostrar cambios morfológicos después de la oclusión de los conductos biliares (estasis biliar). Estas células también son las últimas en morir, cuando se deteriora la circulación, y las primeras en regenerar. Por otra parte, las células de la zona 3 son las primeras en mostrar necrosis isquémica (necrosis centrolobulillar), en situaciones de disminución de la perfusión, y las primeras en presentar acumulación de lípidos. Son las últimas en responder a las situaciones tóxicas y la estasis biliar. Entre las zonas 1 y 3 también se observan variaciones normales de la actividad enzimática, de la cantidad y tamaño de los organelos citoplasmáticos. Las células de la zona 2 tienen características funcionales y morfológicas y respuestas intermedias entre las zonas 1 y 3.

Los **hepatocitos** son células poligonales que miden 20-30 μm en cada dimensión, constituyen alrededor del 80% de la población hepática (Ross, 2001).

Los núcleos de los hepatocitos son grandes y esféricos y ocupan el centro de la célula; muchas células del hígado adulto son binucleadas; la mayor parte de las células son tetraploides (es decir, contienen cantidad $4n$ de ADN). En el nucleoplasma se encuentran grumos dispersos de heterocromatina y una banda diferenciada por debajo del envoltorio nuclear. En cada núcleo se encuentran 2 o más nucleolos bien desarrollados (Ross, 2001).

Los hepatocitos tienen una vida media relativamente larga, respecto a las células asociadas al aparato digestivo; duran unos 5 meses. Además, las células hepáticas tienen considerable capacidad de regeneración, cuando se pierde parte del parénquima por procesos hepatotóxicos, enfermedad o cirugía (Ross, 2001).

2.4 BIOTRANSFORMACIÓN DE FÁRMACOS

Al conjunto de caminos metabólicos por medio de los cuales los tejidos incrementan la polaridad de un fármaco se le denomina *biotransformación*; así pues podemos decir que la biotransformación de un fármaco consiste fundamentalmente en convertir un xenobiótico no polar en un compuesto soluble en agua, siendo este el mecanismo más común que usan los organismos para eliminar a los fármacos o a los tóxicos ambientales (Goodman, 2001).

El estudio de las reacciones que constituyen la biotransformación es de gran importancia, dado que nos permite entender los mecanismos por medio de los cuales los tejidos se defienden de los xenobióticos que logran penetrarlos y también

cómo es que en algunas ocasiones sucede lo contrario y se incrementa la toxicidad en el interior del cuerpo. Estas reacciones se agrupan en dos conjuntos (Goodman, 2001):

- ✖ Las reacciones de **Fase I** o reacciones de funcionalización y;
- ✖ Las reacciones de **Fase II** o reacciones de conjugación.

2.4.1 FASE I

La importancia de la Fase I radica en lograr la biotransformación de los grupos susceptibles que presentan los xenobióticos, a sufrir reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis para transformarlos en moléculas de mayor polaridad. Las transformaciones efectuadas incrementan la hidrofilia de los diversos compuestos y en consecuencia facilitan su excreción corporal (Goodman, 2001).

2.4.1.1 REACCIONES DE OXIDACIÓN

La oxidación es probablemente la reacción más común en el metabolismo de xenobióticos. Muchos compuestos son oxidados por un grupo no específico de enzimas denominado *sistema mono-oxigenasas de función mixta*, el cual se encuentra principalmente en los microsomas hepáticos, una fracción derivada del retículo endoplásmico liso. Para catalizar la formación de productos oxidados, el sistema requiere de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y oxígeno molecular (Figura 5). Uno de los aspectos importantes que hay que resaltar es que para iniciar la biotransformación se requiere que el sustrato interaccione con el citocromo, por lo que los diversos compuestos necesitan ser liposolubles para lograr alcanzar el sistema enzimático, asimismo se deben presentar grupos funcionales adecuados que puedan alterarse por reacciones enzimáticas y un tamaño mayor a 150 Daltons (Goodman, 2001).

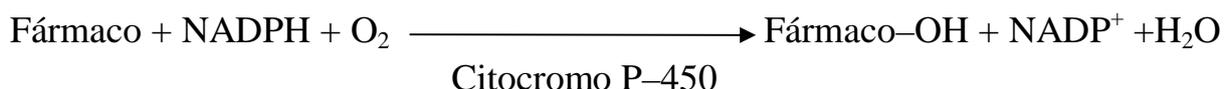


Figura 5. Reacción de oxidación (Goodman, 2001).

2.4.1.2 REACCIONES DE REDUCCIÓN

Los grupos carbonilos, azo y nitro son objetos de reducción, resultando en la formación de grupos hidroxilos y aminos más polares. Hay varias reductasas en el hígado, las cuales dependen de NADH o NADPH, que catalizan tales reacciones (Goodman, 2001).

Tabla 7. Reacciones de reducción presentes en la Fase I (Goodman, 2001).

	Sustrato	Producto	Enzima
Grupo azo	-N=N-	-NH ₂ + -NH ₂	Azoreductasa
Grupo nitro	R-NO ₂	R-NH ₂	nitroreductasa
Grupo aldehído	R-CHO	R-CH ₂ O	aldehídoreductasa

2.4.1.3 REACCIONES DE HIDRÓLISIS

Las hidrolasas constituyen un grupo de enzimas generalmente de baja especificidad, capaces de hidrolizar ésteres, amidas, lactonas, ésteres de fosfatos y sulfatos, disacáridos, glicósidos y péptidos. El grupo éster es el más lábil a sufrir tales reacciones. Recientemente, se ha demostrado que hay múltiples isoenzimas de las esterasas hepáticas, algunas de las cuales han sido caracterizadas. La hidrólisis de varios ésteres por la albúmina del suero ha sido también reportada. Así pues, las esterasas se clasifican en (Goodman, 2001):

- € *Ariesterasas*: hidrolizan ésteres aromáticos.
- € *Carboxilesterasas*: hidrolizan ésteres en general.
- € *Colinesterasa*: hidrolizan ésteres en cuya porción alquílica presentan una colina.
- € *Acetilesterasas*: hidrolizan ésteres cuya porción acilo es un acetilo.

2.4.2 FASE II

Las enzimas que participan en la Fase II generalmente catalizan la adición de pequeñas moléculas polares a los metabolitos o fármacos para hacerlos más polares. A estas enzimas se les denomina transferasas, ya que adicionan una

sustancia endógena a un xenobiótico o metabolito del mismo. Las reacciones más comunes son: glucuronidación, sulfatación, metilación, acetilación, conjugación con glutatión y con aminoácidos (Figura 6).

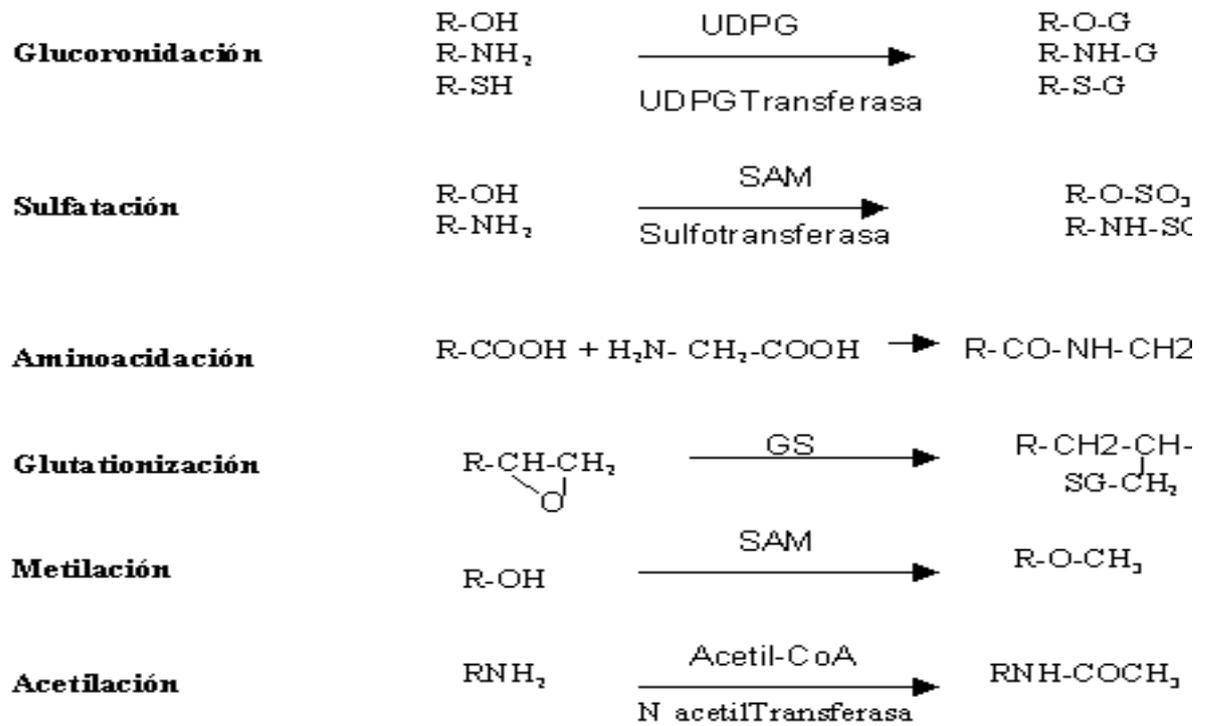


Figura 6. Reacciones de biotransformación de Fase II (Goodman, 2001).

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GENERALES:

- Determinar los efectos a nivel histopatológicos del 2,2,2-Tribromoetanol administrado por vía intraperitoneal en una aplicación única en dos especies diferentes de roedores: *Rattus norvegicus* y *Mus musculus*.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Evaluar la variación de los efectos histopatológicos del 2,2,2-Tribromoetanol con respecto al horario de administración (9 a 11 h y de 16 a 18 h).
- Evaluar la variación en el daño causado por el 2,2,2-Tribromoetanol dependiente del género de las especies estudiadas.

CAPÍTULO IV

HIPÓTESIS

- El TBE es un anestésico hepatotóxico por lo que se espera observar únicamente lesiones en el hígado y no en los demás órganos analizados.
- Dado que TBE es un anestésico de amplio uso en la investigación biomédica principalmente en animales de laboratorio “ratas (*Rattus norvegicus*) y ratones (*Mus musculus*)” y como los ratones poseen una resistencia mayor a los fármacos, es de esperar que las lesiones observadas sean mayores en ratas que en ratones.
- Puesto que en las hembras se ha observado un efecto protector de los estrógenos sobre los compuestos de degradación del TBE, se espera que las lesiones se presenten a altas dosis.
- Como los machos no poseen el efecto protector de los estrógenos a comparación con las hembras, las lesiones aparecerán a dosis menores para estos.
- Debido a que el proceso inflamatorio es un proceso de nocturnidad celular la variación en el daño ocasionado por el TBE en el hígado será mayor en el turno vespertino que en el matutino.

CAPÍTULO V

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

A. Material Biológico

Se utilizaron:

- * Ratones de ambos géneros de la especie *Mus musculus* cepa CFW dentro de un rango de peso de 22 a 30 g.
- * Ratas de la especie *Rattus norvegicus* cepa Wistar de ambos géneros dentro de un rango de peso de 180 a 250 g.

Los animales empleados en este experimento provienen del Bioterio de la Facultad de Química y no se han sometido previamente a experimentación. Las condiciones a las cuales se sometieron fueron las siguientes:

Tabla 8. Condiciones de almacenamiento de animales.

Condiciones	
Alimento	Agua y comida “ad libitum”
Humedad	40–70%
Temperatura	19–26 °C
Luz/Oscuridad	12/12 horas

B. Reactivos

- * 2,2,2-Tribromoetanol, pureza 96% (GC) (Fluka®)
- * Formaldehído (Merck®)
- * Etanol (Merck®)

C. Soluciones

- * Solución Salina Isotónica 0.9% (Baxter®)
- * Solución de formaldehído al 4%(Anexo A)

- * Solución de TBE al 2% (Anexo B)

D. Equipo de laboratorio, quirúrgico, curación y diversos.

- * Vasos de precipitados de 100, 500 y 1000 mL (Pyrex®)
- * Sonda esofágica de metal recta para rata (calibre 20m) (Miltex®)
- * Cajas de acrílico con tapa para ratas y ratones
- * Pisos de malla para cajas de ratas y ratones
- * Jeringas desechables (1, 3, 5 y 10 mL) de plástico con aguja de acero inoxidable calibre 25 (Plastipak®)
- * Estuche de disección (Surgeon®)
- * Cajas de petri de vidrio (Pyrex®)
- * Probeta de vidrio de 1000 mL (Pirex®)
- * Matraz volumétrico de 1000 mL (Pirex®)
- * Pipeta volumétrica de 200 mL (Pirex®)
- * Espátula de acero inoxidable
- * Balanza granataria
- * Marcadores indelebles (Berol®)
- * Envases de plástico de 50 y 300 mL (Poliurel®)
- * Microtomo (Microm®)
- * Microscopio fotónico (Zeiss®)

5.2 METODOLOGÍA.

5.2.1 EXPERIMENTO A (administración en ratas).

- a. Se formaron 4 grupos de manera aleatoria con $n = 6$
- b. Se pesaron y marcaron los animales para cada una de las dosis de TBE que se administraron, de acuerdo a la siguiente dosificación (Tabla 8):

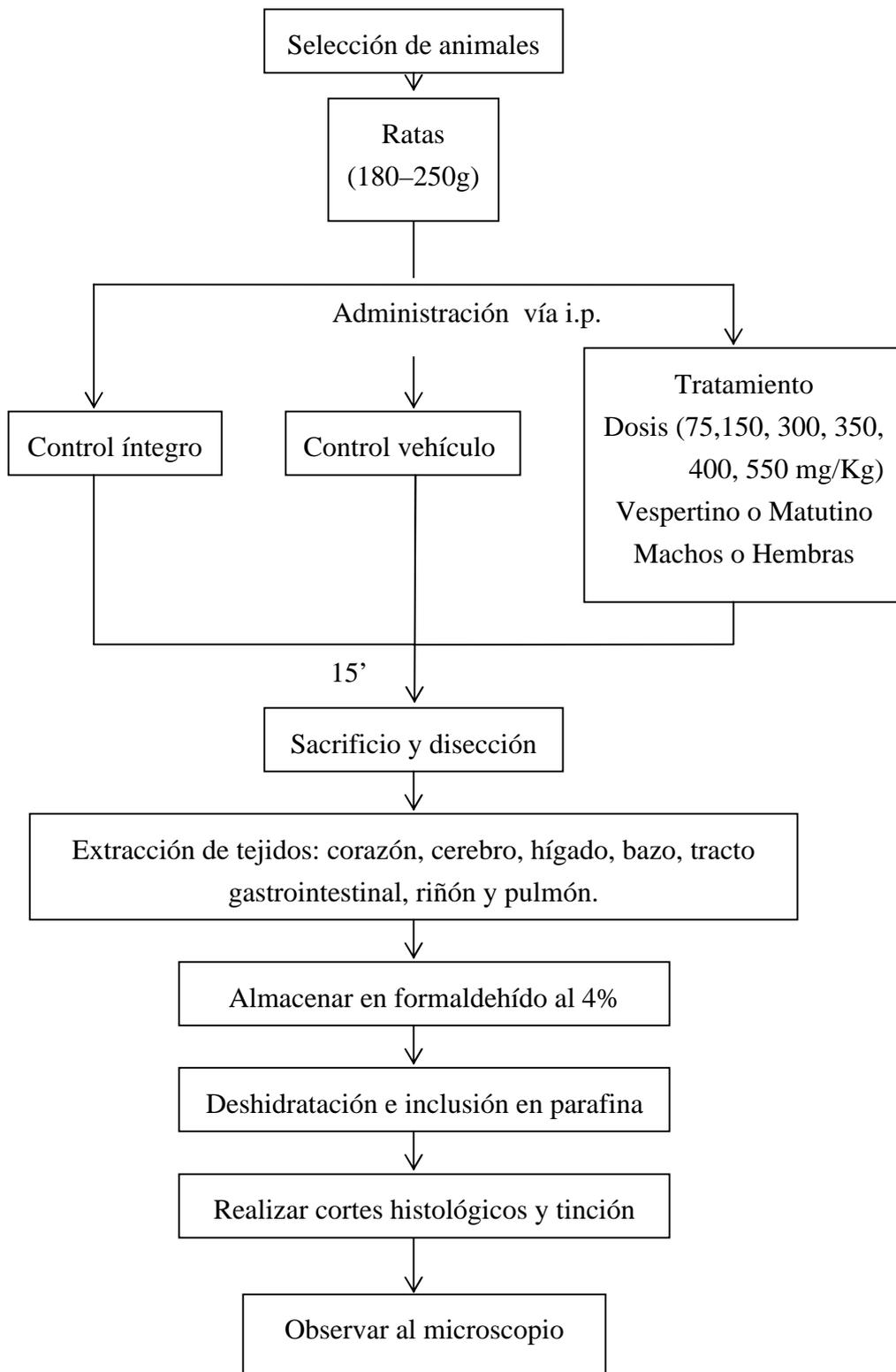
Tabla 9. Dosificación para el experimento A.

Dosis TBE (mg/Kg)	Horario de administración	Género
75	Matutino (9 a 11 horas)	Macho
150		Hembra
300		
350	Vespertino (16 a 18 horas)	Macho
400		Hembra
550		

- c. Se administró el TBE por vía intraperitoneal de forma aleatoria a cada uno de los animales; se dejaron pasar 15 minutos.
- d. Se administraron a dos animales con etanol al 2% a razón de 1 mL / 100 g de peso para utilizar como control vehículo, y se dejaron pasar 15 minutos.
- e. Al término de este periodo de tiempo se sacrificaron a los animales por dislocación cervical (Anexo C).
- f. Se sacrificaron dos animales sin tratamiento (control íntegro) por dislocación cervical para utilizar como referencia (Anexo C).
- g. Se diseccionó a cada animal y se extrajeron los siguientes tejidos: corazón, cerebro, hígado, bazo, tracto gastrointestinal, riñones y pulmones.
- h. Se colocaron dichos órganos en un recipiente con 150 mL de solución de formaldehído al 4%.
- i. Se deshidrataron los tejidos mediante el paso consecutivo por soluciones de etanol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% y xilol al 100%. Se impregnaron en parafina a 60 °C durante 30 minutos una primera vez y un segunda igual en parafina a 60 °C durante 2 horas; posteriormente fueron incluidos en bloques de parafina.
- j. Se realizaron cortes histológicos de 5 μm de grosor en microtomo.

- k. Los cortes se dispusieron en un soporte de vidrio sin fondo, con una preparación en cada ranura. Se sumergieron en el primer baño de xileno durante 3 minutos.
- l. Se pasaron al segundo baño de xileno por 2 ó 3 minutos, dejando escurrir el exceso de solución.
- m. Se llevaron al primer baño de alcohol etílico absoluto durante 3 minutos.
- n. Se sumergieron en un baño de alcohol etílico al 95% durante 2 minutos, el corte se lavó con agua de 3 a 5 minutos.
- o. Se repitió la operación pero utilizando agua destilada.
- p. Se tiñeron de 4 a 8 minutos con Hematoxilina de Alumbre.
- q. Se aclararon sumergiéndose de 3 a 4 veces la preparación en una solución Alcohol Ácido al 1% (1 mL de ácido clorhídrico concentrado para 99 mL de alcohol etílico al 80%).
- r. Se enjuagaron con agua.
- s. Se azulearon poniendo la preparación en el sustituto de Scott para agua corriente hasta que los cortes tuvieron un aspecto azulado.
- t. Se enjuagaron en agua.
- u. Se tiñeron con Eosina Y acidificada al 1% de 15 segundos a 2 minutos, según la intensidad deseada. Se enjuagaron rápidamente con alcohol etílico al 80% y se volvieron a teñir con Eosina 30 segundos más.
- v. Se deshidrataron por paso sucesivo en 3 ó 4 baños de alcohol etílico absoluto con agitación, siendo cada uno de 10 a 15 segundos cada vez.
- w. Se pasaron por 2 ó 3 baños de xileno de 15 a 20 segundos en cada uno.
- x. Se observaron al microscopio fotónico y se realizaron anotaciones.

DIAGRAMA DE FLUJO.



5.2.2 EXPERIMENTO B (administración en ratones).

- a. Se distribuyeron y agruparon de forma aleatoria a los animales para cada una de las dosis de TBE a administrar, donde cada uno de los 4 grupos fue de n = 6, de acuerdo a la siguiente dosificación (Tabla 9):

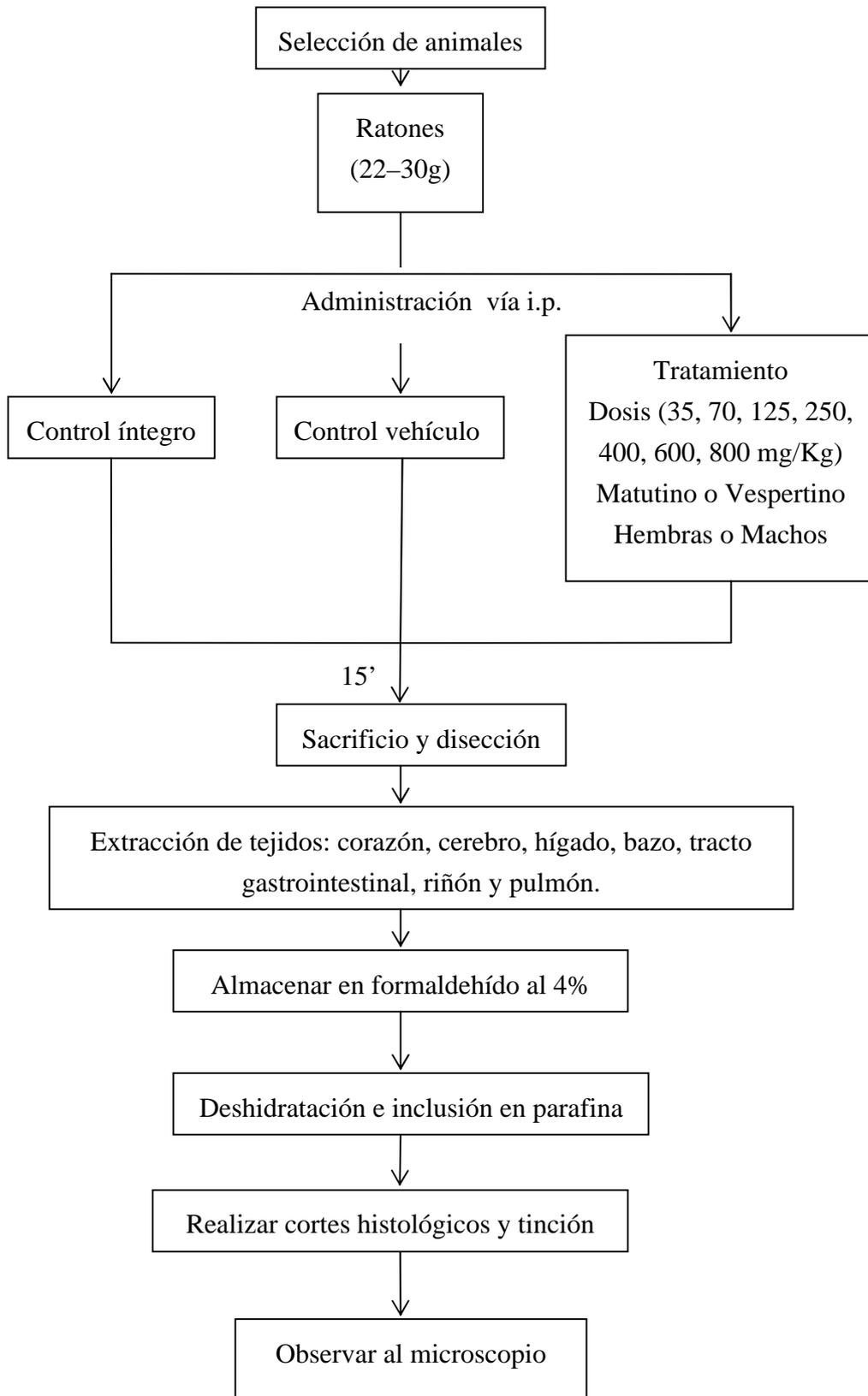
Tabla 10. Dosificación para el experimento B.

Dosis TBE (mg/Kg)	Horario de administración	Género
35	Matutino (9 a 11 horas)	Macho
70		Hembra
125		
250	Vespertino (16 a 18 horas)	Macho
400		
600		Hembra
800		

- b. Se administró el TBE aleatoriamente por vía intraperitoneal a cada uno de los animales; se dejaron pasar 15 minutos.
- c. Se administraron a dos animales con etanol al 2% a razón de 1 mL / 100 g de peso para utilizar como control vehículo, se dejaron pasar 15 minutos.
- d. Al término de este periodo de tiempo se sacrificó a los animales por dislocación cervical (Anexo C).
- e. Se sacrificaron dos animales sin tratamiento (control íntegro) para utilizar como referencia por dislocación cervical (Anexo C).
- f. Se diseccionó a cada animal con la finalidad de extraer los siguientes tejidos: corazón, cerebro, hígado, bazo, tracto gastrointestinal, riñones y pulmones.
- g. Se colocaron dichos órganos en un recipiente con 30 mL de solución de formaldehído al 4%.
- h. Se deshidrataron los tejidos mediante el paso consecutivo por soluciones de etanol al 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% y xilol al 100%. Se impregnaron en parafina a 60 °C durante 30 minutos una primera vez y un segunda igual en parafina a 60 °C durante 2 horas; posteriormente fueron incluidos en bloques de parafina.
- i. Se realizaron cortes histológicos de 5 µm de grosor en microtomo.

- j. Los cortes se dispusieron en un soporte de vidrio sin fondo, con una preparación en cada ranura. Se sumergieron en el primer baño de xileno durante 3 minutos.
- k. Se pasaron al segundo baño de xileno por 2 ó 3 minutos, dejando escurrir el exceso de solución.
- l. Se llevaron al primer baño de alcohol etílico absoluto durante 3 minutos.
- m. Se sumergieron en un baño de alcohol etílico al 95% durante 2 minutos, el corte se lavó con agua de 3 a 5 minutos.
- n. Se repitió la operación pero utilizando agua destilada.
- o. Se tiñeron de 4 a 8 minutos con Hematoxilina de Alumbre.
- p. Se aclararon sumergiéndose de 3 a 4 veces la preparación en una solución Alcohol Ácido al 1% (1 mL de ácido clorhídrico concentrado para 99 mL de alcohol etílico al 80%).
- q. Se enjuagaron con agua.
- r. Se azulearon poniendo la preparación en el sustituto de Scott para agua corriente hasta que los cortes tuvieron un aspecto azulado.
- s. Se enjuagaron en agua.
- t. Se tiñeron con Eosina Y acidificada al 1% de 15 segundos a 2 minutos, según la intensidad deseada. Se enjuagaron rápidamente con alcohol etílico al 80% y se volvieron a teñir con Eosina 30 segundos más.
- u. Se deshidrataron por paso sucesivo en 3 ó 4 baños de alcohol etílico absoluto con agitación, siendo cada uno de 10 a 15 segundos cada vez.
- v. Se pasaron por 2 ó 3 baños de xileno de 15 a 20 segundos en cada uno.
- w. Se observaron al microscopio fotónico y se realizaron anotaciones.

DIAGRAMA DE FLUJO.



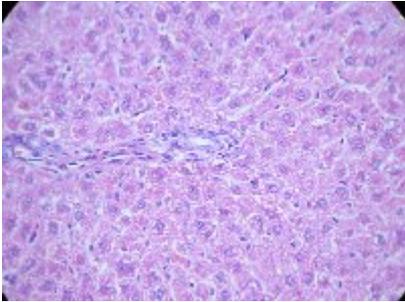
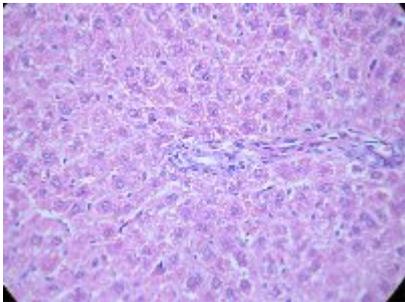
CAPÍTULO VI

RESULTADOS

Los órganos que se analizaron en este experimento fueron: corazón, cerebro, hígado, bazo, tracto gastrointestinal, riñones y pulmones; y en ninguno de ellos se encontró lesión alguna a excepción del hígado para cada uno de los casos. Enseguida se muestran las observaciones realizadas en hígado; pudiéndose ver las dosis a las que se presentan dichas lesiones y el tipo de lesión para cada uno de ellos.

En la tabla 11 se observa que para el control íntegro y el control vehículo de las ratas tanto machos como hembras en ambos horarios no hubo presencia de cambio patológico aparente.

Tabla 11. Control íntegro y control vehículo de ratas hembras y machos en turnos de administración matutino (9 a 11 horas) y vespertino (16 a 18 horas).

Tratamiento	Observación	Imagen
Control íntegro (Sin tratamiento)	No se observó cambio patológico aparente	
Control vehículo (EtOH al 2%)	No se observó cambio patológico aparente	

Así pues, en la tabla 12 y la tabla 13 se presentan las lesiones observadas al grupo de ratas hembras en ambos turnos de administración, pudiéndose observar que dichas lesiones aparecen a dosis de 400 y 550 mg/Kg.

Tabla 12. Ratas hembras administradas en un horario matutino (9 a 11 horas).

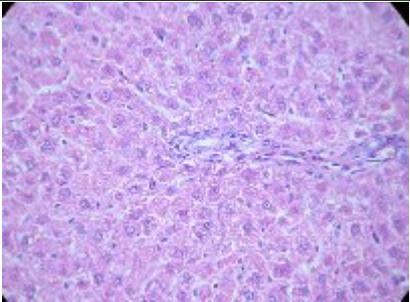
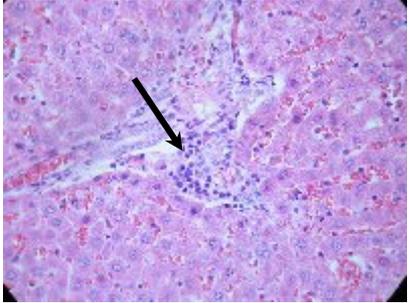
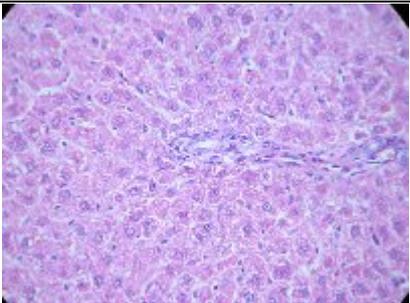
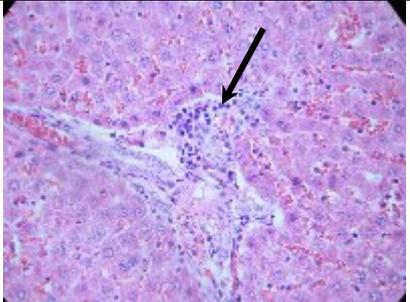
Tratamiento Dosis TBE (mg/Kg)	Observación	Imagen
75 150 300 350	No se observó cambio patológico aparente	
400 550	Se observa una hiperplasia compatible en los conductos biliares acompañada de una discreta reacción inflamatoria constituida por linfocitos	

Tabla 13. Ratas hembras administradas en un horario vespertino (16 a 18 horas).

Tratamiento Dosis TBE (mg/Kg)	Observación	Imagen
75 150 300 350	No se observó cambio patológico aparente	
400 550	Se observa una hiperplasia compatible en los conductos biliares acompañada de una discreta reacción inflamatoria constituida por linfocitos	

Como se puede observar en la tabla 14 y en la tabla 15 donde se hace la

comparación de las ratas machos con turnos de administración matutino y vespertino respectivamente, nos damos cuenta de que las dosis a las que presentan lesiones son de 350, 400 y 550 mg/Kg para ambos turnos de administración.

Tabla 14. Ratas machos administradas en un horario matutino (9 a 11 horas).

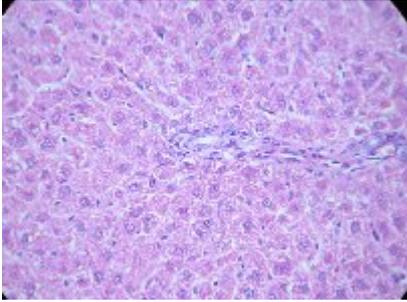
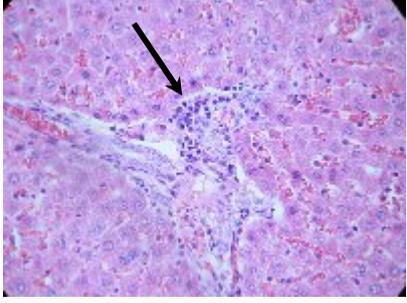
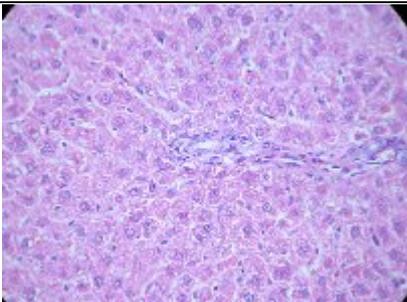
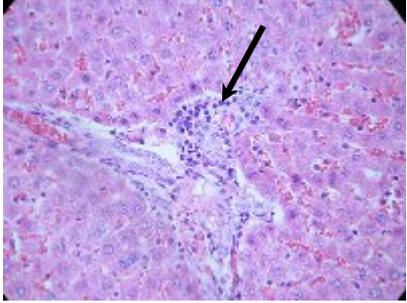
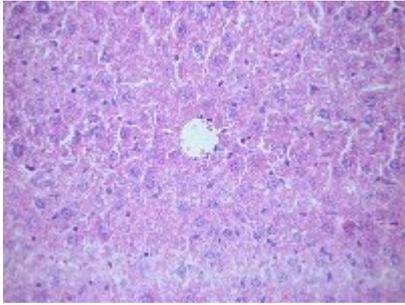
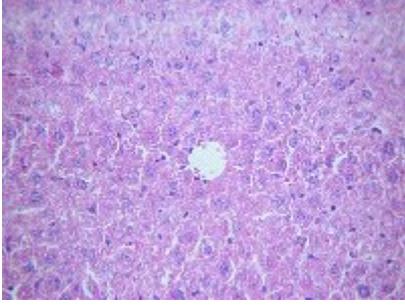
Tratamiento Dosis TBE (mg/Kg)	Observación	Imagen
75 150 300	No se observó cambio patológico aparente	
350 400 550	Se observa una hiperplasia compatible en los conductos biliares acompañada de una discreta reacción inflamatoria constituida por linfocitos	

Tabla 15. Ratas machos administradas en un horario vespertino (16 a 18 horas).

Tratamiento Dosis TBE (mg/Kg)	Observación	Imagen
75 150 300	No se observó cambio patológico aparente	
350 400 550	Se observa una hiperplasia compatible en los conductos biliares acompañada de una discreta reacción inflamatoria constituida por linfocitos	

Por su parte se observa en la tabla 16 donde se hace la comparación entre el grupo íntegro (sin tratamiento) y el grupo vehículo (ETOH al 2%) de los ratones, que corresponden tanto al género femenino como masculino en los horarios matutino (9 a 11 horas) y vespertino (16 a 18 horas); tanto hembras como machos en ambos horarios de administración no presentan cambio patológico aparente.

Tabla 16. Control íntegro y control vehículo de ratones hembras y machos en turnos de administración matutino (9 a 11 horas) y vespertino (16 a 18 horas).

Tratamiento	Observación	Imagen
Control íntegro (Sin tratamiento)	No se observó cambio patológico aparente	
Control vehículo (EtOH al 2%)	No se observó cambio patológico aparente	

En la tabla 17 donde se presenta al grupo de ratones del género femenino para un horario de administración matutino (9 a 11 horas) se puede observar que las lesiones se presentan a partir de una dosis de 600 y 800 mg/Kg; de igual manera se observa en la tabla 18 que corresponde al grupo de ratones hembras para un horario de administración vespertino (16 a 18 horas) que la dosis a la cual se presentan las lesiones es también en 600 y 800 mg/Kg.

Tabla 17. Ratones hembras administradas en turno matutino (9 a 11 horas).

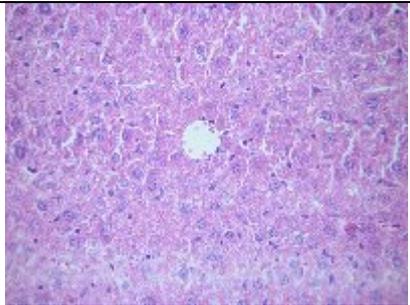
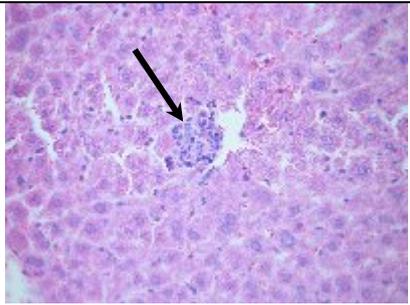
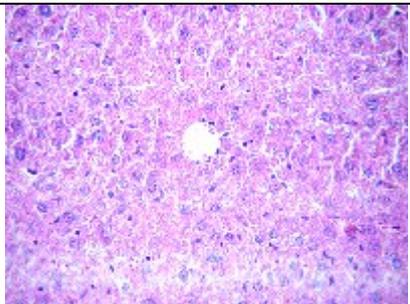
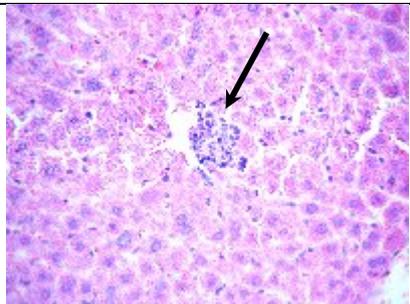
Tratamiento Dosis TBE (mg/Kg)	Observación	Imagen
35 70 125 250 400	No se observó cambio patológico aparente	
600 800	Se observan múltiples focos inflamatorios constituidos por linfocitos, neutrófilos y macrófagos	

Tabla 18. Ratones hembras administradas en turno vespertino (16 a 18 horas).

Tratamiento Dosis TBE (mg/Kg)	Observación	Imagen
35 70 125 250 400	No se observó cambio patológico aparente	
600 800	Se observan múltiples focos inflamatorios constituidos por linfocitos, neutrófilos y macrófagos	

En la tabla 19 y la tabla 20 se observan las lesiones presentes en los grupos de ratones machos con turnos de administración matutino y vespertino

respectivamente, dándonos cuenta de que las dosis a las que presentan lesiones son de 400, 600 y 800 mg/Kg para ambos turnos de administración.

Tabla 19. Ratones machos administrados en turno matutino (9 a 11 horas).

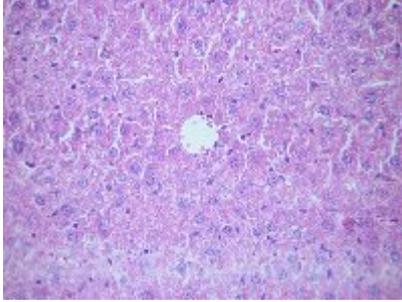
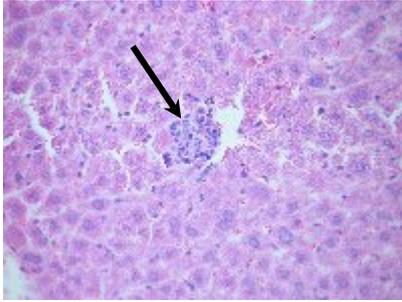
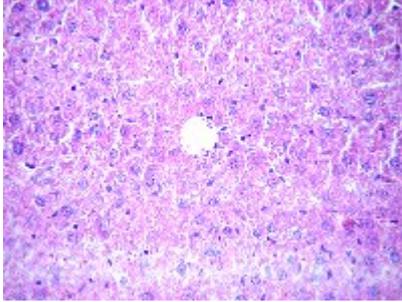
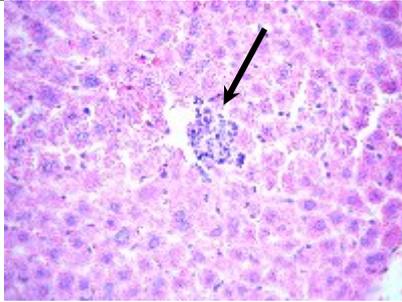
Tratamiento Dosis TBE (mg/Kg)	Observación	Imagen
35 70 125 250	No se observó cambio patológico aparente	
400 600 800	Se observan múltiples focos inflamatorios constituidos por linfocitos, neutrófilos y macrófagos	

Tabla 20. Ratones machos administrados en turno vespertino (16 a 18 horas).

Tratamiento Dosis TBE (mg/Kg)	Observación	Imagen
35 70 125 250	No se observó cambio patológico aparente	
400 600 800	Se observan múltiples focos inflamatorios constituidos por linfocitos, neutrófilos y macrófagos	

CAPÍTULO VII

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se sabe que el 2,2,2-Tribromoetanol es un anestésico que actualmente se está empleando en gran medida en la investigación biomédica debido a la baja interacción con los modelos de estudio en que es empleado, así como a las mínimas lesiones que presenta su uso en estudios de administración aguda, aunque cabe mencionar que bien se sabe que es un producto hepatotóxico a dosis entre 225 y 450 mg/Kg (Thompson, 2002; Norris, 1983), lo cuál se corroboró en este trabajo. Así pues nos dimos cuenta de que el producto básicamente causa daño en el hígado (hepatotoxicidad), ya que al analizar los órganos de estudio: corazón, cerebro, hígado, bazo, tracto gastrointestinal, riñones y pulmones; sólo se observaron lesiones en el hígado constituidas básicamente por múltiples focos inflamatorios producidos por linfocitos, neutrófilos y macrófagos.

En general podemos observar que en ninguno de los casos estudiados hay modificación alguna con respecto al horario en el que se administró el fármaco, esto se debe a que la toxicidad del compuesto causante de las lesiones en el hígado no depende en ninguno de ellos del ciclo circadiano que pudiese ser el que lo modificase, otros autores indican que no ocurre cambio en la aparición de lesiones en diferentes horarios de administración tras la aplicación de medicamentos como la ketamina (Rebuelta, 2002). Así, tenemos que para el caso del grupo de ratas hembras se tiene que en ambos turnos de administración (tablas 12 y 13) las lesiones aparecen a una dosis de 400 y 550 mg/Kg; por su parte para el grupo de ratas machos igual administradas en los dos horarios (tablas 14 y 15) las lesiones se presentan a las dosis de 350, 400 y 550 mg/Kg. A su vez, para el caso de los ratones se observa un comportamiento similar, es decir, en ninguno de ellos se ve afectado por el horario de administración; para el grupo de ratones hembras tenemos que la aparición de lesiones es a dosis de 600 y 800 mg/Kg (tablas 17 y 18), mientras que para el grupo de ratones machos son en 400, 600 y 800 mg/Kg (tablas 19 y 20) en ambos turnos de administración.

Esto es debido a que el proceso mediante el cual es metabolizado no depende de la hora del día en que se administre; como se sabe la mayoría de los fármacos son metabolizados o biotransformados generalmente por una serie de reacciones catalogadas en dos fases; la Fase I, también conocida como de funcionalización, y la Fase II o denominada de conjugación. Para el caso del 2,2,2-Tribromoetanol tenemos que este compuesto es biotransformado para su eliminación en la Fase II en su mayoría mediante la glucuronidación; reacción que consiste en la adición de un grupo glucoronil en un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo del compuesto (Figura 6) (Katzung, 2005; Goodman, 2001). Aunque el compuesto también puede ser metabolizado por reacciones de Fase I mediante el Citocromo P450, dando compuestos de más fácil eliminación debido a su simplicidad. Sin embargo, se observó que cuando se llevan a cabo las reacciones de Fase I se obtienen compuestos de alto grado tóxico e irritación para el organismo puesto que los productos obtenidos son el dibromoacetaldehído y el ácido bromhídrico (Figura 7) (Lieggi, 2005; Norris, 1983).

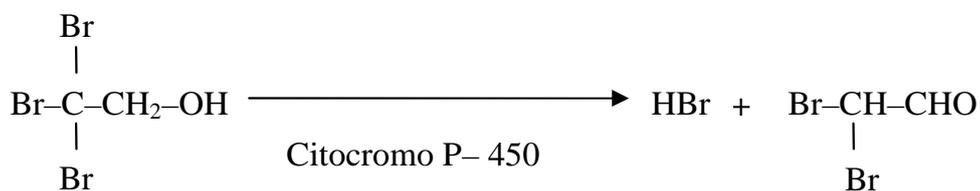


Figura 7. Reacción de degradación del 2,2,2-Tribromoetanol (Norris, 1983).

Así pues, se observa que en todos los casos se tiene que las hembras presentan las lesiones a mayores dosis que los machos. Para el grupo de ratas del género femenino a una dosis de 400 mg/Kg (tablas 12 y 13); y masculino en 350 mg/Kg (tablas 14 y 15). Para el grupo de ratones tenemos que para hembras es de 600 mg/Kg (tablas 17 y 18); y para machos en 400 mg/Kg (tablas 19 y 20) y esto es porque las hembras poseen cierta protección dada por la presencia de estrógenos que como se ha reportado éstos juegan un papel importante en lo que se refiere a la desactivación del retículo endoplásmico y por consiguiente la inactivación del

Citocromo P450 que ocasiona la producción de los compuestos de degradación del 2,2,2-Tribromoetanol y por lo mismo una mayor resistencia a los daños ocasionados por éste (Norris, 1983).

Por otra parte, se sabe que la variación en la biotransformación de los fármacos de acuerdo a las especies está relacionada en la variabilidad biológica de las mismas, así como en las rutas metabólicas que puede seguir a través de los organismos correspondientes a ciertas especies, o bien, conforme a las reacciones que pueden presentar algunas; por ejemplo se ha notado que los ratones poseen un metabolismo más acelerado que el caso de las ratas, lo cual ocasiona que la dosificación de los fármacos para esta especie sea mayor que para las ratas (Levine, 2005) como se pudo observar en este trabajo.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

- El TBE es un anestésico hepatotóxico en administraciones agudas.
- Las dosis a las cuales se observan daños hepáticos dependen del género al que se administren; para el caso de las ratas hembras es de 400 y 550 mg/Kg, mientras que para los machos es de 350, 400 y 550 mg/Kg.
- En el caso de los ratones también depende del género ya que para los machos las dosis en las que se presentan los efectos hepatotóxicos son de 400, 600 y 800 mg/Kg, mientras que para las hembras son en 600 y 800 mg/Kg.
- La hepatotoxicidad del compuesto no depende en ninguno de los casos del horario al que se administre, ni para ratas ni ratones.

ANEXOS

A. Preparación de la solución de formaldehído al 4%

1. En un matraz volumétrico de 1000 mL colocar 40 mL de formol utilizando dos alícuotas de 20 mL.
2. Aforar con agua destilada.

B. Preparación de la solución de TBE al 2% (Núñez, 2008).

1. Pesar 2g de 2,2,2-Tribromoetanol y disolver en 2 mL de etanol.
2. Adicionar a un matraz volumétrico de 100 mL cubierto con papel aluminio para evitar la degradación y aforar con solución salina isotónica al 0.9%
3. Transvasar a un envase de plástico y cubrir con papel aluminio.
4. Almacenar en refrigeración a 4 °C hasta el momento de su utilización.

C. Dislocación cervical.

1. Colocar al animal en una superficie plana.
2. Tomar la porción del cuello del animal justo atrás de la cabeza con los dedos pulgar e índice, de tal manera que su cabeza quede apoyada en la superficie.
3. Con la otra mano tomar de la base de la cola y jalar firmemente hasta escuchar el desprendimiento de las vértebras.
4. Se confirmará colocando el dedo índice entre la cabeza y el cuerpo, sintiendo el espacio entre ambos.

GLOSARIO

Anastomosarse. Unirse formando anastomosis

Anastomosis. Unión de los elementos anatómicos con otros de la misma planta o del mismo animal.

Autólisis. Rotura total o parcial de una célula por enzimas que ella misma ha producido.

Biodisponibilidad. Término farmacéutico que alude a la porción de la dosis, de un fármaco o nutriente administrado de manera exógena, que llega hasta el órgano o tejido en el que lleva a cabo su acción.

Biotransformación. Es el conjunto de caminos metabólicos por medio de los cuales los tejidos incrementan la polaridad de un fármaco.

Cepa. En microbiología y genética, una cepa es una variante genotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.

Citocromo P450. Abreviado CYP y P450 es una enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas encontradas en bacterias y eucariontes. Las proteínas del citocromo P450 usan un amplio rango de compuestos exógenos y endógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas. Por lo general, forman parte de cadenas de transferencia de electrones con multicomponentes denominadas sistemas contenedoras de P450. La reacción más común catalizada por el citocromo P450 es una reacción mono-oxigenasa, es decir, la inserción de un átomo de oxígeno molecular en un sustrato orgánico a la vez que el otro átomo de oxígeno es reducido a agua.

Difusión transplacentaria. Paso de los medicamentos a través de la placenta.

Eclampsia. Aparición de episodios convulsivos generalizados durante el embarazo, parto y puerperio sin que haya epilepsia, hemorragia cerebral, etc. ; es una fase posterior a la preeclampsia.

Endotelio. Tejido formado por células aplanadas dispuestas en una sola capa. Reviste interiormente las paredes de algunas cavidades como la pleura y los vasos sanguíneos.

Estroma. Trama o armazón de un tejido, que sirve para sostener entre sus mallas los elementos celulares.

Farmacocinética. Estudio de la absorción, distribución, transformación y eliminación de un medicamento en un organismo.

Farmacodinamia. Estudio de los mecanismos de acción de un medicamento en el interior de un organismo.

Fibrosis. Desarrollo en un órgano de un exceso de tejido fibroso.

Hiperplasia. Excesiva multiplicación de células normales en un órgano o en un tejido.

Hipocondrio. Cada una de las dos partes laterales de la región epigástrica, situada debajo de las costillas falsas.

Histopatología. Estudio de los tejidos animales o vegetales enfermos.

Linfocito. Célula linfática, variedad de leucocito, originada en el tejido linfoide o la médula ósea y formada por un núcleo único, grande, rodeado de escaso citoplasma. Interviene muy activamente en la reacción inmunitaria.

Macrófago. Fagocito perteneciente al sistema reticuloendotelial caracterizado por su gran tamaño.

Mesotelio. Variedad de endotelio que recubre las cavidades serosas.

Mordente. Es toda sustancia química que fija el colorante de tal modo que el material teñido lo retiene.

Neutrófilo. Granulocito con función fagocitaria propio de la sangre.

Parénquima. Elemento esencial específico o funcional de un órgano, generalmente glandular, en distinción de la estroma o tejido intersticial.

Preeclampsia. Complicación del embarazo caracterizada por hipertensión, proteinuria y, a veces, edema; suele ocurrir después de la 20ª semana.

Serosa. Es una membrana suave y lisa compuesta por una fina capa de células que excretan el fluido seroso. Las serosas perfilan y contienen numerosas cavidades dentro de las cuales el fluido reduce la fricción del moviendo muscular.

Taxón. Es un grupo de organismos emparentados, que en una clasificación dada han sido agrupados, asignándole al grupo un nombre en latín, una descripción, y un "tipo" .

Tejido conectivo. También llamado tejido conjuntivo, es un conjunto heterogéneo de tejidos orgánicos que comparten un origen común. Concurrer en la función primordial de sostén e integración sistémica del organismo.

Tejido intersticial. Conjunto de tejido heterogéneo que se encuentra ubicado en el intersticio o espacio entre las células.

Xenobiótico. Compuesto químico que es ajeno a un organismo vivo.

CAPÍTULO IX

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amir S, Stewart J., Ressetting of the circadian clock by a conditions stimulus. *Nature*. 1996, Feb. 379:540-545.
2. Bowman WC. Farmacología: Bases bioquímicas y patológicas: Aplicaciones clínicas. Nueva editorial interamericana. México, 1984.
3. Cannon JG. Pharmacology for chemists. 2ª edición. Oxford University Press. Estados Unidos, 2006. pp. 54
4. Douglas W. Rectal Tribrom-ethanol (AVERTIN, BROMETHOL) in eclamptic toxemia. *Canad M A J*. 1953, Sept; 69: 253-57.
5. Flecknell PA. Anestesia de Animales de Laboratorio. Introducción Práctica para Investigadores y Técnicos. 2ª edición. Editorial Acribia, S.A. España, 1998. pp. 1-73.
6. Gandhi M, Aweeka F, Greenblatt RM, Blasckle TF. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004; 44: 499-523.
7. Golombek, D.A. El ciclo sueño vigilia, *Cronobiología humana*. Buenos Aires: Editorial Universidad de Quilmes, 2002.
8. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Capítulo 1. Farmacocinética: dinámica de la absorción, distribución y eliminación de fármacos. 10ª edición. Editorial Mac Graw Hill. México, 2001. pp. 12-18
9. Gómez AE, Naranjo EB, Bustamante R, Salas AL. Manual para el uso y manejo de animales de laboratorio. Rata y Ratón. UNAM, FQ. México, 2001.
10. Gonzalo JM, Ávila I, San Ramón F, Orden A, Sánchez-Valverde MA. Cirugía veterinaria. Editorial Interamericana McGraw-Hill. España, 1994. pp. 445-481, 605-619.
11. Guyton AC. Tratado de fisiología médica. 10ª edición. Editorial Mac Graw Hill. México, 2000.
12. Heffess C, Mullick F. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Washington DC, 2005.
13. Howard ME. Modern Drug Encyclopedia and Therapeutic Index. Drug Publications, INC. N.Y., 1952. pp. 88

14. Hrapkiewicz K, Medina L, Colmes DD. Clinical Laboratory Animal Medicine: An Introduction. Editorial Iowa State University Press/AMES. USA, 1998. pp. 3-31.
15. Katzung BG. Farmacología Básica y Clínica. Capítulos 2. Receptores de Fármacos y farmacodinamia; 4. Biotransformación de fármacos; y 25. Anestésicos generales. 9ª edición. Editorial El Manual Moderno. México, 2005. pp. 29-31; 51-63 y 403-404.
16. Krasowski MD, Harrison NL. The actions of ether, alcohol and alkane general anaesthetics on GABAA and glycine receptors and the effects of TM2 and TM3 mutations. *Br J Pharmacol.* 2000; 129. 731-743.
17. Leung C, Chan K, Poon R, O'Brien PJ. Role of carbonyl metabolizing enzymes in the anesthesia and hepatotoxicity induced by chloral hydrate and tribromoethanol in vivo and in vitro. *Enzymol Mol Biol Carbonyl Metab.* 2006; 171-180, 208-216.
18. Levine RR. Levine's pharmacology: drug actions and reactions. Capítulos 7. General principles of the quantitative aspects of drug action; y 9. Factors modifying the effects of drugs in individuals. 7ª edición. Editorial Taylor & Francis, Boston, 2005. pp. 169-203, 241- 259.
19. Lewis RJ. Hawley's Condensed Chemical Dictionary. 14ª edición. John Wiley & Sons, INC. USA, 2001. pp.583-584, 1117.
20. Lieggi CC, et al. An Evaluation of Preparation Methods and Storage Conditions of Tribromoethanol. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2005, Jan; 44(1): 11-16.
21. Lieggi CC, et al. Efficacy and Safety of Stored and Newly Prepared Tribromoethanol in ICR mice. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2005, Jan; 44(1): 17-22.
22. Litter M. Farmacología Experimental y Clínica. 7ª edición. Editorial El Ateneo. Argentina, 1986. pp. 38-68.
23. Martindale. The Extra Pharmacopeia. 26ª edición. The Pharmaceutical PRESS. London, 1973. pp. 852-854.
24. Netter FH, Atlas de anatomía humana. Editorial Harcourt. Barcelona, España, 1996.
25. Nicol T, Vernon-Roberts B, Quantock DC. Protective effect of Oestrogens against the toxic decomposition products of Tribromoethanol. *Nature.* Dec, 1965, 208:1098-1099.
26. Norma Oficial Mexicana NOM-068-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. SSA. México, 1999.

27. Norris ML, Turner WD. An evaluation of tribromoethanol (TBE) as an anaesthetic agent in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Lab Anim*. 1983; 17, 324-329.
28. Núñez EE. Determinación del margen de seguridad e índice terapéutico del 2,2,2-Tribromoetanol en rata (*Rattus norvegicus*) y ratón (*Mus musculus*), administrado por vía intraperitoneal. UNAM, FQ. México, 2008
29. Papaioannou VE, Fox JG. Efficacy of Tribromoethanol Anesthesia in Mice. *Lab Anim Sci*. 1993, Apr; 43(2):189-92.
30. Rebuelta M, Ambros L, Montoya L, Bonafine R. Treatment-Time-Dependent difference of ketamine pharmacological response and toxicity in rats. *Chronol Int*. 2002. Vol. 19, No. 5. pp. 937-945
31. Reid WC, Carmichael KP, Srinivas S, Bryant JL. Pathologic Changes Associated with Use of Tribromoethanol (Avertin) in the Sprague Dawley Rat. *Lab Anim Sci*. 1999, Dec; 49(6):665-7.
32. Ross, Romrell, Kaye. Histología, texto y atlas color. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. México, 2001. pp. 278-280, 314-315, 494, 528-540, 556-558
33. Ruesga ZE, Estrada GJ. Cronobiología. Su aplicación en Cardiología. *Revista Mexicana de Cardiología*. 1999, Oct-Dec; 10(4): 143-145.
34. Santos RS. "Avertin" in the treatment of pre-eclampsia and eclampsia. *J Med*. 1963; 50, 1072-4.
35. Spectral Data Base, 2008. http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
36. Sterz R, Hermes M, Peper K, Bradley RJ. Effects of halogenated derivatives of ethanol on the nicotine acetylcholine receptor. *Physiol Inst*. 1981; 230 (1-2): 434-438.
37. Thompson JS, Brown SA, Khurdayan V, Zeynalzadedan A, Sullivan PG, Scheff SW. Early effects of tribromoethanol, ketamine/xylazine, pentobarbitol, and isoflurane anesthesia on hepatic and lymphoid tissue in ICR mice. *Comparative Medicine*. 2002. February 52: 63-67.
38. Weiss J, Zimmerman F. Tribromoetanol (Avertin) as an anaesthetic in mice. *Laboratory Animals*. 1999. 33, 192-193.
39. William VL, Wynn ES. Veterinary Anesthesia. Editorial Lea & Febiger. Philadelphia, 1984. pp. 199-211, 279-305.