



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Evaluación de los cambios histológicos en diferentes órganos de ratas tratadas con carbamatos de nueva síntesis.”

T E S I S

Que para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presenta:

Ricardo Alfonso Gutiérrez Amézquita

ASESOR:

Dr. Fernando Alba Hurtado

CO-ASESORES

M. en C. María Guadalupe Prado Ochoa

M.V.Z. Blanca Rosa Moreno Cardenti



Universidad Nacional
Autónoma de México

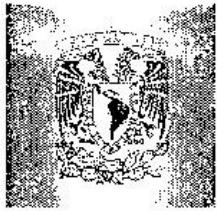


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos LA TESIS:

Evaluación de los cambios histológicos en diferentes órganos de ratas tratadas con carbamatos de nueva síntesis.

Que presenta el pasante: Ricardo Alfonso Gutiérrez Amézquita
 Con número de cuenta: 40702286-9 para obtener el Título de: Médico Veterinario Zootecnista

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

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de Enero de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Fernando Alba Hurtado	
VOCAL	Dr. Miguel Ángel Comejo Cortés	
SECRETARIO	MC. Javier Froylan Lazcano Reyes	
1er SUPLENTE	MVZ. Olivia Adams Vázquez	
2do SUPLENTE	MC. Tiziano Santos Morín	

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de ser profesionista.
- A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, que a través de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, me proporcionó el conocimiento necesario para ser el médico veterinario que quiero ser.
- Al Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos que a través del Proyecto PAPIIT IN22331, hicieron posible el desarrollo de este proyecto.
- A los Doctores Fernando Alba Hurtado y Marco Antonio Muñoz Guzmán por brindarme la oportunidad y confianza de formar parte del grupo de trabajo en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos.
- A la M. en C. Ma. Guadalupe Prado Ochoa, por permitirme ser parte de su equipo de investigación.
- A la M.V.Z. Blanca Rosa Moreno Cardenti, por el apoyo integral brindado durante la realización de este proyecto, así como el apoyo dado en la mayor parte de mi formación académica.
- Al Técnico Académico M. en C. Cesar Cuenca Verde, por el apoyo proporcionado en las actividades realizadas dentro del laboratorio.
- A la M.V.Z. Yolanda Romero Sánchez, responsable del Laboratorio de Histopatología por el apoyo proporcionado en la elaboración de los cortes histológicos.
- A mi mamá y mi hermana por darme la oportunidad de poder ser lo que soy; por todo el apoyo emocional, económico y sobre todo por el ejemplo a seguir que significan en mi persona.
- A mi novia, por todo el tiempo compartido durante la carrera, por el apoyo y el cariño, así como los logros y metas que vendrán.

A TODOS GRACIAS

ÍNDICE

ÍNDICE.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS.....	7
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
Generalidades.....	11
Biología y ciclo biológico de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	12
Métodos de control para garrapatas.....	12
Control no químico.....	14
<i>Inmunización</i>	14
<i>Resistencia del huésped</i>	14
<i>Manejo de pradera</i>	14
<i>Control biológico</i>	15
Control químico.....	15
Familias de plaguicidas.....	15
<i>Organofosforados</i>	16
<i>Carbamatos</i>	16
<i>Diformamidinas</i>	16
<i>Piretroides</i>	16
<i>Lactonas macrocíclicas</i>	16
<i>Fenilpirazolonas</i>	17
<i>Inhibidores de quitina</i>	17
Resistencia a acaricidas.....	17
Formas de resistencia.....	19

Carbamatos.....	20
Historia de los carbamatos.....	20
Derivados de carbamatos.....	21
Farmacocinética de carbamatos.....	23
<i>Absorción</i>	23
<i>Distribución</i>	23
<i>Metabolismo</i>	23
<i>Excreción</i>	25
Farmacodinamia de carbamatos (modo de acción).....	26
Toxicidad.....	26
JUSTIFICACIÓN.....	29
OBJETIVOS.....	30
HIPÓTESIS.....	31
MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
Ubicación.....	32
Material biológico.....	32
Carbamatos a evaluar.....	32
Diseño experimental.....	33
Técnica de elaboración de preparados histológicos.....	35
Evaluación de preparados histológicos.....	35
Análisis de resultados.....	36
RESULTADOS.....	38
Análisis macroscópico (necropsias).....	38
<i>Grupo experimental tratado con Etil (4-clorofenil) carbamato</i>	38
<i>Grupo experimental tratado con Etil (4-bromofenil) carbamato</i>	38

<i>Grupo testigo tratado con aceite de maíz</i>	39
<i>Grupo testigo tratado con DMSO (dimetil sulfóxido)</i>	39
Análisis microscópico (histología).....	40
<i>Lesiones microscópicas observadas en los grupos experimentales tratados con Etil (4-clorofenil) carbamato</i>	40
<i>Lesiones microscópicas observadas en los grupos experimentales tratados con Etil (4-bromofenil) carbamato</i>	42
MICROFOTOGRAFÍAS.....	57
Descripción microfografías.....	57
Microfotografías.....	61
DISCUSIÓN.....	66
CONCLUSIONES.....	74
REFERENCIAS.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1: Ciclo biológico de <i>R. microplus</i>	13
Figura 2: Estructura general de un carbamato.....	20
Figura 3: Cinética del fármaco dependiendo la vía de entrada.....	24
Figura 4: Metabolismo general de los carbamatos.....	25
Figura 5: Diseño experimental.....	37
Cuadro 1: Resistencia de <i>R. microplus</i> a diversos químicos empleados en su control; así como el país y año en el que se reportó la resistencia.....	18
Cuadro 2: Nombre comercial, estructura química y nombre químico de los principales carbamatos empleados en la actualidad.....	21-22
Cuadro 3: Nombre químico, estructura, peso molecular y clave de los carbamatos usados en el modelo experimental.....	33
Cuadro 4: Dosificaciones de los grupos en el diseño experimental.....	34
Cuadro 5: Cambios histológicos encontrados en el grupo control tratado con aceite de maíz.....	45
Cuadro 6: Cambios histológicos encontrados en el grupo control tratado con DMSO	46
Cuadro 7: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 5 mg/kg de <i>Etil (4-clorofenil)</i>	47
Cuadro 8: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 50 mg/kg de <i>Etil (4-clorofenil) carbamato</i>	48

Cuadro 9: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 300 mg/kg de <i>Etil (4-clorofenil) carbamato</i>	49
Cuadro 10: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 2000 mg/kg de <i>Etil (4-clorofenil) carbamato</i>	50
Cuadro 11: Comparación de los principales cambios histológicos encontrados en hígado de los grupos experimentales tratados con <i>Etil (4-clorofenil) carbamato</i> y los grupos control tratados con aceite de maíz/DMSO.....	51
Cuadro 12: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 5 mg/kg de <i>Etil (4-bromofenil) carbamato</i>	52
Cuadro 13: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 50 mg/kg de <i>Etil (4-bromofenil) carbamato</i>	53
Cuadro 14: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 300 mg/kg de <i>Etil (4-bromofenil) carbamato</i>	54
Cuadro 15: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 2000 mg/kg de <i>Etil (4-bromofenil) carbamato</i>	55
Cuadro 16: Comparación de los principales cambios histológicos encontrados en hígado de los grupos experimentales tratados con <i>Etil (4-bromofenil) carbamato</i> y los grupos control tratados con aceite de maíz/DMSO.....	56

ABREVIATURAS

Ach E: Acetil Colinesterasa

Ach: Acetil Colina

Buch E: Butiril Colinesterasa

Carb E: Carbamil Colinesterasa

CDER: Center for Drug Evaluation and Research

CINVESTAV: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

FES: Facultad de Estudios Superiores

GABA: Gamma Amino Butiric Acid

IPN: Instituto Politécnico Nacional

NOM: Norma Oficial Mexicana

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

spp: species pluralis

UIM: Unidad de Investigación Multidisciplinaria

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN

Rhipicephalus microplus es una garrapata hematófaga, considerada como el principal artrópodo parásito de los bovinos en México, debido a las pérdidas económicas que provoca este parásito en la ganadería nacional. El uso constante e irracional de acaricidas, ha provocado que *R. microplus* sea resistente a los efectos letales de estos productos. El laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos junto con el laboratorio de Química Medicinal, ambos de FES-Cuautitlán, han sintetizado nuevos productos derivados del ácido carbámico, los cuales fueron evaluados *in vitro* en cepas susceptibles y resistentes de *R. microplus*, mostrando ser eficaces en el control de *R. microplus*. Debido a estos resultados, se está evaluando la toxicidad *in vivo* de estos productos. El objetivo de este proyecto fue observar y evaluar los cambios histológicos en diferentes órganos de ratas cepa Wistar producidos por la administración oral de 4 dosis diferentes de los carbamatos *Etil (4-clorofenil) carbamato* y *Etil (4-bromofenil) carbamato* en una sola toma, para identificar su posible toxicidad. Los resultados histológicos mostraron que el hígado fue el principal órgano afectado por la administración de estos productos. En este órgano se observaron focos de necrosis coagulativa modificada, hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos y aumento de hepatocitos con núcleos dobles. El producto más tóxico fue *Etil (4-clorofenil) carbamato*, ya que la presencia de focos necróticos fue común en todas las dosis. El carbamato *Etil (4-bromofenil) carbamato*, presentó una menor toxicidad ya que en este la presencia de focos necróticos se observó en hasta el grupo tratado con la dosis de 2000 mg/kg. En los grupos tratados con las dosis inferiores (5, 50 y 300mg/kg) del producto *Etil (4-bromofenil) carbamato* solo se observaron hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos y hepatocitos binucleados. Los cambios histológicos encontrados solo muestran un panorama general de la interacción órgano-carbamato.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES

Los bovinos son mamíferos empleados en forma productiva por el ser humano para la obtención de alimentos (carne, leche y derivados). Durante esta etapa productiva, los bovinos se enfrentan de forma cotidiana a organismos que pueden afectar de forma directa su salud, y por lo tanto disminuir su producción; dentro estos organismos se encuentran las garrapatas. Debido a los daños generados por las garrapatas, se han desarrollado fármacos como los Carbamatos como estrategia de control para este problema.

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos cosmopolitas, que parasitan mamíferos, aves y reptiles. Se han adaptado a diversos nichos ecológicos en el planeta, forman parte de diversos ecosistemas y contribuyen al equilibrio ecológico natural (Domínguez *et al.*, 2010). Estos parásitos constituyen uno de los principales problemas a los que se enfrenta la ganadería, representando pérdidas económicas importantes, estimadas a nivel internacional en un rango que va de 13.9 a 14.7 billones de dólares anuales (Castro, 1997).

Los daños asociados a la infestación por garrapatas en los animales se clasifican en:

- Daños directos: Son los problemas asociados a la presencia de la garrapata sobre el animal, entre estos se encuentran: anemia, disminución en el consumo de alimento, disminución en la productividad del animal (leche, carne), y daños neurológicos por toxinas (SENASA, 2008; Quiroz, 1984).
- Daños indirectos: Son los problemas generados por los microorganismos transmitidos a través de la alimentación de la garrapata, entre los que se encuentran: *Anaplasma sp*, *Babesia sp*, *Theileria sp*, *Cowdria sp* (Castro y Newson, 1993; Uilenberg, 1995).

BIOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Las garrapatas se clasifican por su morfología dentro de las siguientes 4 familias: *Argasidae*, *Ixodidae*, *Nutalliellidae* y *Laelaptidae* (Anderson y Magnarelli, 2008). Dentro de la familia *Ixodidae* (garrapatas duras), se encuentra la garrapata *Rhipicephalus microplus*, antes *Boophilus microplus*, reclasificada actualmente por su relación filogenética (ADN mitocondrial) con garrapatas del género *Rhipicephalus* (Murrell *et al.*, 2003). *R. microplus* es un parásito ampliamente distribuido en el territorio nacional y se considera como el principal artrópodo parásito de los bovinos en México (Quiroz, 1984; de Castro y Newson, 1993; Pérez-Cogollo *et al.*, 2010).

R. microplus presenta un ciclo biológico de un hospedero (principalmente bovinos). Su ciclo se divide en dos etapas, una fase parásita y una no parásita (figura 1). La fase parásita se desarrolla sobre el bovino y consiste en el cambio de estadio por medio de la alimentación, de larvas a ninfas y posteriormente a adultos; continuando con la cópula de los adultos, y finalizando con la repleción de sangre por parte de la hembra fecundada. La fase no parásita inicia con el desprendimiento de la hembra, seguida de la oviposición; y termina con la eclosión de las larvas, las cuales pueden infestar a un nuevo huésped (Quiroz, 1984; Anderson y Magnarelli, 2008).

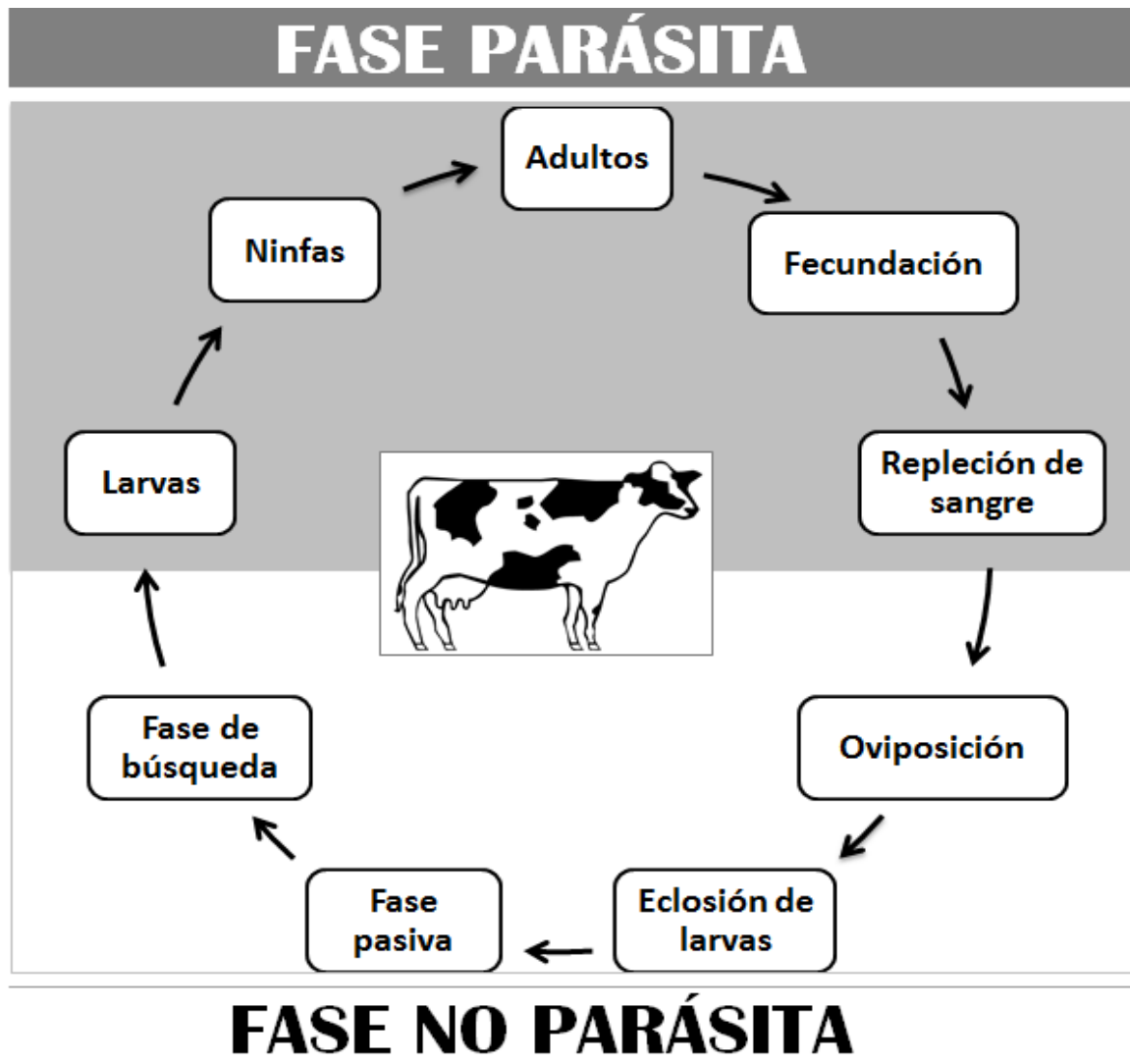
Debido a los problemas originados por la infestación del ganado por *R. microplus*, y la repercusión económica que este padecimiento representa, se han empleado diversas estrategias para su control, algunas de las cuales se encuentran establecidas en la norma NOM-019-ZOO-1994 de la Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus spp* (Castro, 1997; SAGARPA, 1995; SENASA, 2008-2012).

MÉTODOS DE CONTROL PARA GARRAPATAS

En la actualidad los métodos empleados para controlar la infestación por garrapatas duras (ixodidosis), se dividen en control no químico y control químico. Desde hace algunos años, se ha propuesto como estrategia para el control de la ixodidosis el control integral de parásitos. Este método se basa en la combinación y

utilización adecuada de todas las alternativas de control (químicas y no químicas) disponibles en una región, con la finalidad de mantener una carga parasitaria baja así como disminuir la presencia de resistencia en garrapatas a los acaricidas convencionales. Con esto se pretende prolongar la vida útil de los acaricidas (Young *et al.*, 1988).

Figura 1: Ciclo biológico de *R. microplus*.



Tomado de Iturbe, 2012

CONTROL NO QUÍMICO

El control no químico se basa en el empleo de diversas estrategias enfocadas en la disminución de la carga parasitaria sin el uso de productos químicos; entre la cuales se encuentran:

- **Inmunización:** En la actualidad se conocen 2 vacunas comerciales empleadas para el control de garrapatas (TickGard® y Gavac®). Ambas vacunas contienen el antígeno intestinal Bm86 de *R. microplus*. Estas vacunas disminuyen el número de hembras repletas en el animal, generando una menor cantidad de larvas en la siguiente generación. Recientes estudios han demostrado la efectividad de las vacunas en el control de esta parasitosis, al disminuir el uso de acaricidas en un 67% en los ranchos del norte de México (Castro, 1997; De la Fuente *et al.*, 2007; Domínguez *et al.*, 2010).
- **Resistencia del huésped:** Se ha visto que el ganado *Bos indicus* (Cebú) presenta una mayor resistencia a la infestación por garrapatas, en relación al *Bos taurus* (Europeo), aunque también se sabe que dentro de las razas europeas existen grados de resistencia (Castro, 1997; Jonsson *et al.*, 2000). Se han propuesto como factores de resistencia el grosor de la piel, la cantidad de grasa secretada, aumento de niveles séricos de inmunoglobulinas y mayor secreción de histamina entre otros. Debido a la mayor resistencia del ganado Cebú, se han realizado cruzamientos con razas europeas en zonas endémicas de garrapatas para disminuir las afecciones que genera *R. microplus* (Wikel, 1996; Castro, 1997).
- **Manejo praderas:** Se utilizan algunos pastos como *Stylosantes spp*, que tienen capacidad de “atrapar” larvas de garrapata y así evitar infestaciones masivas; también se sugiere un descanso de praderas de 18 meses para garrapatas del género *R. microplus* en pastizales grandes, y en praderas pequeñas se recomienda la introducción de ganado no específico para el parásito como son los ovinos y caprinos, con lo cual se disminuyen las

poblaciones de garrapatas al reducir las oportunidades de alimentación (Castro, 1997).

- **Control Biológico:** Investigaciones recientes han demostrado que los hongos entomógenos de los géneros *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* tienen un efecto favorable sobre el control de las garrapatas, debido al aumento en la mortalidad que estos hongos generan en larvas de los géneros *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum* y *Rhipicephalus decoloratus* (Kaaya y Hassan, 2000).

CONTROL QUÍMICO.

Consiste en la aplicación de productos químicos con la finalidad de matar a las garrapatas. El uso de los primeros químicos para el control de las garrapatas, se remonta a décadas anteriores a 1892, en dónde los productores empezaron a controlar las infestaciones por garrapatas, aplicando mezclas de keroseno, aceite de semilla de algodón, aceite de pescado, petróleo y sulfuro al 10% (George *et al.*, 2004). Este manejo se continuó hasta 1900, cuando en Australia se comenzó a utilizar como garrapaticida el arsénico, revolucionando el control de estos parásitos, el cual fue utilizado hasta el descubrimiento de los organoclorados en 1939, siendo el diclorodifenilcloroetano (DDT) y el hexacloridobenceno los productos más reconocidos de estos químicos, aunque también existieron algunos otros como la Cloroterpina, Ciclodieno, Toxafeno, Aldrin y Dieldrin. Los organoclorados fueron reconocidos como los primeros acaricidas e insecticidas (Graf *et al.*, 2004).

FAMILIAS DE PLAGUICIDAS

A partir de los años 50 y con base en los problemas ambientales y tóxicos generados por el uso de los organoclorados, laboratorios e investigadores se dedicaron a sintetizar nuevos químicos empleados para el control de artrópodos, creando diversas familias de plaguicidas, dentro de las cuales se encuentran las empleadas para el control de garrapatas denominadas acaricidas. Muchas de estas familias permanecen vigentes y en uso en la actualidad (George *et al.*, 2004; Graf *et al.*, 2004).

En la actualidad se emplean diversas familias de plaguicidas como acaricidas, dentro de las cuales se encuentran:

- **Organofosforados:** Estos fármacos sintetizados a partir de 1956, se consideran altamente tóxicos tanto para los humanos como para el ganado, debido a su mecanismo de acción, el cual se basa en la inhibición permanente de la enzima acetil colinesterasa. Como integrantes de esta familia está el Ethion, Chlorpyrifos, Chlorfenvinphos y Coumaphos (Botana, 2002; George *et al.*, 2004; Graf *et al.*, 2004).
- **Carbamatos:** Al igual que los organofosforados estos productos inhiben la acción de la enzima acetil colinesterasa; pero con la diferencia de que esta reacción es reversible. Dentro de este grupo podemos encontrar al Carbaryl, Carbofuran, Promacyl y Propoxur (Botana, 2002; George *et al.*, 2004).
- **Diformamidinas:** Estos fármacos generados en el año de 1970, actúan como agonistas de los receptores octopaminérgicos de los artrópodos, promoviendo una alteración en la motilidad del parásito; aunque se ha visto que estos productos tienen la desventaja de ser carcinogénicos. En esta familia se encuentra el Amitraz, Clordimeform, Clorometiurom y Clenpirina (Botana, 2002; George *et al.*, 2004).
- **Piretroides:** Estos antiparasitarios sintetizados en 1973, se fijan al receptor del GABA y del canal de Cl⁻ provocando el cierre de estos canales, culminando con hiperexcitabilidad y muerte del parásito; dentro de este grupo se encuentra la Permetrina, Cipermetrina, Flumetrina y Alletrina entre otros. Su desventaja se debe a que estos productos se degradan por rayos ultravioleta y humedad (Botana, 2002; George *et al.*, 2004).
- **Lactonas macrocíclicas:** Estos “endectocidas”, denominados de esta forma debido a su amplio espectro (nematodos y artrópodos), fueron desarrollados a principios de los años 80’s. El mecanismo de acción de estos fármacos es sobre canales de cloro, aumentando su permeabilidad; promoviendo una parálisis flácida en el parásito. Dentro de esta familia se encuentran las Avermectinas como Abamectina, Doramectina, Ivermectina, y Selamectina; y

las Milbemicinas como Moxidectina, Milbemicina D, y Nemadectina (Botana, 2002; Graf *et al.*, 2004).

- **Fenilpirazolonas:** Este fármaco actúa como antagonista del GABA fijándose al receptor del canal interno del cloro, induciendo hiperexcitabilidad del parásito. Dentro de esta familia se encuentra principalmente el Fipronilo (Botana, 2002; George *et al.*, 2004).
- **Inhibidores de quitina:** Estos productos interfieren en la síntesis y depósito de la quitina, inhibiendo la ecdisis o muda del parásito generándole la muerte por deshidratación; en este grupo se puede encontrar al Fenoxicarb y Fluazurón (Botana, 2002).

RESISTENCIA A ACARICIDAS

Debido al uso irracional e indiscriminado de los fármacos empleados para el control de las garrapatas, se ha estimulado la expresión de genes y proteínas en las garrapatas, con los cuales estos artrópodos han logrado resistir los efectos nocivos que estos productos les ocasionan (Domínguez *et al.*, 2010). A este fenómeno se le denomina resistencia y se ha reportado desde finales de los años 30, cuando se reconoce en Australia que la garrapata *R. microplus* es capaz de resistir los efectos del Arsénico; a partir de ese momento se han reportado casos en los que se demuestra la capacidad propia de los parásitos a resistir los efectos letales de los productos empleados para su control. En el cuadro 1 se muestra el país y el año en que se reportó por primera vez resistencia por *R. microplus* a los acaricidas empleados (George *et al.*, 2004).

México no ha sido la excepción en cuanto a resistencia se refiere, en 1981 se reportó por primera vez, encontrando resistencia a organofosforados en poblaciones de *R. microplus* en el estado de Veracruz. A partir de esta fecha se han identificado cepas resistencias a diversos acaricidas (amitraz, piretroides, lactonas macrocíclicas, organofosforados) en muchas regiones del territorio nacional (Li *et al.*, 2005; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006, Aguilar-Tipacamú *et al.*, 2008; Pérez-Cogollo *et al.*, 2010).

Cuadro 1: Resistencia de *R. microplus* a diversos químicos empleados en su control; así como el país y año en el que se reportó la resistencia

PRODUCTO QUÍMICO	AÑO DE DESCUBRIMIENTO	PAIS Y AÑO EN EL QUE SE DESCUBRIÓ RESISTENCIA
Arsénico	1893	Australia, 1936; Argentina, 1936; Brasil, 1948; Colombia, 1948; Uruguay, 1953.
DDT	1946	Argentina, 1953; Brasil, 1953; Australia, 1953; Venezuela, 1966; S. África, 1979.
Ciclodieno y Toxafeno	1947	Australia, 1953; Argentina, 1953; Brasil, 1953; Venezuela, 1966; Colombia, 1966; S. África, 1979.
Organofosforados Y Carbamatos	1955	Australia, 1963; Argentina, 1964; Brasil, 1963; Colombia, 1967; Venezuela, 1967; S. África, 1979; Uruguay, 1983; México, 1986.
Formamidinas	1975	Australia, 1981; Brasil, 1995; Colombia, 2000; México, 2002.
Piretroides	1977	Australia, 1978; Brasil, 1989; México, 1994; Venezuela, 1995; Colombia, 1997; Argentina, 2000.
Lactonas macrocíclicas	1981	Brasil, 2001; México 2010.

Tomado y modificado de George *et al.*, 2004

FORMAS DE RESISTENCIA

La resistencia a los ixodicidas ocurre principalmente a través de 2 vías; detoxificación metabólica y cambios en el sitio de acción. La detoxificación metabólica se basa en la mayor producción de enzimas específicas para la degradación molecular de los químicos empleados, dentro de las cuales se encuentra: la familia de enzimas citocromo p450, glutatión s-transferasas, esterases y carboxilesterasas; Este aumento enzimático será específico-dependiente de la presencia del acaricida; como ejemplo se tiene el aumento de la enzima esterasa degradadora de Cipermetrina en la cepa Coatzacoalcos debido a duplicación del gen CzEST9 (Domínguez *et al.*, 2010).

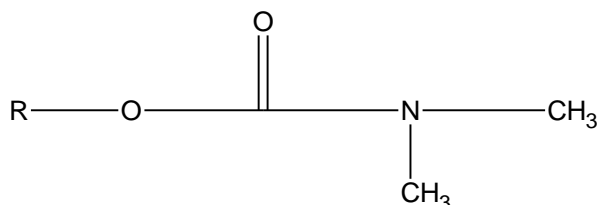
La resistencia a través del cambio de sitio de acción o blanco, se refiere a modificaciones químico moleculares en el sitio de acción del fármaco, con la consecuente disminución o anulación de la efectividad que este pueda tener en contra del parásito; como ejemplo de este tipo de resistencia se tiene la sustitución de los aminoácidos fenilalanina y leucina por isoleucinas, en el canal de sodio, sitio en el que actúan los piretroides, confiriendo esta modificación estructural del canal de sodio la resistencia a dichos fármacos (Domínguez *et al.*, 2010; Aguilar-Tipacamú *et al.*, 2008).

El desarrollo de la resistencia ya sea estructural o metabólica se divide en 3 fases. La primera se le denomina como fase de establecimiento y se refiere al surgimiento de un alelo resistente en una población a un cierto químico. La segunda se le denomina fase de desarrollo y refiere el aumento de individuos resistentes en la población por presencia de este alelo. La tercera se denomina fase de emergencia y ocurre cuando existe una alta presión de selección y el alelo resistente es altamente común en la población, lo suficiente para manifestarse (Alonso-Díaz *et al.*, 2006).

CARBAMATOS

Los carbamatos son compuestos moleculares sencillos, derivados inicialmente de la fisostigmina (*Physostigma venenosum*), los cuales son alcaloides de la semilla de Calabar; sin embargo en la actualidad estos compuestos son de origen sintético (Gupta, 2006). Los carbamatos son definidos como ésteres del ácido carbámico; estructuralmente presentan una región principal constituida por un metilcarbamato de un fenol, con un sustituyente de carácter básico (Botana, 2002). En la figura 2 se observa la estructura general de un carbamato.

Figura 2: Estructura general de un carbamato



Tomado de Botana, 2002

HISTORIA DE LOS CARBAMATOS

La historia de los carbamatos se remonta al año de 1840, cuando fue llevada a Inglaterra la planta *Physostigma venenosum* proveniente del trópico Africano, la cual era utilizada para la cacería de brujas (Gupta, 2006). Veinticuatro años después (1864), se descubre que los efectos tóxicos provocados por el haba de Calabar son reversibles al tratar a 46 niños intoxicados con esta semilla utilizando como antídoto atropina, eméticos y agua caliente (Karczmar, 1998). En ese mismo año, investigadores aíslan la fisostigmina del Calabar y es 50 años después cuando se le agrega un éster de ácido carbámico, denominándolo como Carbamato. En 1930 investigadores alemanes reconocen la toxicidad de los carbamatos empleándolos como químicos neurotóxicos en la Guerra (Karczmar, 1998; Botana, 2002; Gupta, 2006).

A partir de los años 70 y hasta la actualidad, los carbamatos se han empleado de diversas maneras, siendo usados principalmente como herbicidas en la agricultura,

ectoparasiticidas en veterinaria, plaguicidas en cuidados forestales e incluso en medicina humana para el tratamiento de algunas enfermedades degenerativas como Alzheimer, miastenia gravis y glaucoma entre otras (Gupta, 2006; Botana, 2002).

DERIVADOS DE CARBAMATOS

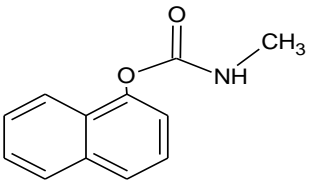
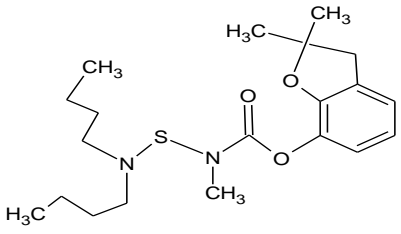
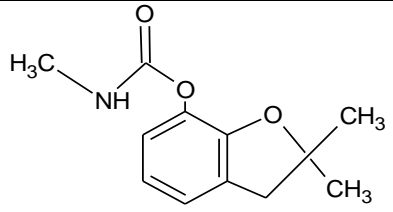
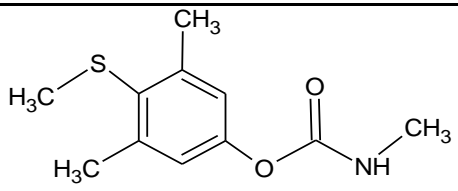
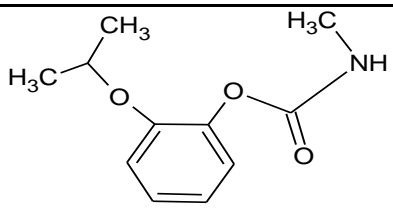
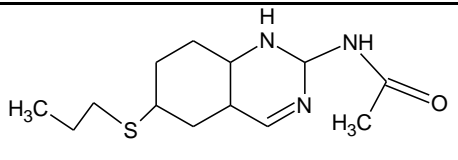
En la actualidad se conocen los siguientes carbamatos: Aldicarb, Aminocarb, Carbaryl, Carbofuran, Carbosulfan, Metiocarb entre otros; los cuales se esquematizan en el Cuadro 2 (Gupta, 2006).

En medicina veterinaria los carbamatos más comunes empleados para el control de artrópodos son el Propoxur y el Carbaril; los cuales se encuentran tanto en presentación tópica como parenteral; También dentro del grupo de fármacos empleados en veterinaria relacionados a carbamatos se encuentra el Albendazol (*); a pesar de que este compuesto no pertenece a esta familia, este producto se ha considerado carbamato debido a su cercana estructura química relacionada con estos compuestos (Botana, 2002).

Cuadro 2: Nombre comercial, estructura química y nombre químico de los principales carbamatos empleados en la actualidad.

Nombre Común	Estructura	Nombre Químico
Aldicarb		(1E)-2-methyl-2-(metilpropanol-0- (metilamino) carbonyl) oximo. C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S.
Aminocarb		4-(dimetilamino)-3-(metilfenil) metilcarbamato. C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂ .

Continuación cuadro 2: Nombre comercial, estructura química y nombre químico de los principales carbamatos empleados en la actualidad.

Carbaryl		1-naftil metilcarbamato.
Carbosulfan		2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzoforanil((di-butilamino) thio) metil carbamato. $C_{20}H_{32}N_2O_2S$
Carbofuran		2,2-dimetil 1-2,3-dihidro-(-benzofuran-7-y) metilcarbamato. $C_{12}H_{15}NO_3$
Metiocarb		3,5-Dimetil-4-(metilthio)fenil metilcarbamato $C_{11}H_{15}NO_2S$
Propoxur		2-(1-methylethoxy)phenil methylcarbamate $C_{11}H_{15}NO_3$
*Albendazol		metil-5-(propiltio)-2-bencimidazol-carbamato. $C_{12}H_{15}N_3O_2S$

Tomado y modificado de Gupta, 2006.

* Se coloca el albendazol dentro del grupo de carbamatos por su relación química que presenta con estos compuestos.

FARMACOCINÉTICA DE CARBAMATOS

La farmacocinética de los carbamatos al igual que la de otros compuestos, refiere al tiempo que permanece un compuesto químico dentro del organismo desde su absorción hasta su excreción. Dentro de la farmacocinética de los fármacos se estudia la absorción, distribución, metabolismo y excreción (Botana, 2002).

Absorción: Los carbamatos en general presentan una buena absorción, las principales vías son: tracto respiratorio, mucosa ocular, piel y tracto gastrointestinal (Botana, 2002; Gupta, 2006).

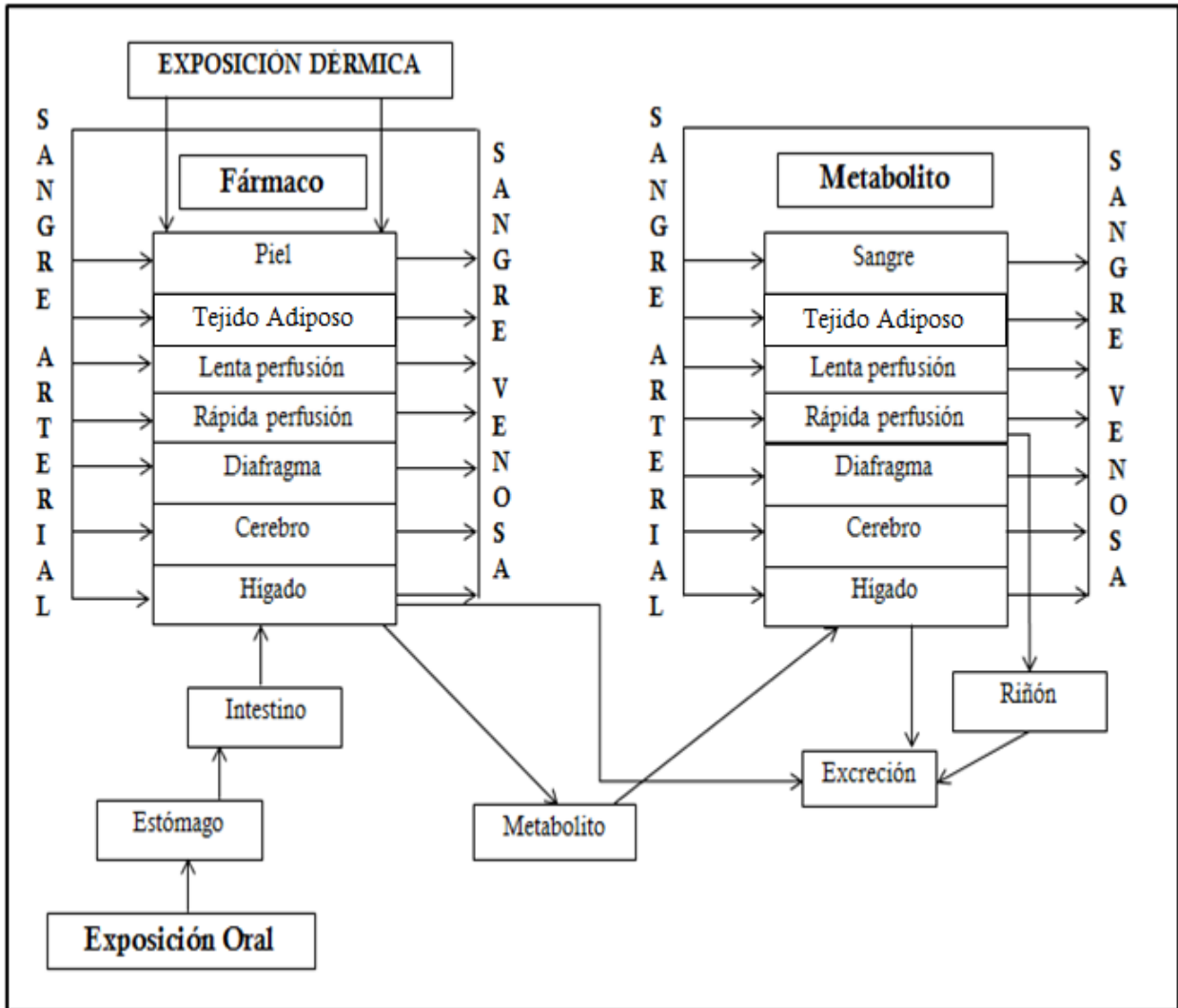
Distribución: Los carbamatos y sus metabolitos se difunden hacia todas las partes del cuerpo, dividiéndolo en 7 compartimentos, los cuales son: piel, tejido adiposo, tejidos alta perfusión (riñón, bazo), tejidos baja perfusión (hueso, musculo), diafragma, cerebro e hígado. Como se aprecia en la Figura 3, dependiendo de la vía de entrada será la cinética del fármaco (Botana, 2002; Gupta, 2006).

Metabolismo: En general los carbamatos se hidrolizan por CarbE, formando α -naftol y ácido metil carbámico, el cual se degrada en monometilamina y CO_2 ; el α -naftol se conjuga con sulfatos o glucuronatos. Dependiendo del carbamato serán las enzimas empleadas para su metabolismo. El metabolismo de los carbamatos se basa en 2 fases dependiendo de las enzimas involucradas en los procesos.

- Enzimas de fase 1: Aquí se encuentran 3 variedades de enzimas relevantes; La 1° es la familia de enzimas p450, actuando principalmente la CYP3A5 y CYP2B6 dependiente de monooxigenasa; El 2° tipo representa a las A esterasas (Ariesterasa, la cual actúa sobre metabolitos principalmente), y B esterasas (CarbE, BuchE, AchE) y C esterasas (acetil esterasas, de poca importancia en carbamatos); y el 3° tipo refiere al grupo FMO, principalmente la Flavino monooxigenasa. La actividad principal de este tipo de enzimas (fase 1) es la de modificar la polaridad de los carbamatos y sus metabolitos, volviéndolos ligeramente hidrosolubles.
- Enzimas de fase 2: Se encuentran principalmente las enzimas glutatión transferasa, glucuronil transferasa y sulfonil transferasa. La actividad

principal de estas enzimas es hidrosolubilizar al carbamato y su metabolito para poder excretarlo (Botana, 2002; Gupta, 2006; Abass *et al.*, 2009 y 2010).

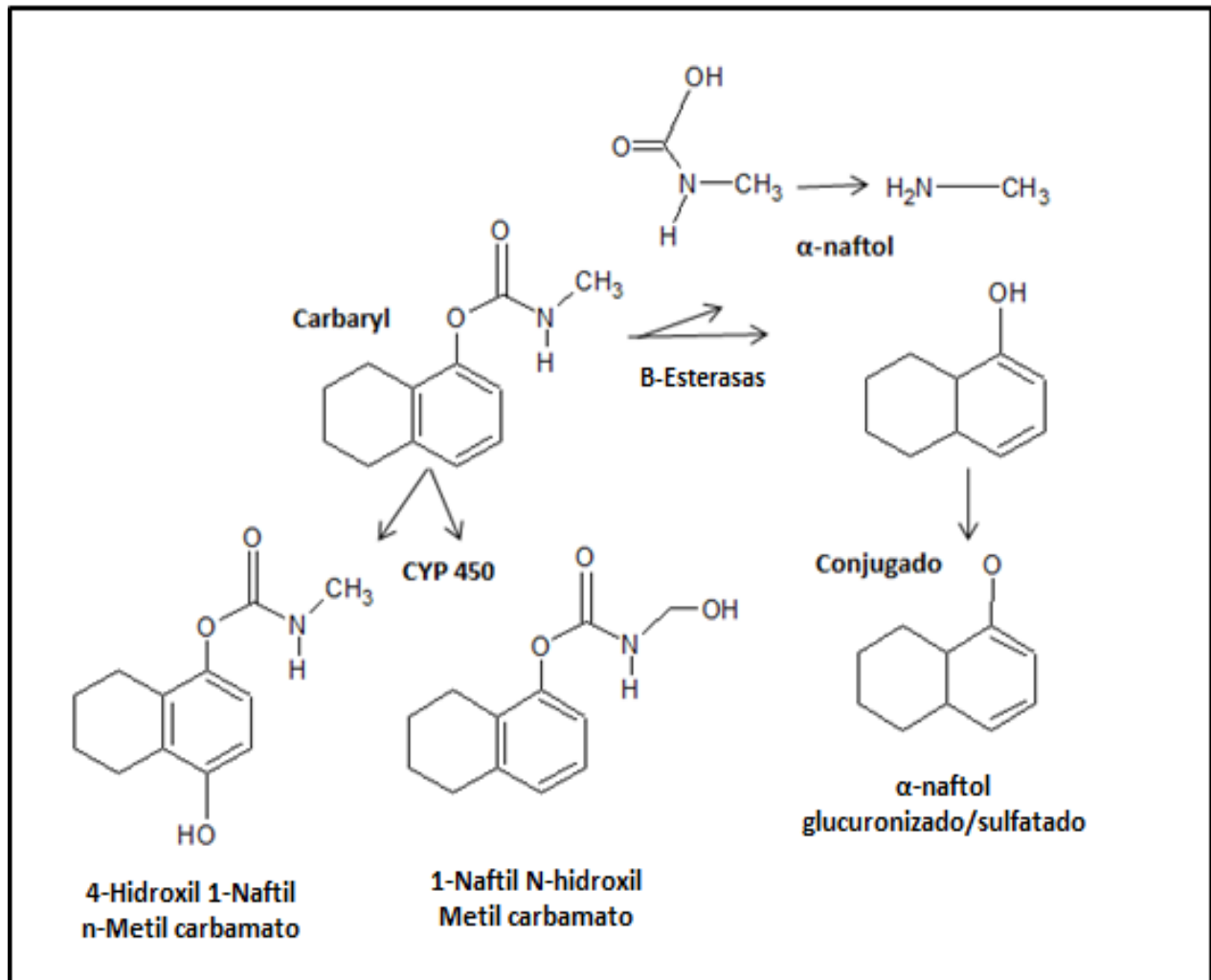
Figura 3: Cinética del fármaco dependiendo la vía de entrada



Tomado y modificado de Gupta, 2006

Excreción: Los productos derivados del metabolismo de los carbamatos se eliminan por la orina principalmente, aunque se ha encontrado también excreción a través de bilis (Botana, 2002; Gupta, 2006).

Figura 4: Metabolismo general de los carbamatos



Tomado y modificado de Gupta, 2006

FARMACODINAMIA DE CARBAMATOS (MODO DE ACCIÓN)

Los carbamatos son fármacos que se unen a la fracción éster de las enzimas esterásicas, tales como son la acetil colinesterasa (AChE), butiril esterasa (BuChE) y carbamil esterasa (CarbE), inhibiendo su actividad enzimática (Figura 5). El principal efecto que se ha encontrado de estos enlaces fármaco-enzima ha sido al inhibir la AChE, provocando un mayor efecto del neurotransmisor acetil colina (ACh), generando una sinapsis prolongada (Botana, 2002; Pope *et al.*, 2005; Gupta, 2006).

TOXICIDAD

Los padecimientos generados por el uso de carbamatos tanto en animales como en humanos se han clasificado en 2 tipos; por una parte la toxicidad de dicho fármaco se asocia a los efectos generados por la inhibición sobre las enzimas esterases principalmente AChE, y por otra parte se ha asociado toxicidad derivada del metabolismo de los carbamatos (Pope *et al.*, 2005; Gupta, 2006).

La toxicidad derivada de la inhibición de la enzima AChE por los carbamatos, provoca una acumulación de los niveles de ACh, la cual genera una estimulación de los receptores colinérgicos de forma prolongada y persistente irrumpiendo el equilibrio de la sinapsis. Esta afección en la neurotransmisión genera diversas signologías; las cuales dependerán del sitio en donde se encuentre el daño; zona preganglionar de nervios simpáticos/parasimpáticos, zona postganglionar de nervios parasimpáticos, unión neuromuscular esquelética o sinapsis dentro del SNC (Pope *et al.*, 2005).

Dentro de los principales signos mostrados en una intoxicación por carbamatos se encuentra el denominado síndrome de SLUDGE (por sus siglas en ingles), en el cual se presenta: ptialismo/sialorrea (S), epifora (L), incontinencia urinaria (U), diarrea (D), contracción gastrointestinal (G) y emesis (E); en menor proporción se ha observado bradicardia, broncorrea, taquicardia, tremor muscular, somnolencia, convulsiones y coma (Sócrates y Guimaraes, 1995; Gupta, 2006).

Por otra parte se encuentra la toxicidad derivada del metabolismo de los carbamatos la cual se lleva a cabo principalmente en el hígado debido a la gran concentración de enzimas esterásicas y de la familia P450; aunque también puede haber daño en los eritrocitos, cerebro y diafragma dado la presencia en menor cantidad de las enzimas esterásicas y daño renal por la presencia de enzimas de conjugación como sulfoniltransferasa (Gupta, 2006; Ozden *et al.*, 2009). También se ha encontrado que el carbaryl disminuye la actividad energética de la célula actuando sobre la mitocondria (Moreno *et al.*, 2007).

Histológicamente se han observado los daños provocados por el metabolismo de los carbamatos encontrando cambios asociados en hígado y riñón.

- Hígado: Se ha visto que el Metiocarb provoca cambios degenerativos moderados, congestión de sinusoides hepáticos y presencia de colágena alrededor de las venas (Ozden *et al.*, 2009); que el Carbofuran produce degeneración albuminosa, degeneración vacuolar grasa, hiperplasia de células de Kupffer y conductos biliares, asociado a necrosis severa (Brkic *et al.*, 2008); y que el Carbaryl induce congestión severa con hemorragia, macrocitos, aumento en la basofilia del citoplasma, asociada a núcleos altamente eucromáticos, presencia de focos con degeneración hepatocelular y cuerpos de Councilman (células aumentadas de tamaño con un halo blanco perinuclear y un citoplasma ligeramente eosinófilo) principalmente en el espacio porta y las venas centrales (Munglang *et al.*, 2009).
- Riñón: Se ha encontrado que el Metiocarb provoca un acortamiento de las vellosidades de los túbulos proximales, exudación citoplasmática al lumen tubular, degeneración albuminosa moderada además de presencia de colágena en túbulos proximales necróticos; también se observó aumento del espacio entre el glomérulo y la cápsula de Bowman (Ozden *et al.*, 2009); el Carbofuran produce degeneración albuminosa, edema intertubular, dilatación de los túbulos proximales además de la presencia de cilindros hialinos (Brkic *et al.*, 2008).

En el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos junto con el laboratorio de Química Medicinal, ambos ubicados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, han desarrollado y sintetizado nuevos productos derivados del ácido carbámico (carbamatos) destinados al control de garrapatas. Estos productos fueron evaluados *in vitro* a través de la técnica de inmersión de hembras adultas, en cepas susceptibles, resistentes (San Alfonso y La Mora) y de campo de *R. microplus*. Los resultados obtenidos de esta evaluación mostraron que los carbamatos sintetizados con clave LQM 996, LQM 917, LQM 914, LQM 904, LQM 906 y LQM 919 fueron los únicos que disminuyeron el porcentaje de oviposición y eclosión en forma significativa tanto en cepas susceptibles como resistentes. Los productos Etil (4-clorofenil) carbamato (clave LQM 996) y Etil (4-bromofenil) carbamato (clave LQM 919), resultaron ser los más eficaces, esto al presentar las concentraciones de inhibición de la eclosión (CIE) 99 más bajas con respecto de los otros carbamatos eficaces. Los valores de inhibición de la eclosión 99 del carbamato Etil (4-clorofenil), fueron los siguientes: Cepa susceptible $CIE_{99}=0.279$ mg/ml; Cepa San Alfonso $CIE_{99}=0.589$ mg/ml; Cepa La Mora $CIE_{99}=0.452$ mg/ml y Cepa de Campo $CIE_{99}=0.477$ mg/ml. Los valores de inhibición de la eclosión 99 del carbamato Etil (4-bromofenil), fueron los siguientes: Cepa susceptible $CIE_{99}=0.687$ mg/ml; Cepa San Alfonso $CIE_{99}=0.668$ mg/ml; Cepa La Mora $CIE_{99}=0.703$ mg/ml y Cepa de Campo $CIE_{99}=0.687$ mg/ml (Prado, 2009; Pérez, 2010).

JUSTIFICACIÓN

Debido a la resistencia generada por las garrapatas, resulta de suma importancia la introducción de nuevos fármacos para su control. (Cambridge University Press, 2004). El protocolo de investigación de fármacos de nueva síntesis, para el uso en padecimientos animales según la OECD y CDER, incluye la investigación *in vitro* e *in vivo* de posibles alteraciones (toxicidad) a nivel tisular, celular y genético, inducidas por la administración del fármaco en forma aguda, subaguda o crónica.

El laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos junto con el laboratorio de Química Medicinal, ambos ubicados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán han desarrollado y sintetizado nuevos productos derivados del ácido carbámico (carbamatos) destinados al control de garrapatas. Estos productos fueron evaluados *in vitro* en cepas susceptibles y resistentes de *R. microplus*. Algunos de estos productos resultaron ser eficaces en el control de este parásito, al disminuir de forma significativa la oviposición y eclosión de este parásito tanto en cepas susceptibles como resistentes a los acaricidas convencionales (Prado, 2009; Pérez, 2010). Sin embargo, no se conocen los efectos secundarios de la administración oral de dichos carbamatos en mamíferos.

Por lo anterior, en este proyecto se pretende evaluar los cambios histológicos en cerebro, cerebelo, corazón, pulmón, hígado, riñón, estómago y músculo de ratas cepa Wistar, producidos por la administración oral de 5, 50, 300 y 2000 mg/kg de *Etil (4-clorofenil) carbamato* y *Etil (4-bromofenil) carbamato*; (carbamatos de nueva síntesis), en una sola aplicación (toxicidad aguda).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar los cambios histológicos en cerebro, cerebelo, hígado, riñón, estómago, músculo esquelético, pulmón y corazón de ratas cepa Wistar, asociados a la administración oral de 4 dosis (5, 50, 300 y 2000 mg/kg) de dos nuevos carbamatos (*Etil [4-clorofenil] carbamato* y *Etil [4-bromofenil] carbamato*).

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Describir los cambios producidos por la administración de los fármacos sobre cerebro, cerebelo, hígado, riñón, estómago, músculo esquelético, pulmón y corazón.
- Identificar el órgano más afectado por la administración de los carbamatos.
- Determinar cuál de los dos carbamatos es el que genera menor cantidad de cambios histopatológicos (menos tóxico), y cual genera mayor cantidad de cambios histopatológicos (más tóxico).

HIPÓTESIS

La administración oral de los carbamatos evaluados no producirá cambios histológicos en los órganos muestreados de las ratas cepa Wistar tratadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

UBICACIÓN.

El presente proyecto se desarrolló en el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES-Cuautitlán. Los animales fueron mantenidos dentro de la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria y los cortes histológicos se realizaron en el laboratorio de patología de la misma Facultad.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron 46 ratas de la cepa Wistar (machos) con un peso de 170 a 200g. Las ratas fueron adquiridas en el Bioterio del CINVESTAV-IPN (Zacatenco, D.F.). Las ratas fueron mantenidas en jaulas con viruta especial para su alojamiento, se les proporcionó agua purificada y alimento comercial (pellets marca LabDiet®) *ad libitum*. Las jaulas fueron mantenidas en un cuarto dentro del bioterio, el cual contaba con ambiente controlado. Se realizaba limpieza de las mamilas contenedoras de agua diario y la limpieza de las jaulas cada tercer día.

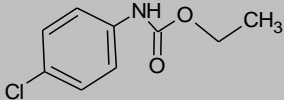
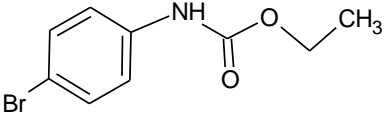
CARBAMATOS A EVALUAR.

Los carbamatos utilizados en el presente trabajo fueron diseñados y sintetizados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, usando como base la estructura de los benzimidazoles. Estos se sintetizaron usando aril y alquil aminas con hidruro de sodio y dietilcarbonato de benceno; se purificaron mediante cromatografía en columna y se recrystalizaron. Su estructura fue elucidada mediante las técnicas comunes de espectroscopía (Angeles, 2000). Los compuestos utilizados se muestran en el Cuadro 3.

Estos productos no fueron solubles en agua por lo que previo a su administración se tuvieron que diluir con 1ml de Dimetil Sulfoxido (DMSO); como vehículo se utilizó 1ml de Aceite de maíz. En total se aplicaron 2ml de tratamiento vía oral por animal. Los ml totales administrados a cada animal (2ml) se basaron en los

reglamentos establecidos por la OECD para la investigación de toxicidad oral aguda de nuevos productos (OECD, guideline-420).

Cuadro 3: Nombre químico, estructura, peso molecular y clave de los carbamatos usados en el modelo experimental.

NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA	PESO MOLECULAR (g/mol)	CLAVE CARBAMATO
Etil (4-clorofenil) carbamato		199.63	LQM 996
Etil (4-bromofenil) carbamato		244	LQM 919

DISEÑO EXPERIMENTAL

Ya ubicadas las 46 ratas dentro del bioterio de la UIM de FES Cuautitlán, se separaron en grupos (Experimental y Testigo). Los grupos experimentales constaron de 5 ratas cada uno, y los grupos testigo de 3 ratas respectivamente. En total se formaron 8 grupos experimentales (4 grupos para cada carbamato) y 2 grupos testigo (Aceite y DMSO).

Los ratas se mantuvieron la primer semana sin recibir tratamiento (carbamatos), por motivos de aclimatación. Pasado este tiempo se inició el experimento.

Las ratas de los primeros 4 grupos experimentales fueron tratadas con 4 dosis diferentes de *Etil (4-clorofenil) carbamato* (5, 50, 300 y 2000 mg/kg).

Las ratas de los 4 grupos experimentales restantes recibieron las mismas dosis de *Etil (4-bromofenil) carbamato*. Un grupo control recibió aceite de maíz y el otro grupo control recibió aceite de maíz y DMSO. La dosificación de los grupos se muestra en el cuadro 4. Las dosis fueron tomadas de los lineamientos establecidos por la OECD para la investigación de nuevos fármacos en toxicidad oral aguda (OECD, guideline-420).

Cuadro 4: Dosificaciones de los grupos en el diseño experimental

Grupo	Número de grupo	Dosis	Carbamato	Mililitros
Experimental	1	5 mg/kg	LQM 996	2
Experimental	2	50 mg/kg	LQM 996	2
Experimental	3	300 mg/kg	LQM 996	2
Experimental	4	2000 mg/kg	LQM 996	2
Experimental	5	5 mg/kg	LQM 919	2
Experimental	6	50 mg/kg	LQM 919	2
Experimental	7	300 mg/kg	LQM 919	2
Experimental	8	2000 mg/kg	LQM 919	2
Testigo	9	-	Aceite Maíz	2
Testigo	10	-	DMSO/Aceite Maíz	2

Durante 14 días se revisó si existía modificación en el aspecto y/o comportamiento de los animales posterior a la medicación. Pasados los 14 días de revisión, se realizó el sacrificio de los animales por medio de la técnica de dislocación cervical. Ya muertos se colectaron 2ml de sangre por medio de punción cardíaca y se procedió con la necropsia. Durante la necropsia se anotaron en una bitácora los cambios macroscópicos aparentes encontrados en los órganos colectados. Se tomaron muestras de tejido de Corazón, Pulmón, Hígado, Estómago, Riñón, Músculo Esquelético, Cerebro y Cerebelo y se conservaron en formol al 10%. Los tejidos colectados se procesaron para obtener cortes histológicos y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina. Los cortes fueron analizados microscópicamente y los cambios histológicos fueron reportados. En la figura 5 se muestra el procedimiento del diseño experimental.

TÉCNICA DE ELABORACIÓN DE PREPARADOS HISTOLÓGICOS.

Los tejidos fijados en formol al 10% se lavaron con agua destilada para eliminar el fijador. Posteriormente se deshidrataron en diferentes concentraciones de alcohol etílico, comenzando con el alcohol al 60% y efectuando una deshidratación de forma gradual hasta llegar al alcohol al 100%. Después la muestra se sumergió en xilol, para posteriormente embeberla en parafina líquida a 60°C y formar cubos. Con un micrótopo, se realizaron 20 cortes histológicos (5 μ m) seriados de cada órgano, de los cuales se tomaron los cortes 1, 5, 10, 15 y 20 para evaluación. Los cortes se montaron en portaobjetos previamente identificados. Posteriormente, las laminillas se colocaron en la platina térmica para su secado. Para finalizar se realizó la tinción de la laminilla con hematoxilina-eosina y se montaron con resina sintética (Gartner, 2001).

EVALUACIÓN DE PREPARADOS HISTOLÓGICOS.

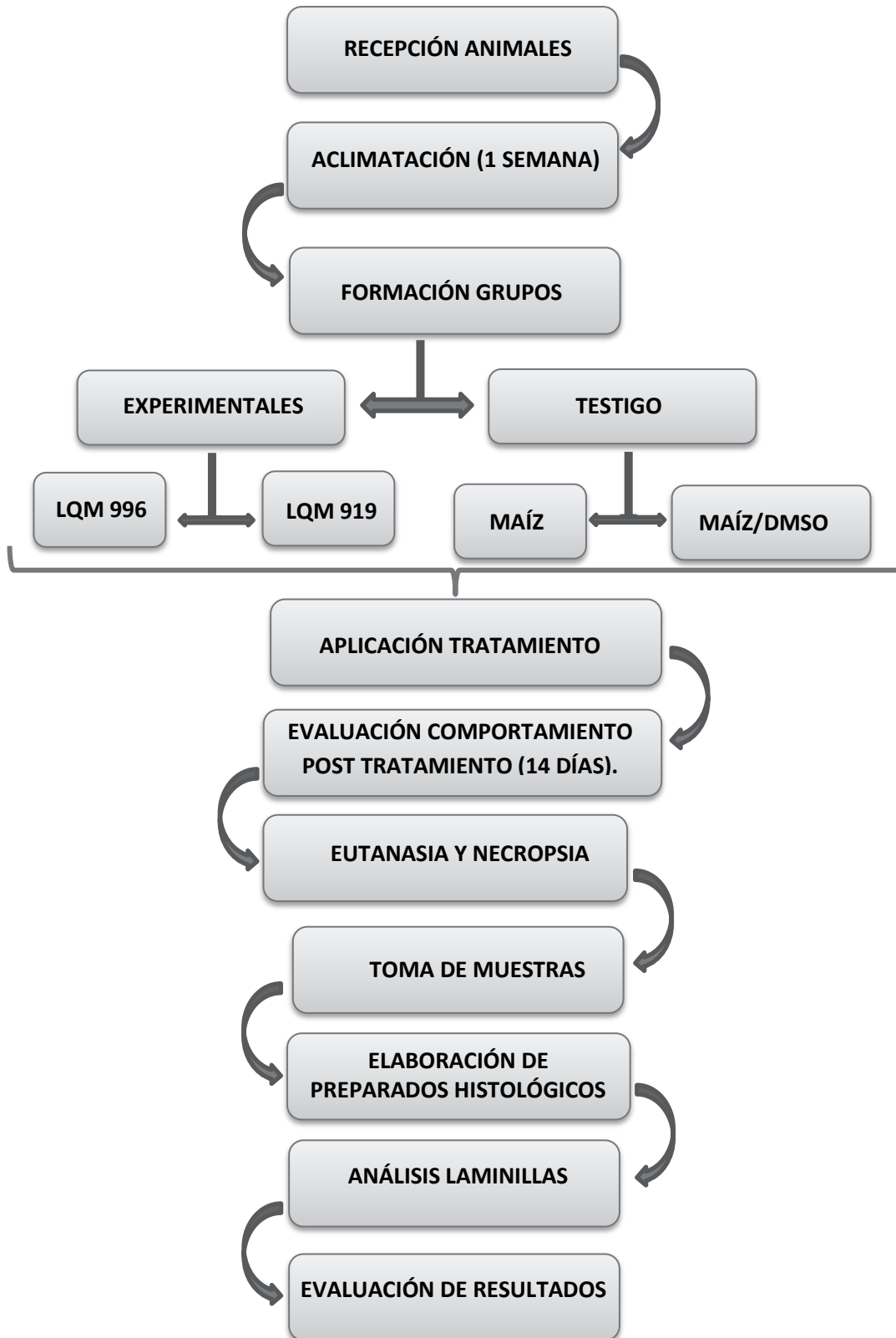
La revisión de las laminillas se realizó por una sola persona de forma sistemática utilizando el microscopio compuesto de campo claro, la selección de los preparados fue de forma aleatoria. Todas las alteraciones encontradas se anotaron

en una bitácora para su posterior análisis, indicado localización y severidad de la lesión; se tomaron microfotografías de los principales cambios.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La evaluación de los preparados histopatológicos se hizo de manera cualitativa. Se identificaron las lesiones de los órganos evaluados y se presentaron en una tabla, en donde se indicó la incidencia y severidad de las lesiones observadas. Se compararon los cambios entre los grupos tratados y los grupos testigos. Con esto se determinó la posible toxicidad de los carbamatos *Etil (4-clorofenil) carbamato* y *Etil (4-bromofenil) carbamato*, a nivel tisular.

FIGURA 5: Diseño experimental.



RESULTADOS

ANÁLISIS MACROSCÓPICO (NECROPSIAS)

GRUPO EXPERIMENTAL TRATADO CON *ETIL (4-CLOROFENIL) CARBAMATO*

Dosis 5 mg/kg: Se observó la presencia de Petequias multifocales y edema difuso en pulmones de moderado a severo en todo el grupo. En una rata del grupo se observó congestión difusa moderada en cerebro y cerebelo.

Dosis 50 mg/kg: Los cambios patológicos encontrados estuvieron presentes únicamente en el pulmón, en el cual se encontraron Petequias multifocales y edema de moderado a severo en las 5 ratas del grupo (100%).

Dosis 300 mg/kg: Se observó la presencia de Petequias multifocales y edema difuso en pulmones de moderado a severo en las cinco ratas del grupo (100%). Se encontró congestión difusa moderada en el hígado de dos ratas del grupo (40%).

Dosis 2000 mg/kg: Se observó la presencia de Petequias multifocales y edema difuso en pulmones de moderado a severo en las cinco ratas del grupo (100%). Se encontró congestión difusa moderada en el hígado de cuatro ratas del grupo (80%). En estómago y ciego se encontró congestión difusa moderada y dilatación en 2 ratas del grupo (40%).

GRUPO EXPERIMENTAL TRATADO CON *ETIL (4-BROMOFENIL) CARBAMATO*

Dosis 5 mg/kg: Se observó la presencia de Petequias multifocales y edema difuso en pulmones de moderado a severo en todo el grupo. En una rata del grupo se observó congestión difusa moderada en cerebro y cerebelo.

Dosis 50 mg/kg: Se observó la presencia de Petequias multifocales y edema difuso en pulmones de moderado a severo en las cinco ratas del grupo (100%).

Dosis 300 mg/kg: Se observó la presencia de petequias multifocales y edema difuso en pulmones de moderado a severo en el 100% del grupo. En una de las ratas (20%) se observó la presencia de abscesos caseosos en un 20% del pulmón.

Dosis 2000 mg/kg: Se observó la presencia de petequias multifocales y edema difuso en pulmones de moderado a severo en todo el grupo. En hígado se encontró congestión difusa moderada a severa en tres ratas del grupo (60%). En estómago y ciego se encontró congestión difusa moderada y dilatación en una rata del grupo (20%). Una rata del grupo (20%) presentó congestión en la corteza renal.

GRUPO TESTIGO TRATADO CON ACEITE DE MAÍZ

Se observó la presencia de petequias multifocales y edema difuso moderado en pulmones de las tres ratas del grupo (100%). En cerebro y cerebelo se observó congestión difusa moderada en un individuo (33%) del grupo. Una rata del grupo presento congestión en estómago.

GRUPO TESTIGO TRATADO CON DMSO (DIMETIL SULFÓXIDO)

Se observó la presencia de petequias multifocales y edema difuso moderado en pulmones de las tres ratas del grupo (100%). Dos ratas del grupo presentaron congestión difusa moderada en cerebro y cerebelo.

ANÁLISIS MICROSCÓPICO (HISTOLOGÍA)

LESIONES MICROSCÓPICAS OBSERVADAS EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES TRATADOS CON *ETIL (4-CLOROFENIL) CARBAMATO*.

Durante la revisión de los cortes de los grupos tratados con Etil (4-clorofenil) carbamato se observó que el órgano más afectado por la administración de este producto fue el hígado, esto debido a que fue el único órgano que presentó cambios histológicos diferentes a los encontrados en los grupos testigo. Todos los demás órganos que presentaron cambios patológicos, fueron similares a los encontrados en los grupos testigo, variando solo en la severidad de la lesión. Los resultados de los grupos testigo se resumen en el cuadro 5 (aceite de maíz) y en el cuadro 6 (aceite de maíz y DMSO).

Las lesiones observadas durante la revisión de las laminillas del grupo 1 tratado con 5 mg/kg de Etil (4-clorofenil) carbamato se resumen en el cuadro 7, en este se reportan los cambios patológicos encontrados en los órganos revisados de manera individual. En este grupo se observó que el hígado del 60% de las ratas del grupo presentó citoplasma granular (Degeneración albuminosa) en todo el parénquima y presencia de focos de células con citoplasma de color ligeramente más basófilo (Foto 1); los núcleos de los hepatocitos se vieron altamente eucromáticos (llamados así por presentar un patrón de cromatina muy fina dando al núcleo una apariencia blanquecina), además se encontraron aumentados en número los conductos biliares (3 a 4) del espacio porta (EP). El 40% restante presentó de igual forma degeneración albuminosa, células con citoplasma de color más basófilo y núcleos altamente eucromáticos (Foto 2), además de encontrarse focos en forma moderada de hepatocitos con núcleos de color basófilo liso homogéneo (Foto 3 y 4), también se encontró degeneración vacuolar leve y aumento en el número de conductos biliares (3 a 4) del EP.

Las lesiones observadas en el grupo 2 tratado con 50 mg/kg de Etil (4-clorofenil) carbamato se resumen en el cuadro 8. En este grupo se observó en el hígado del 80% de las ratas la presencia moderada de degeneración albuminosa y núcleos

altamente eucromáticos de manera difusa en él parénquima. También se observaron hepatocitos con núcleos de color basófilo liso homogéneo (Foto 5 y 6) distribuidos multifocalmente y de forma moderada, además de encontrar degeneración vacuolar leve y aumento en el número de conductos biliares (3 a 4) del EP; en el 20% restante solo se observó degeneración albuminosa y núcleos altamente eucromáticos en forma moderada sobre todo el corte; además aumento en el número de conductos biliares (3 a 4) del EP, degeneración vacuolar multifocal moderada y congestión moderada.

Las lesiones observadas en el grupo 3 tratado con 300 mg/kg de Etil (4-clorofenil) carbamato se resumen en el cuadro 9. En este se observó que el hígado del 50% del grupo presentó degeneración albuminosa difusa asociada a núcleos altamente eucromáticos, también se observaron hepatocitos con núcleos de color basófilo liso homogéneo distribuidos multifocalmente y de forma moderada, congestión difusa moderada y degeneración vacuolar multifocal moderada, 25% presentó degeneración albuminosa y núcleos altamente eucromáticos en forma difusa severa, aumento en el número de conductos biliares (3 a 4) del EP, congestión y degeneración vacuolar leve. En el otro 25% solo se observaron hepatocitos con núcleos basófilo liso homogéneo (Foto 7) distribuidos en forma difusa y de forma moderada, congestión difusa severa, degeneración vacuolar multifocal moderada y aumento en el número de conductos biliares (3 a 4) del EP. Cabe mencionar que en este grupo “n” equivale a 4 (n1=25%) ya que 1 de los individuos murió por la noche, encontrándose en la mañana con severos cambios *postmortem*. Por este motivo no se pudieron obtener muestras para histología.

Las lesiones observadas en el grupo 4 tratado con 2000 mg/kg de Etil (4-clorofenil) carbamato se resumen en el cuadro 10. En este grupo se observó que el hígado del 100% de las ratas presentó en forma difusa degeneración albuminosa asociada a núcleos altamente eucromáticos (Foto 8), además de presentar hepatocitos con núcleos de color basófilo liso homogéneo (Foto 9 y 10) distribuidos multifocalmente y de forma moderada, degeneración vacuolar multifocal leve, aumento en el número de conductos biliares (3 a 4) del EP y congestión difusa moderada. Cabe

mencionar que todas las ratas pertenecientes a este grupo murieron en un periodo menor a 24 hrs post tratamiento.

En el cuadro 11 se resumen las lesiones observadas en los 4 grupos tratados con Etil (4-clorofenil) carbamato y las observadas en ambos grupos testigos. En este cuadro se aprecia en primera instancia la presencia de hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos desde la dosis más baja en todas las ratas del grupo, observando este cambio histológico en la misma frecuencia (100%) en todos los grupos dosificados. También se aprecia en este cuadro como la presencia de focos de hepatocitos con núcleos basófilo homogéneos (focos necróticos) va en aumento conforme a la dosis. Esta lesión se encuentra en 2 ratas del grupo (40%) tratado con 5 mg/kg, en 4 ratas del grupo (80%) tratado con 50 mg/kg, en 4 ratas del grupo (100%) tratado con 300 mg/kg y en 5 ratas del grupo (100%) tratado con 2000 mg/kg. Cabe mencionar que una de las ratas del grupo tratado con 300 mg/kg de Etil (4-clorofenil) carbamato presentó en forma difusa moderada estos hepatocitos con núcleos basófilo homogéneos, evidenciando una necrosis difusa severa.

LESIONES MICROSCÓPICAS OBSERVADAS EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES TRATADOS CON *ETIL (4-BROMOFENIL) CARBAMATO*.

Durante la revisión de los cortes de los grupos tratados con Etil (4-bromofenil) carbamato, se observó que los órganos afectados fueron el hígado y el riñón. En las tres primeras dosis (5, 50 y 300 mg/kg) el hígado fue el único órgano que presentó cambios patológicos. En la dosis de 2000 mg/kg se observaron cambios tanto hepáticos como renales. Todos los demás órganos que presentaron cambios patológicos fueron similares a los encontrados en los grupos testigo, variando solo en la severidad de algunos cambios histológicos.

Las lesiones observadas en el grupo 5 tratado con 5 mg/kg de Etil (4-clorofenil) carbamato se resumen en el cuadro 12. En este grupo se observó en el hígado de 1 rata degeneración albuminosa asociada a núcleos altamente eucromáticos, además de encontrarse hepatocitos con núcleos de color basófilo liso homogéneo distribuidos multifocalmente y degeneración vacuolar multifocal leve (Foto 11 y 12).

Las lesiones observadas en el grupo 6 tratado con 50 mg/kg de Etil (4-clorofenil) carbamato se resumen en el cuadro 13. En este se observó que el hígado del 20% del grupo presentó degeneración albuminosa y citoplasma ligeramente grisáceo (Foto 13) asociada a núcleos altamente eucromáticos, congestión difusa leve, aumento en el número de conductos biliares (3 a 4) del EP y degeneración vacuolar periacinar focal leve (Foto 14).

Las lesiones observadas en el grupo 7 tratado con 300 mg/kg de Etil (4-clorofenil) carbamato se resumen en el cuadro 14. En este grupo se observó en el 100% de las ratas la presencia de degeneración albuminosa difusa asociada a núcleos altamente eucromáticos (Foto 15), congestión difusa leve, aumento en el número de conductos biliares (3 a 4) del EP, aumento de células binucleadas (Foto 16).

Las lesiones observadas en el grupo 8 tratado con 2000 mg/kg de Etil (4-clorofenil) carbamato se resumen en el cuadro 15. En el hígado del 60% del grupo se observó hepatocitos con citoplasma grisáceo y degeneración albuminosa (Foto 17) difusa asociada a núcleos altamente eucromáticos, además de presentar núcleos de color basófilo liso homogéneo (Foto 18) distribuidos multifocalmente y de forma moderada, congestión difusa moderada, degeneración vacuolar, y aumento en el número de conductos biliares (3 a 4) del EP. El hígado del 40% restante presentó degeneración albuminosa asociada a núcleos altamente eucromáticos, aumento de hepatocitos binucleados (>6 por campo), aumento en el número de conductos biliares (3 a 4) del EP, congestión y degeneración vacuolar difusa leve. En riñón se observó en el 40% de las ratas una coloración blanquecina sobre la corteza en forma zonal severa, el citoplasma se observa granular y los núcleos de esta zona se aprecian ligeramente picnóticos (necrosis coagulativa), también se encontró congestión leve (Foto 19 y 20).

En el cuadro 16 se resumen las lesiones observadas en los 4 grupos dosificados con Etil (4-bromofenil) carbamato y se comparan con las observadas en ambos grupos testigos. En este cuadro se aprecia como la incidencia de hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos así como la presencia de hepatocitos con núcleos basófilo homogéneo es baja en los primeros dos grupos, encontrando solo a una rata por grupo con estos cambios. Se observa como la presencia de hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos en la totalidad del grupo se da hasta la dosis de 300 mg/kg, encontrando en la misma dosis un aumento de hepatocitos con doble núcleo en todo el grupo. La presencia de hepatocitos con núcleo basófilo homogéneo se observa hasta el grupo tratado con 2000 mg/kg encontrándose este cambio en tres ratas del grupo.

CUADRO 5: Cambios histológicos encontrados en el grupo control tratado con aceite de maíz.

	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	CORAZÓN	MEE	CEREBRO	CEREBELO	ESTÓMAGO
1	DV; C; ACB.	DA; C; GIT.	NI.	SCP.	SCP.	SCP.	CM.	C.
2	DV; ACB.	DA; C; GIT.	NI.	C.	SCP.	SCP.	CM.	SCP.
3	DV; C; ACB.	DA; C; GIT.	NI.	C.	SCP.	C y EP.	SCP.	C.

Hígado: DV=Degeneración vacuolar; C=Congestión; ACB=Aumento de número de conductos biliares.

Riñón: DA=Degeneración albuminosa tubular; GIT=Gránulos intracitoplasmáticos tubulares.

Pulmón: NI=Neumonía intersticial.

Corazón y músculo esquelético (MEE): SCP=Sin cambios patológicos aparentes; C=Congestión.

Cerebro y cerebelo: CM=Congestión meníngea; C y EP=Congestión y edema perivascular; SCP=Sin cambios patológicos.

Estómago: SCP=Sin cambios patológicos aparentes; C=Congestión.

CUADRO 6: Cambios histológicos encontrados en el grupo control tratado con DMSO.

	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	CORAZÓN	MEE	CEREBRO	CEREBELO	ESTÓMAGO
1	ACB.	DA; C.	NI.	C.	SCP.	C y EP.	CM.	C.
2	C; ACB.	DA; C; GIT.	NI.	C.	SCP.	SCP.	CM.	C.
3	ACB.	DA; C.	NI.	SCP.	SCP.	SCP.	CM.	SCP.

Hígado: C=Congestión; ACB=Aumento de número de conductos biliares.

Riñón: DA=Degeneración albuminosa tubular; C=Congestión; GIT=Gránulos intracitoplasmáticos tubulares.

Pulmón: NI=Neumonía intersticial.

Corazón y músculo esquelético (MEE): SCP=Sin cambios patológicos aparentes; C=Congestión.

Cerebro y cerebelo: CM=Congestión meníngea; C y EP=Congestión y edema perivascular; SCP=Sin cambios patológicos.

Estómago: SCP=Sin cambios patológicos aparentes; C=Congestión.

CUADRO 7: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 5mg/kg de etil (4-clorofenil) carbamato

	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	CORAZÓN	MEE	CEREBRO	CEREBELO	ESTÓMAGO
1	DA; NE; ACB.	DA.	NI.	SCP.	SCP.	CM; C y EP;	CM.	SCP.
2	DA; NE/NH; ACB; DV.	DA; C.	NI; C; H.	SCP.	SCP.	C y EP.	CM.	C.
3	DA; C; NE/NH; ACB; DV.	DA; C; H.	NI.	C.	SCP.	CM; C y EP.	CM; C y EP.	C.
4	DA; NE; ACB.	DA; C; H.	NI.	C.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.
5	DA; NE; ACB.	DA; C; H.	NI.	C.	SCP.	SCP.	SCP.	C.

Hígado: DA=Degeneración albuminosa; C=Congestión; NE=Hepaticitos con núcleos altamente eucromáticos; NE/NH=Hepaticitos con núcleos altamente eucromáticos y focos de hepaticitos con núcleos basófilos homogéneos; ACB=Aumento de número de conductos biliares; DV=Degeneración vacuolar.

47 • **Riñón:** DA=Degeneración albuminosa tubular; C=Congestión; H=Hemorragia; GIT=Gránulos intracitoplasmáticos tubulares.

Pulmón: NI=Neumonía intersticial; C=Congestión; Hemorragia.

Corazón y músculo esquelético (MEE): SCP=Sin cambios patológicos aparentes; C=Congestión.

Cerebro y cerebelo: CM=Congestión meníngea; C y EP=Congestión y edema perivascular; SCP=Sin cambios patológicos.

Estómago: SCP=Sin cambios patológicos aparentes; C=Congestión.

CUADRO 8: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 50mg/kg de etil (4-clorofenil) carbamato

	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	CORAZÓN	MEE	CEREBRO	CEREBELO	ESTÓMAGO
1	DA; NE/NH; DV.	DA; C.	NI.	SCP.	SCP.	C y EP.	CM.	SCP.
2	DA; NE/NH; DV; C; ACB.	DA; C.	NI.	SCP.	SCP.	C y EP.	CM.	SCP.
3	DA; NE/NH; DV.	DA; C.	NI.	H.	SCP.	CM.	CM.	SCP.
4	DA; NE/NH; DV.	DA; C.	NI.	C.	SCP.	C y EP.	CM; C y EP.	C.
5	DA; NE; C; ACB.	DA; C; NB.	NI.	SCP.	SCP.	CM.	CM; C y EP.	SCP.

Hígado: DA=Degeneración albuminosa; NE=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos; NE/NH=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos y focos de hepatocitos con núcleos basófilos homogéneos; DV=Degeneración vacuolar; C=Congestión; ACB=Aumento de número de conductos biliares.

Riñón: DA=Degeneración albuminosa tubular; C=Congestión; NB=Núcleos blancos.

Pulmón: NI=Neumonía intersticial.

Corazón y músculo esquelético (MEE): SCP=Sin cambios patológicos aparentes; H=Hemorragia; C=Congestión.

Cerebro y cerebelo: C y EP=Congestión y edema perivascular; CM=Congestión meníngea.

Estómago: SCP=Sin cambios patológicos aparentes; C=Congestión.

CUADRO 9: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 300mg/kg de etil (4-clorofenil) carbamato

	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	CORAZÓN	MEE	CEREBRO	CEREBELO	ESTÓMAGO
1	NO SE OBTUVIERON MUESTRAS.							
2	DA; NH; ACB; C.	DA; C.	NI.	C.	SCP.	C y EP.	SCP.	SCP.
3	DA; NE; DV; ACB; C.	DA; C; GIT; NC.	NI.	SCP.	SCP.	SCP.	C y EP; CM.	C.
4	DA; NE/NH; DV; C.	DA; C; GIT.	NI.	C.	SCP.	SCP.	CM.	C.
5	DA; NE/NH; DV; C.	DA; C; GIT.	NI.	SCP.	SCP.	C y EP.	CM; C y EP.	SCP.

Hígado: DA=Degeneración albuminosa; NE=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos; NE/NH=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos y focos de hepatocitos con núcleos basófilos homogéneos; NH=Hepatocitos con núcleos basófilos homogéneos; DV=Degeneración vacuolar; C=Congestión; ACB=Aumento de número de conductos biliares.

Riñón: DA=Degeneración albuminosa tubular; C=Congestión; GIT=Gránulos intracitoplasmáticos tubulares; NC=Necrosis coagulativa.

Pulmón: NI=Neumonía intersticial.

Corazón y músculo esquelético (MEE): SCP=Sin cambios patológicos aparentes; C=Congestión.

Cerebro y cerebelo: C y EP=Congestión y edema perivascular; CM=Congestión meníngea; SCP=Sin cambios patológicos aparentes.

Estómago: SCP=Sin cambios patológicos aparentes; C=Congestión.

CUADRO 10: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 2000mg/kg de etil (4-clorofenil) carbamato

	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	CORAZÓN	MEE	CEREBRO	CEREBELO	ESTÓMAGO
1	DA; NE; NH; DV; ACB; C.	DA; C; GIT.	NI; H.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.	C.
2	DA; NE; NH; DV; ACB; C.	DA; C; GIT.	NI.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.
3	DA; NE; NH; DV; ACB; C.	DA; C; GIT; DV.	NI; H.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.
4	DA; NE; NH; DV; ACB; C.	DA; C; GIT.	NI; H.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.
5	DA; NE; NH; DV; ACB; C.	DA; C; GIT.	NI.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.

Hígado: DA=Degeneración albuminosa; NE=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos; NE/NH=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos y focos de hepatocitos con núcleos basófilos homogéneos; DV=Degeneración vacuolar; ACB=Aumento de número de conductos biliares; C=Congestión.

Riñón: DA=Degeneración albuminosa tubular; C=Congestión; GIT=Gránulos intracitoplasmáticos tubulares; DV=Degeneración vacuolar.

Pulmón: NI=Neumonía intersticial; H=Hemorragia.

Corazón y músculo esquelético (MEE): SCP=Sin cambios patológicos aparentes.

Cerebro y cerebelo: CM=Congestión meníngea; SCP=Sin cambios patológicos aparentes.

Estómago: C=Congestión; SCP=Sin cambios patológicos aparentes.

CUADRO 11: Muestra la comparación de los principales cambios histológicos encontrados en hígado de los grupos experimentales tratados con Etil (4-clorofenil) carbamato y los grupos control tratados con aceite de maíz/DMSO.

Lesión	Gpo. 5mg/kg					Gpo. 50mg/kg					Gpo. 300mg/kg					Gpo. 2000mg/kg					Gpo. Maíz			Gpo. DMSO		
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3
C	/	/	P	/	/	/	P	/	/	P	*	P	P	P	P	P	P	P	P	P	/	/	P	/	P	/
DA	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	*	/	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
DV	/	P	P	/	/	P	P	P	P	/	*	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	/	/	/
ACB	P	P	P	P	P	/	P	/	/	P	*	P	P	/	/	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
NE	P	/	/	P	P	/	/	/	/	P	*	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
NE/NH	/	P	P	/	/	P	P	P	P	/	*	/	P	P	P	P	P	P	P	P	/	/	/	/	/	/
NH	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	*	P	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Gpo.=Grupo; **T.**=Testigo; **C**=Congestión; **DA**=Degeneración albuminosa; **DV**=Degeneración vacuolar; **ACB**=Aumento de número de conductos biliares; **NE**=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos; **NE/NH**=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos y focos de hepatocitos con núcleos basófilos homogéneos; **NH**=Hepatocitos con núcleos basófilo homogéneos (necrosis difusa severa); **P**=Presente; **/**=Ausente; *****=No muestreado.

CUADRO 12: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 5mg/kg de Etil (4-bromofenil) carbamato

	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	CORAZÓN	MEE	CEREBRO	CEREBELO	ESTÓMAGO
1	DA; C; ACB.	DA; C.	NI.	C.	SCP.	SCP.	CM.	SCP.
2	DA; C; ACB.	DA; C.	NI.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.
3	DA; C; ACB.	DA; C.	NI.	C.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.
4	DA; NE/NH; DV.	DA; C.	NI.	SCP.	SCP.	SCP.	CM.	SCP.
5	DA; C; ACB.	SCP.	NI.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.

Hígado: C=Congestión; ACB=Aumento de número de conductos biliares; DA=Degeneración albuminosa; NE/NH=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos y focos de hepatocitos con núcleos basófilos homogéneos; DV=Degeneración vacuolar.

Riñón: DA=Degeneración albuminosa tubular; C=Congestión; SCP=Sin cambios patológicos aparentes.

Pulmón: NI=Neumonía intersticial.

Corazón y músculo esquelético (MEE): C=Congestión; SCP=Sin cambios patológicos aparentes.

Cerebro y cerebelo: CM=Congestión meníngea; SCP=Sin cambios patológicos.

Estómago: SCP=Sin cambios patológicos aparentes.

CUADRO 13: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 50mg/kg de Etil (4-bromofenil) carbamato

	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	CORAZÓN	MEE	CEREBRO	CEREBELO	ESTÓMAGO
1	DA; NE; C; ACB; DV.	DA; C.	NI.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.
2	DA; C; ACB.	DA; C.	NI.	C.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.
3	DA; C; ACB.	DA; C.	NI; H.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.
4	DA; C; ACB.	DA; C.	NI.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.
5	DA; C; ACB.	DA; C; NB.	NI.	C.	SCP.	SCP.	CM.	C.

Hígado: DA=Degeneración albuminosa; NE=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos; C=Congestión; ACB=Aumento de número de conductos biliares; DV=Degeneración vacuolar.

Riñón: DA=Degeneración albuminosa tubular; C=Congestión; NB=Núcleos blancos.

Pulmón: NI=Neumonía intersticial; H=Hemorragia.

Corazón y músculo esquelético (MEE): SCP=Sin cambios patológicos aparentes; C=Congestión.

Cerebro y cerebelo: SCP=Sin cambios patológicos aparentes; CM=Congestión meníngea.

Estómago: SCP=Sin cambios patológicos aparentes; C=Congestión.

CUADRO 14: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 300mg/kg de Etil (4-bromofenil) carbamato

	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	CORAZÓN	MEE	CEREBRO	CEREBELO	ESTÓMAGO
1	DA; NE; CB; ACB; C.	DA; GIT.	NI	C.	SCP.	CM.	CM.	C.
2	DA; NE; CB; ACB; C.	DA; C.	NI.	C.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.
3	DA; NE; DV; CB; ACB; C.	DA; C; GIT.	NI.	C.	SCP.	SCP.	SCP.	SCP.
4	DA; NE; CB; ACB; C.	DA; C; GIT.	NI.	C.	SCP.	CM; C y EP.	CM.	SCP.
5	DA; NE; DV; CB; ACB C.	DA; C.	NI.	C.	SCP.	CM; C y EP.	CM.	SCP.

Hígado: DA=Degeneración albuminosa; NE=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos; DV=Degeneración vacuolar; CB=Hepatocitos con doble núcleo (>6/campo); ACB=Aumento de número de conductos biliares; C=Congestión.

Riñón: DA=Degeneración albuminosa tubular; C=Congestión; GIT=Gránulos intracitoplasmáticos tubulares; NC=Necrosis coagulativa.

Pulmón: NI=Neumonía intersticial.

Corazón y músculo esquelético (MEE): C=Congestión; SCP=Sin cambios patológicos aparentes.

Cerebro y cerebelo: CM=Congestión meníngea; C y EP=Congestión y edema perivascular; SCP=Sin cambios patológicos aparentes.

Estómago: SCP=Sin cambios patológicos aparentes; C=Congestión.

CUADRO 15: Cambios histológicos encontrados en el grupo experimental tratado con 2000mg/kg de Etil (4-bromofenil) carbamato

	HÍGADO	RIÑÓN	PULMÓN	CORAZÓN	MEE	CEREBRO	CEREBELO	ESTÓMAGO
1	DA; NE/NH; DV; ACB; C.	DA; C; GIT.	NI.	C.	SCP.	SCP	SCP.	C.
2	DA; NE; CB; DV; ACB; C.	DA; C; GIT.	NI.	SCP.	SCP.	SCP	SCP.	C.
3	DA; NE/NH; DV; ACB; C.	DA; CCB; NC.	NI.	SCP.	SCP.	SCP	SCP.	SCP.
4	DA; NE/NH; ACB; C.	DA; CCB; NC.	NI.	C.	SCP.	SCP	SCP.	SCP.
5	DA; NE; CB; DV; ACB; C.	DA; C; GIT.	NI.	SCP.	SCP.	DN.	SCP.	C.

Hígado: DA=Degeneración albuminosa; NE=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos; NE/NH=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos y focos de hepatocitos con núcleos basófilos homogéneos; CB=Hepatocitos con doble núcleo (>6/campo); DV=Degeneración vacuolar; ACB=Aumento de número de conductos biliares; C=Congestión.

Riñón: DA=Degeneración albuminosa tubular; C=Congestión; GIT=Gránulos intracitoplasmáticos tubulares; CCB=Corteza renal con citoplasma blanquizco; NC=Necrosis coagulativa

Pulmón: NI=Neumonía intersticial; H=Hemorragia.

Corazón y músculo esquelético (MEE): C=Congestión; SCP=Sin cambios patológicos aparentes.

Cerebro y cerebelo: C y EP=Congestión y edema perivascular; DN=Degeneración neuronal; CM=Congestión meníngea; SCP=Sin cambios patológicos aparentes.

Estómago: C=Congestión; SCP=Sin cambios patológicos aparentes.

CUADRO 16: Comparación de los principales cambios histológicos encontrados en hígado de los grupos experimentales tratados con etil (4-bromofenil) carbamato y los grupos control tratados con aceite de maíz/DMSO.

Lesión	Gpo. 5mg/kg					Gpo. 50mg/kg					Gpo. 300mg/kg					Gpo. 2000mg/kg					Gpo. Maíz			Gpo. DMSO		
	Individuos					Individuos					Individuos					Individuos					Individuos			Individuos		
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3
C	P	P	P	/	/	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	/	/	P	/	P	/
DA	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
DV	/	/	/	P	/	/	/	/	/	/	/	/	P	/	/	P	P	P	/	P	P	P	P	/	/	/
ACB	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
NE	/	/	/	/	/	P	/	/	/	/	P	P	P	P	P	/	P	/	/	P	/	/	/	/	/	/
NE/NH	/	/	/	P	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	P	/	P	P	/	/	/	/	/	/	/
NH	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
CB	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	P	P	P	P	P	/	/	P	/	P	/	/	/	/	/	/

Gpo.=Grupo; **T.**=Testigo; **A.**=Aceite; **C**=Congestión; **DA**=Degeneración albuminosa; **DV**=Degeneración vacuolar; **ACB**=Aumento de número de conductos biliares; **NE**=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos; **NE/NH**=Hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos y focos de hepatocitos con núcleos basófilos homogéneos; **NH**=Hepatocitos con núcleos basófilo homogéneos; **CB**=Hepatocitos con núcleo doble (>6/campo); **P**=Presente; **/**=Ausente.

MICROFOTOGRAFÍAS

DESCRIPCIÓN MICROFOTOGRAFÍAS

Foto 1.- Hígado de rata tratada con 5 mg/kg de *Etil (4-clorofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 10x. En la parte inferior izquierda de la imagen se observa la presencia de un foco de hepatocitos con núcleos basófilos homogéneo. En la vena porta se aprecia congestión leve y los sinusoides se observan ligeramente dilatados (»).

Foto 2.- Hígado de rata tratada con 5 mg/kg de *Etil (4-clorofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 40x: En la parte superior de la imagen se observa un hepatocito con degeneración albuminosa y doble núcleo basófilo homogéneo (*). En la parte inferior se aprecian algunos núcleos altamente eucromáticos (»).

Foto 3.- Hígado de rata tratada con 5 mg/kg de *Etil (4-clorofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 10x: Se observa del lado izquierdo de la imagen un foco severo de hepatocitos con el núcleo basófilo homogéneo.

Foto 4.- Hígado de rata tratada con 5 mg/kg de *Etil (4-clorofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 40x: En esta imagen se observa la degeneración albuminosa y los núcleos basófilos homogéneos en los hepatocitos en mayor aumento, también se aprecia congestión leve en los sinusoides.

Foto 5.- Hígado de rata tratada con 50 mg/kg de *Etil (4-clorofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 10x: Se observa del lado izquierdo de la imagen un foco moderado de hepatocitos que presentan un núcleo basófilo liso homogéneo.

Foto 6.- Hígado de rata tratada con 50 mg/kg de *Etil (4-clorofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 40x: En esta imagen se observa el límite de la zona de lesión. Se puede apreciar del lado inferior izquierdo hepatocitos con núcleos basófilo liso homogéneos. Del lado superior se observan

los hepatocitos con degeneración albuminosa y degeneración vacuolar leve. Los sinusoides se encuentran distendidos y con congestión leve.

Foto 7.- Hígado de rata tratada con 300 mg/kg de *Etil (4-clorofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 10x: En esta imagen se observan los hepatocitos con núcleos basófilo liso homogéneo de manera difusa severa. También se aprecia congestión moderada de los sinusoides y del espacio porta en forma difusa.

Foto 8.- Hígado de rata tratada con 2000 mg/kg de *Etil (4-clorofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 10x: En esta imagen se observan los núcleos basófilo liso homogéneo de los hepatocitos de manera difusa moderada cercanos a la vena central, la cual se observa dilatada al igual que los sinusoides lo que indica un cuadro congestivo moderado.

Foto 9.- Hígado de rata tratada con 2000 mg/kg de *Etil (4-clorofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 40x: En esta imagen se observan los hepatocitos con degeneración albuminosa moderada; algunos hepatocitos presentan núcleos altamente eucromáticos (») cercanos al espacio porta. También se observa congestión en el espacio porta.

Foto 10.- Hígado de rata tratada con 2000 mg/kg de *Etil (4-clorofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 40x: En esta imagen se observan los núcleos basófilo homogéneos de los hepatocitos, en el citoplasma se observa degeneración albuminosa moderada; los sinusoides son poco aparentes. También se observa congestión leve.

Foto 11.- Hígado de rata tratada con 5 mg/kg de *Etil (4-bromofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 10x: Se aprecia del lado izquierdo de la imagen un foco de hepatocitos con núcleos basófilo liso homogéneo. Del otro lado de la imagen se aprecian los hepatocitos altamente eucromáticos, los cuales se observan con puntos blancos en el núcleo (»). También se puede observar congestión difusa severa.

Foto 12.- Hígado de rata tratada con 5 mg/kg de *Etil (4-bromofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 40x: En este acercamiento se observan los hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos (»), también se aprecia un aumento en el número de hepatocitos con núcleos picnóticos dobles (*), además de congestión moderada.

Foto 13.- Hígado de rata tratada con 50 mg/kg de *Etil (4-bromofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 10x: Se observa del lado inferior izquierdo de la imagen un foco de hepatocitos con citoplasma grisáceo y núcleo levemente basófilo liso homogéneo (»). También se observa congestión leve.

Foto 14.- Hígado de rata tratada con 50 mg/kg de *Etil (4-bromofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 10x: En esta imagen se aprecia dilatación de los sinusoides hepáticos y congestión leve.

Foto 15.- Hígado de rata tratada con 300 mg/kg de *Etil (4-bromofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 10x: En esta imagen se observa la presencia de núcleos altamente eucromáticos (»), además de observarse congestión moderada difusa.

Foto 16.- Hígado de rata tratada con 300 mg/kg de *Etil (4-bromofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 40x: En esta imagen se observa una gran cantidad de hepatocitos con núcleos dobles; algunos de éstos se observan ligeramente azules (»). También se puede observar congestión moderada y degeneración albuminosa moderada.

Foto 17.- Hígado de rata tratada con 2000 mg/kg de *Etil (4-bromofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 10x: Se puede observar de lado izquierdo superior un foco de hepatocitos con núcleo basófilo liso homogéneo y citoplasma de color azul grisáceo (»). También se puede observar congestión moderada en este foco de lesión.

Foto 18.- Hígado de rata tratada con 2000 mg/kg de *Etil (4-bromofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 40x: En este acercamiento se

observan hepatocitos con núcleo basófilo liso homogéneo con el citoplasma azul grisáceo (»). Se aprecian algunos núcleos altamente eucromáticos (*), además de células con núcleos dobles.

Foto 19.- Riñón de rata tratada con 2000 mg/kg de *Etil (4-bromofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 40x: Se observa del lado izquierdo de la imagen una zona de la corteza renal de color eosinófilo homogéneo, que corresponde a túbulos contorneados tanto proximales como distales, los cuales se aprecian hinchados y en algunas zonas se pierde el detalle celular.

Foto 20.- Riñón de rata tratada con 2000 mg/kg de *Etil (4-bromofenil) carbamato*; Tinción utilizada Hematoxilina-Eosina; Vista 40x: En este acercamiento se observa el citoplasma de una coloración morado grisáceo de las células epiteliales que conforman los túbulos renales con sus núcleos picnóticos.

MICROFOTOGRAFÍAS

Foto 1: Hígado; LQM 996; 5mg/kg

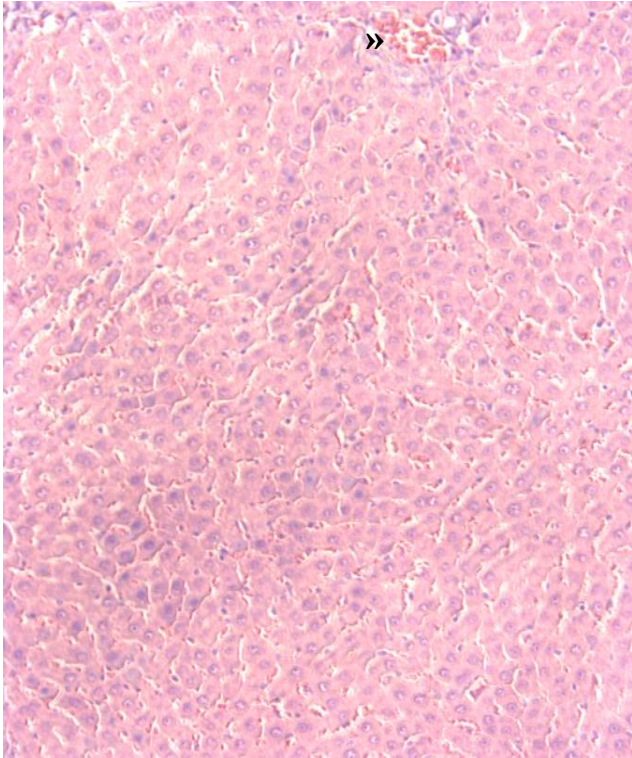


Foto 2: Hígado; LQM 996; 5mg/kg

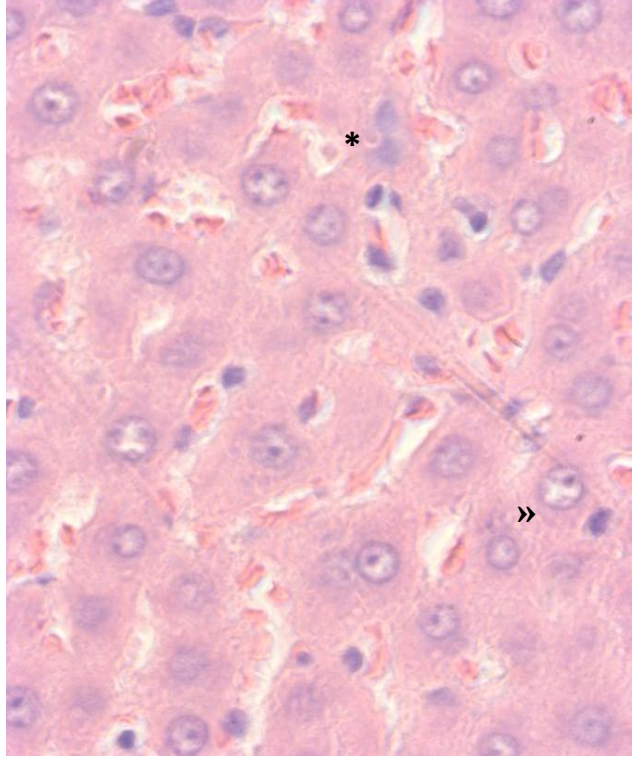


Foto 3: Hígado; LQM 996; 5mg/kg

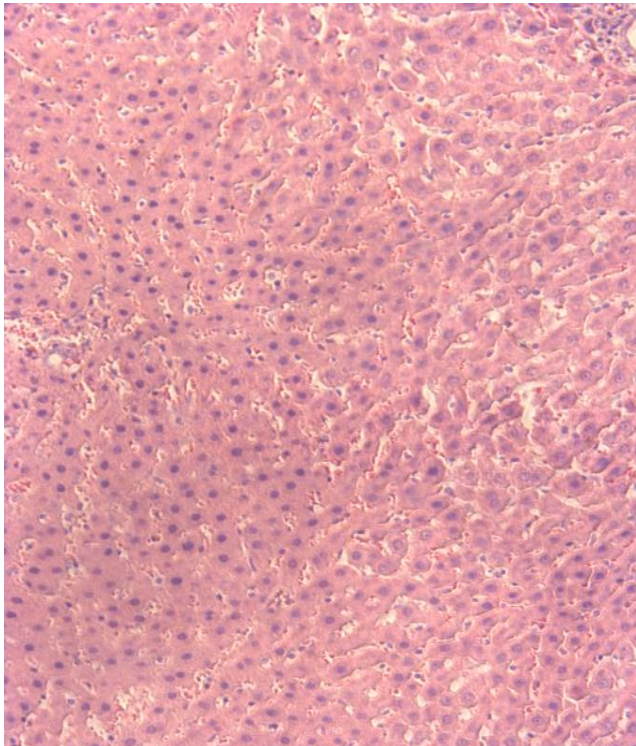


Foto 4: Hígado; LQM 996; 5mg/kg

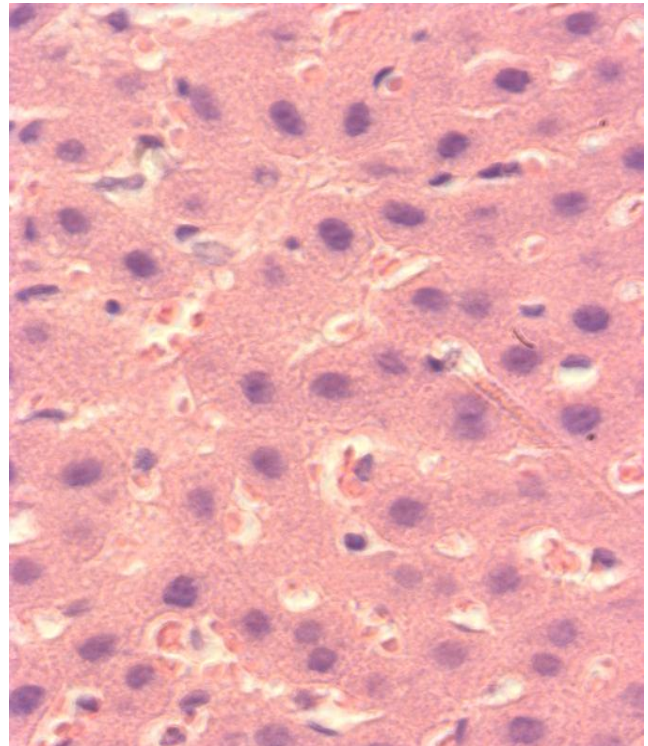


Foto 5: Hígado; LQM 996; 50mg/kg

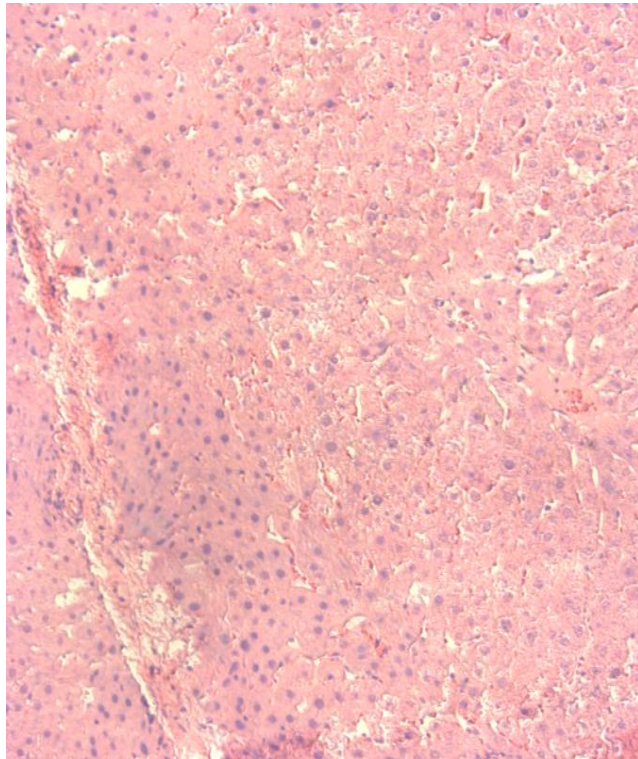


Foto 6: Hígado; LQM 996; 50mg/kg

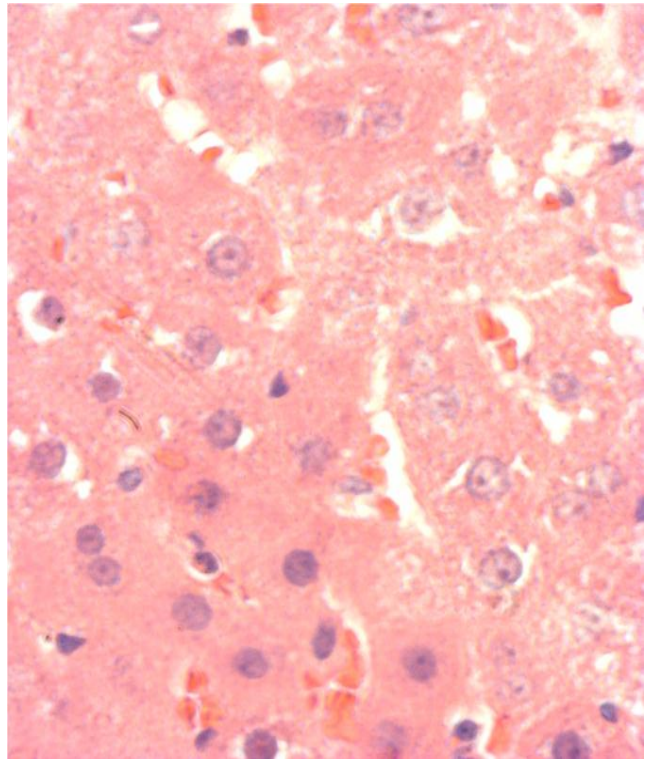


Foto 7: Hígado; LQM 996; 300mg/kg

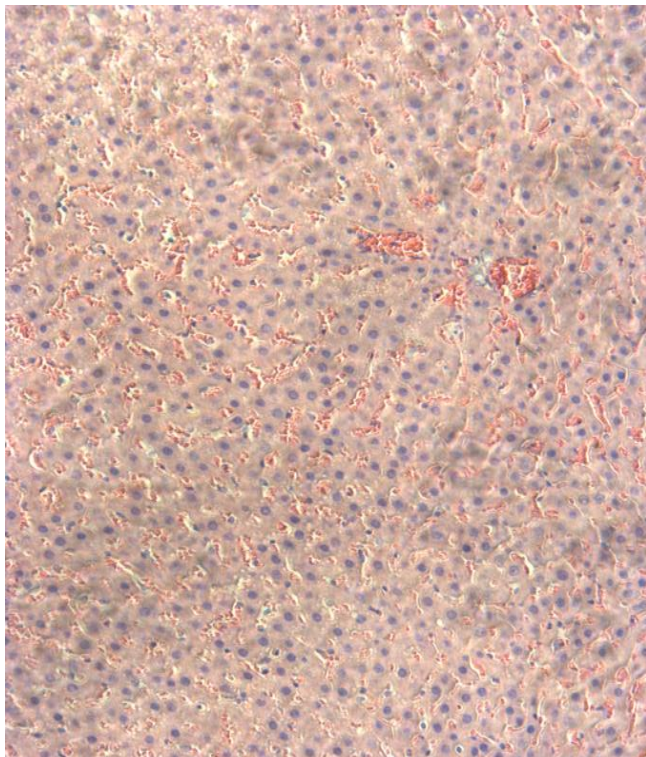


Foto 8: Hígado; LQM 996; 2000mg/kg

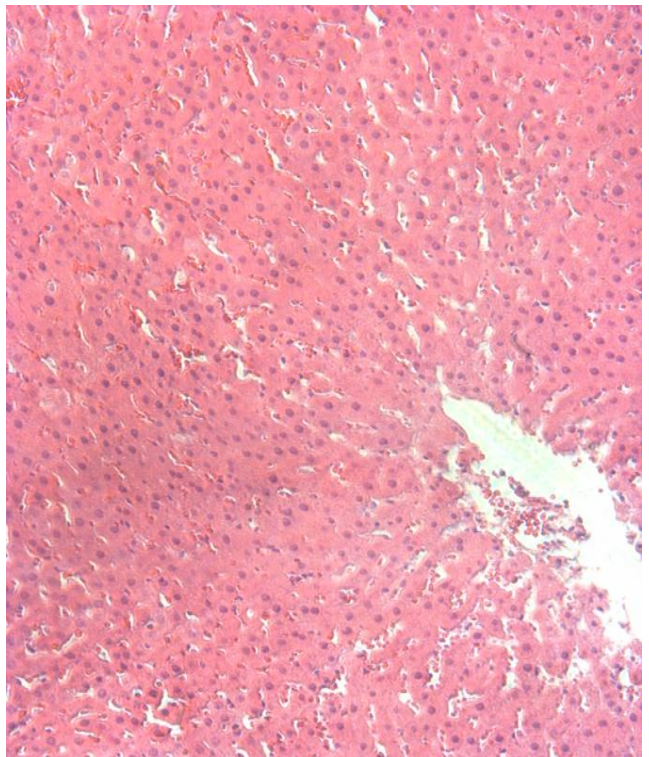


Foto 9: Hígado; LQM 996; 2000mg/kg

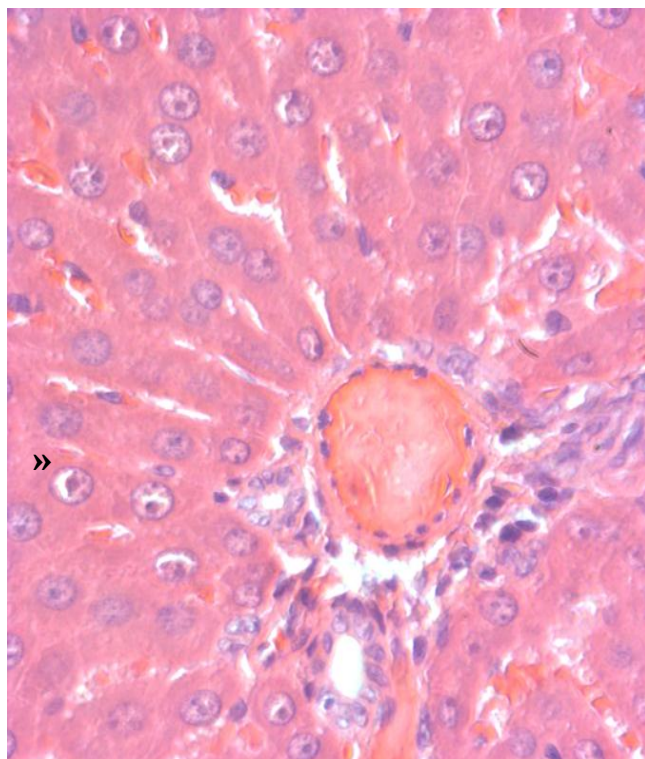


Foto 10: Hígado; LQM 996; 2000mg/kg

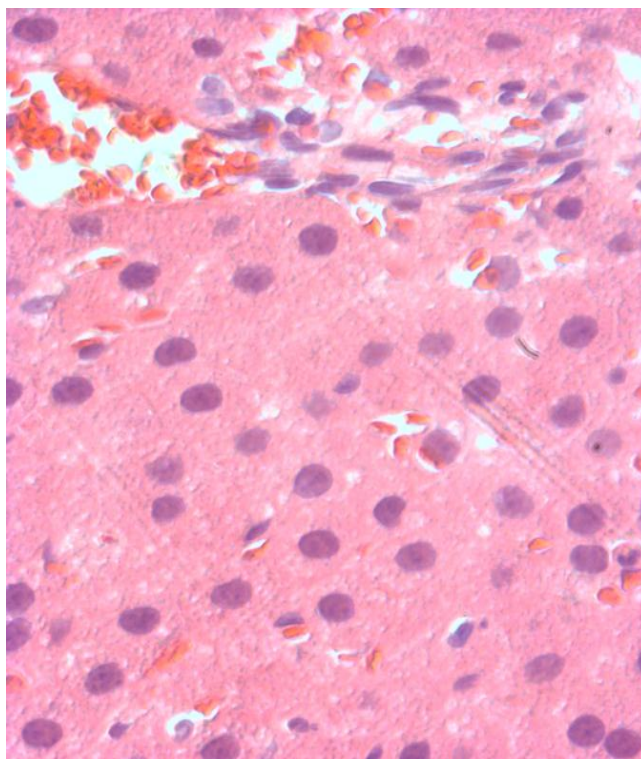


Foto 11: Hígado; LQM 919; 5mg/kg

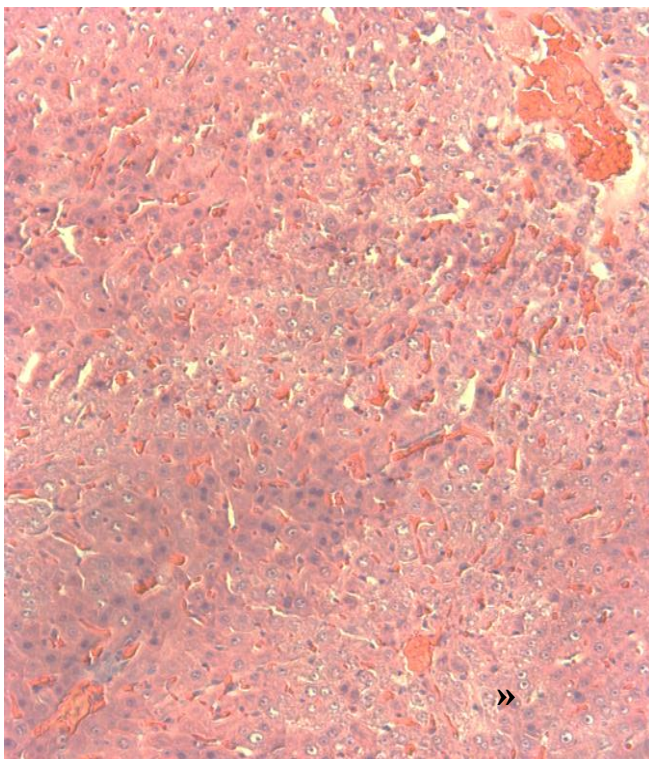


Foto 12: Hígado; LQM 919; 5mg/kg

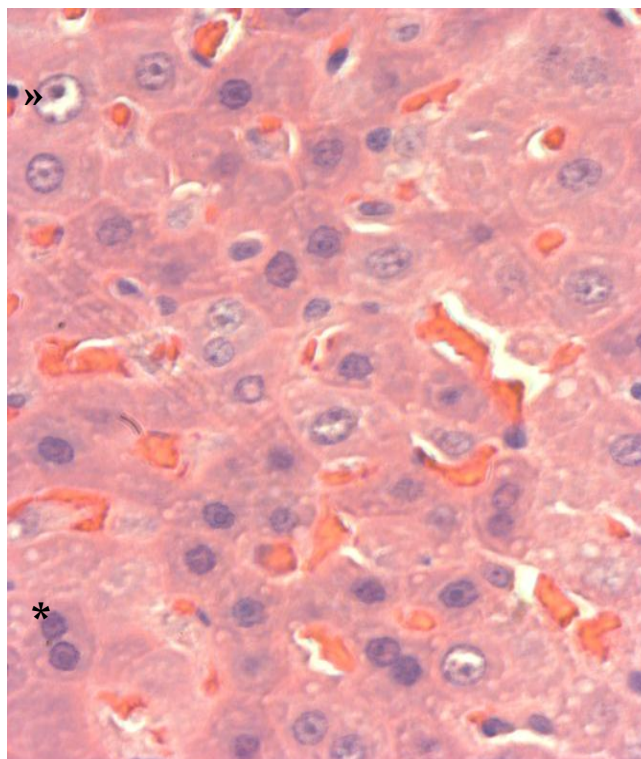


Foto 13: Hígado; LQM 919; 50mg/kg

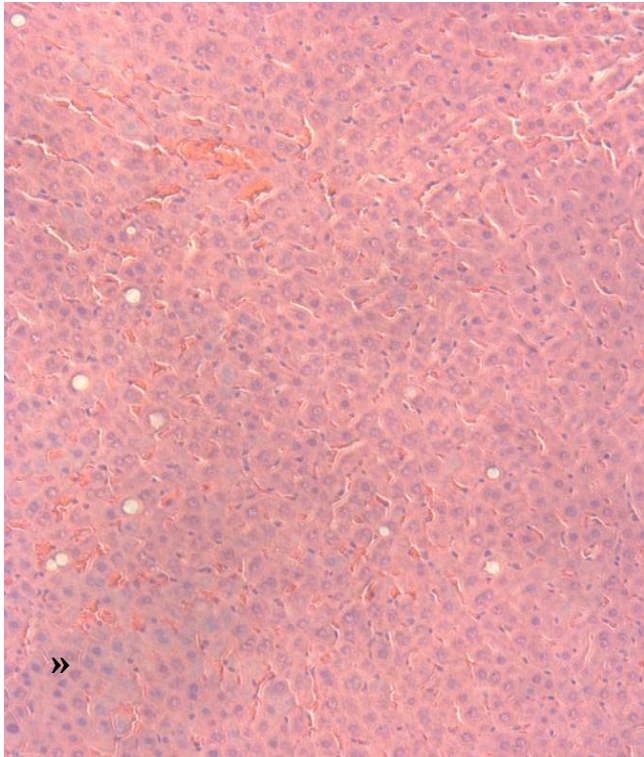


Foto 14: Hígado; LQM 919; 50mg/kg

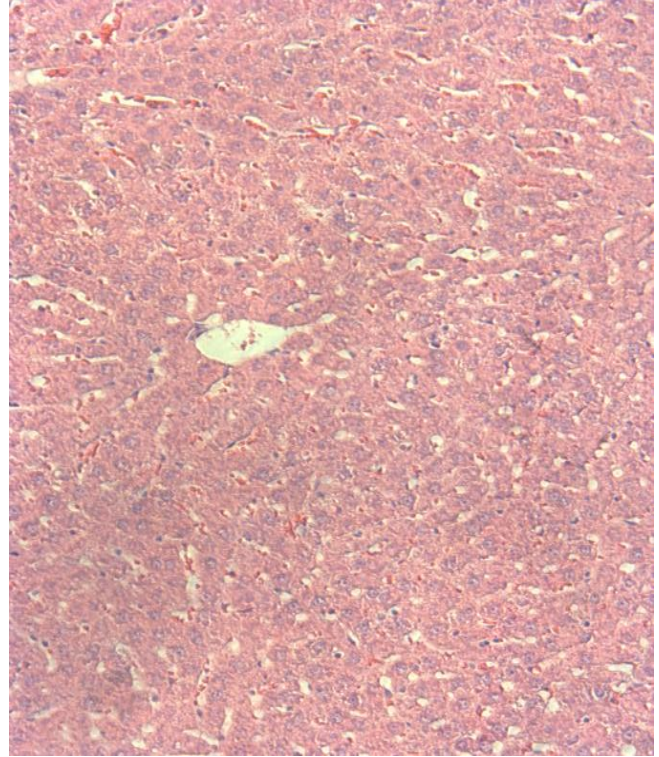


Foto 15: Hígado; LQM 919; 300mg/kg

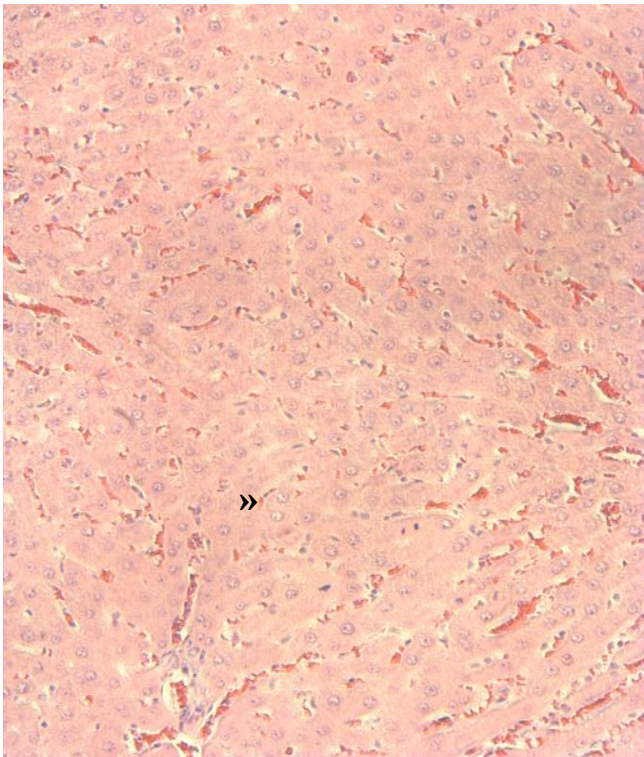


Foto 16: Hígado; LQM 919; 300mg/kg

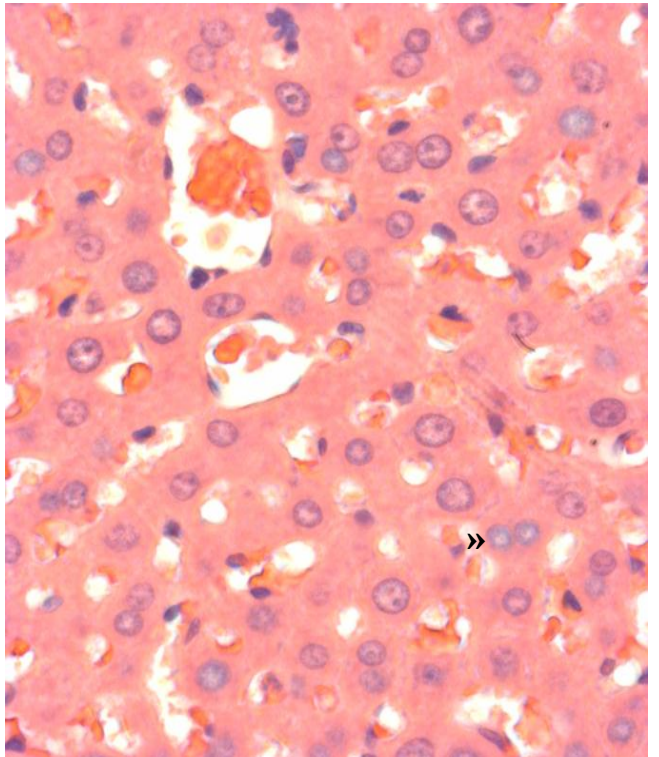


Foto 17: Hígado; LQM 919; 2000mg/kg

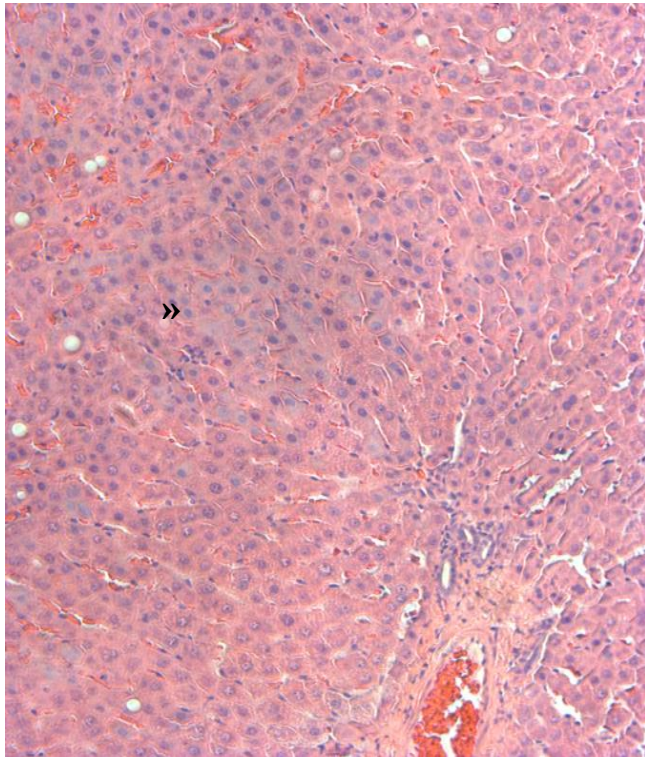


Foto 18: Hígado; LQM 919; 2000mg/kg

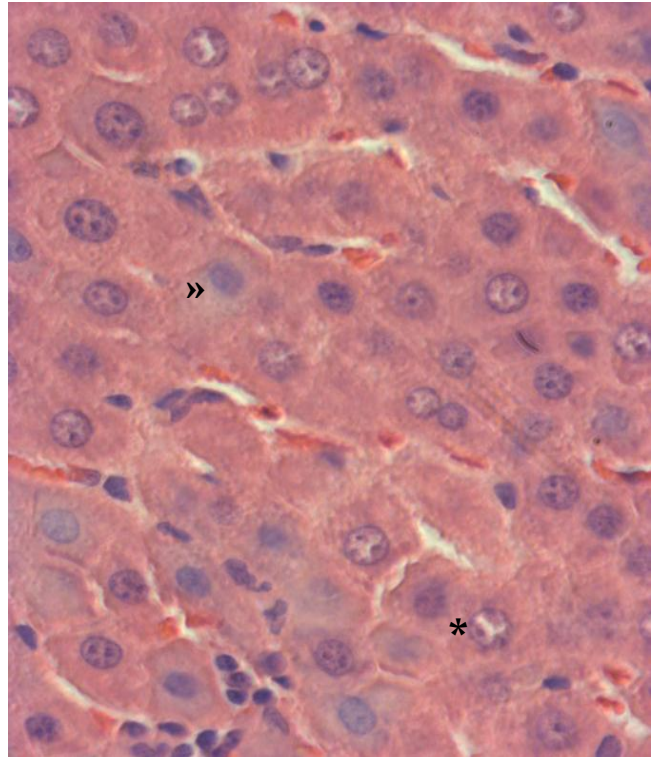


Foto 19: Riñón; LQM 919; 2000mg/kg

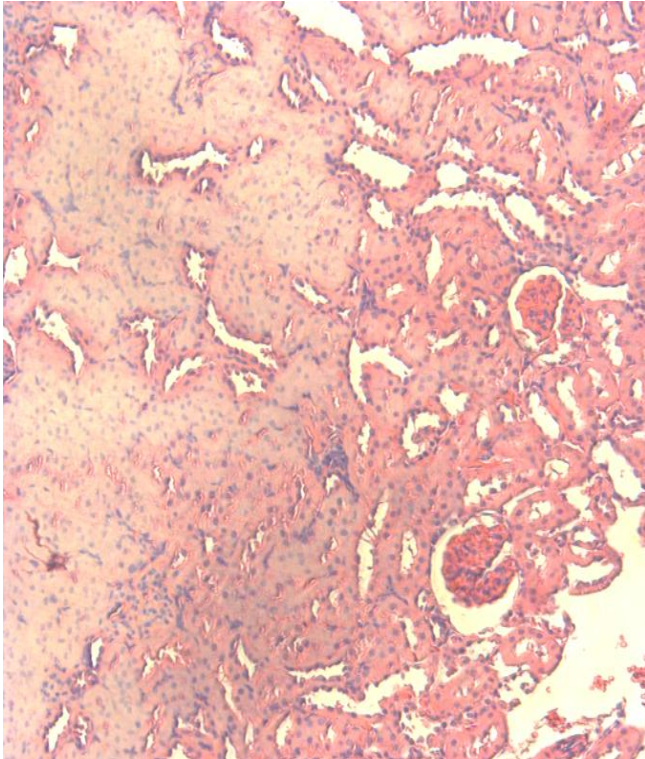
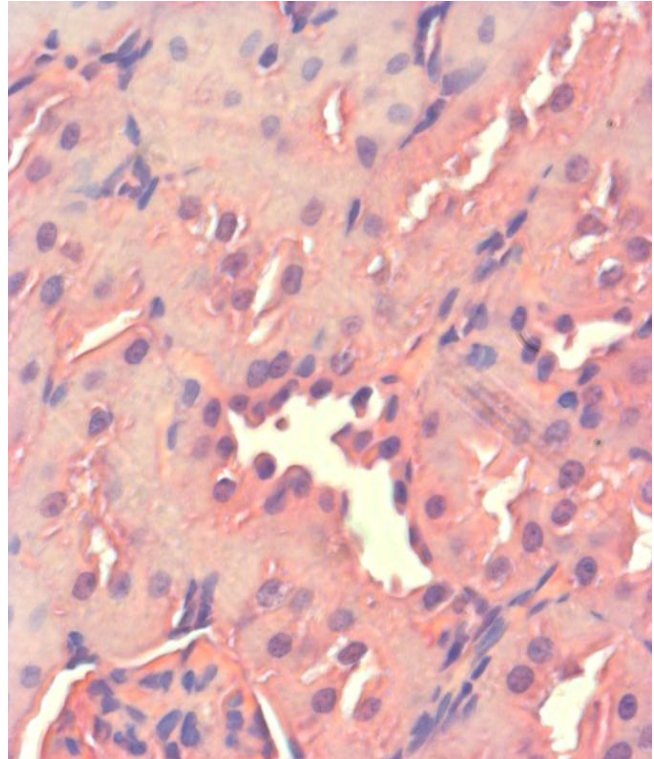


Foto 20: Riñón; LQM 919; 2000mg/kg



DISCUSIÓN

La infestación del ganado por garrapatas del género *R. microplus* es uno de los principales problemas a los que se enfrenta la ganadería. El control de esta parasitosis es el principal reto al que se enfrentan médicos veterinarios y ganaderos, utilizando como principal estrategia de control, el uso de acaricidas. Debido al uso indiscriminado de estos productos, se ha presentado un aumento de garrapatas que resultan resistentes a los efectos que estos químicos les provocan, generando resistencia a la mayoría de los fármacos empleados en la actualidad.

El laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos junto con el laboratorio de Química Medicinal, ambos de FES-Cuautitlán, han desarrollado y sintetizado nuevos productos químicos (carbamatos) destinados al control de las garrapatas. Estos productos fueron evaluados *in vitro* en cepas susceptibles y resistentes de *R. microplus*, algunos de los cuales mostraron ser eficaces para el control de este parásito al disminuir de forma significativa la oviposición y eclosión del parásito.

En el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos se están realizando las pruebas de toxicología *in vivo* de los carbamatos *Etil (4-clorofenil) carbamato* y *Etil (4-bromofenil) carbamato*, los cuales mostraron tener un efecto positivo en el control de *R. microplus in vitro*. Como parte de las pruebas de toxicidad oral aguda, en el presente trabajo se analizaron los cambios histológicos de diversos órganos de rata (corazón, pulmón, hígado, estómago, riñón, músculo esquelético, cerebelo y cerebro), asociados a la administración de los carbamatos; *Etil (4-clorofenil) carbamato* y *Etil (4-bromofenil) carbamato*, en 4 dosis diferentes (5, 50, 300 y 2000 mg/kg), administrados de forma oral en 1 sola aplicación.

Los resultados obtenidos de los grupos experimentales se compararon con los obtenidos con los grupos testigo para determinar si el cambio histopatológico se debía a la interacción con los carbamatos. Los pulmones de todas las ratas tanto de los grupos experimentales como testigos presentaron neumonía intersticial, que varió de moderada a severa. Probablemente esta neumonía es el

resultado de una infección por virus y/o *Mycoplasma spp.* adquirida durante el transporte de las ratas al bioterio o en el mismo bioterio. Hay que tomar en cuenta que las ratas se encontraban en un lugar nuevo para ellas, lo que supone un estrés constante que pudo agravar las infecciones pulmonares. Pese a esto no se observaron lesiones adicionales o que las lesiones en los grupos tratados fueran mayores, por lo que podemos suponer que los carbamatos evaluados no tienen un efecto importante en los pulmones.

Los principales cambios histológicos observados en corazón, estómago, cerebro y cerebelo; fueron de tipo vascular: congestión y hemorragia. Debido a que estos cambios se encuentran presentes en todos los grupos (testigo y experimental), no se asociaron a la administración de los carbamatos. Los cambios vasculares encontrados en los órganos pertenecientes al Sistema Nervioso Central (cerebro y cerebelo), posiblemente se deben al método de eutanasia de las ratas (dislocación cervical). En esta técnica se hace presión sobre la región del cuello y se jala de la base de la cola hasta desnucarla. Esta presión aplicada en la zona del cuello, afecta el flujo sanguíneo, provocando congestión en los vasos sanguíneos ubicados en la cabeza; por este motivo la presencia de congestión meníngea en cerebro y cerebelo no se consideró patológico.

La hemorragia y congestión encontrada en el corazón puede ser atribuida a la punción cardíaca para la colección de sangre inmediatamente después de la dislocación del animal (cada rata fue puncionada por lo menos 2 veces antes de colectar la sangre), motivo por el cual estos cambios no se consideraron asociados a la administración de los productos. Por último, la presencia de congestión en estómago se le atribuye a un proceso de hiperemia activa que generalmente se observa durante la digestión; esto se corroboró al encontrar en la necropsia alimento en el estómago. Este cambio encontrado durante la revisión no se consideró patológico derivado de la administración del fármaco.

En riñón se observaron cambios histológicos parecidos, tanto en grupos experimentales como grupos testigo. En este órgano se observó principalmente

degeneración albuminosa, la cual se debe a un aumento de líquido intracelular generado por cuadros de hipoxia; cabe mencionar que este tipo de lesiones son muy frecuentes en cualquier animal muerto. En el caso de la congestión renal leve, como todos los grupos la presentaron, no se le atribuye al carbamato, esta puede deberse a una deshidratación leve que hace más evidentes a los eritrocitos.

El único cambio observado en riñón asociado a la administración de estos químicos se encontró en los integrantes número 2 y 3 del grupo tratado con *Etil (4-bromofenil) carbamato*, a una dosis de 2000 mg/kg. En estos se observó en los túbulos contorneados de la corteza renal; focos de necrosis coagulativa, con el citoplasma de color morado-grisáceo; cabe recordar que todos los miembros de este grupo murieron en menos de 24 hrs post tratamiento. Este cambio indica una posible toxicidad derivada de la eliminación de este producto por orina (previo metabolismo en hígado) o toxicidad derivada del metabolismo de este carbamato en el riñón. Cambios histológicos similares fueron encontrados en la corteza renal por Brkic *et al*, 2007, al evaluar la toxicidad subcrónica de Carbofuran (25, 100 y 400ppm) administrado en el agua de bebida en ratas. Posiblemente, la necrosis observada en la corteza renal esté relacionada a la estructura del producto Etil (4-bromofenil) carbamato. El grupo de Tada *et al*. encontró que el tiabendazole en dosis de 1000 mg/kg generó necrosis tubular en el 20% de las ratas evaluadas. Cabe recordar que los carbamatos aquí evaluados poseen una amplia relación estructural con la de los bencimidazoles.

En hígado se encontraron cambios histológicos similares a grupos testigo y grupos experimentales, las cuales fueron degeneración albuminosa, aumento en el número de conductos biliares (3 a 4) por espacio porta y degeneración vacuolar leve. Por otra parte se observaron cambios histológicos presentes solo en los grupos experimentales, por lo que se asociaron a los carbamatos administrados. Estos cambios observados en los grupos experimentales fueron hepatocitos con citoplasma ligeramente eosinófilo y núcleos altamente eucromáticos, hepatocitos

con núcleos basófilos homogéneos, y aumento de hepatocitos con doble núcleo (>6 por campo).

La degeneración albuminosa, al igual que en riñón se debe a un aumento de líquido intracelular generado por cuadros de hipoxia. La hiperplasia de conductos biliares se observó como característica común de todos los animales usados en el presente proyecto; este cambio puede deberse a la genética de la cepa propia de los animales procedentes del bioterio del CINVESTAV. Por último la degeneración vacuolar puede estar relacionada a factores nutricionales, hormonales o metabólicos como lo propone Greaves (1990).

La presencia de hepatocitos con núcleos altamente eucromáticos sugieren un aumento en la actividad metabólica del hepatocito a través de una mayor actividad de síntesis por parte del núcleo, motivo por el cual la cromatina se ve más fina dando un aspecto blanquecino en el corte histológico. La presencia de núcleos altamente eucromáticos también fue reportada por Munglang *et al.*, 2009, al evaluar el hígado de ratas tratadas con Carbaryl a dosis de 200 mg/kg, administrado de forma intraperitoneal, 5 veces a la semana por 30 días; este autor también reporta la presencia de cuerpos de Councilman, lesión que no fue observada en nuestros grupos experimentales. Abass *et al.*, 2009 y 2010, demostraron que el carbosulfan es biotransformado en el hígado de diversos mamíferos incluyendo el humano, aumentando la expresión de enzimas relacionadas al citocromo P450 de los microsomas hepáticos. Tos-Luty, 2001, encontró un aumento en la cantidad de retículo endoplásmico liso, al evaluar la toxicidad del Carbaryl en ratas administrado vía dérmica. Posiblemente este aumento de la actividad nuclear observada en nuestros grupos experimentales puede estar relacionado a la expresión de enzimas destinadas al metabolismo de los carbamatos utilizados como lo encontró el grupo de Abass.

La presencia de hepatocitos con núcleo basófilo liso homogéneo sugiere un daño irreversible del núcleo y del hepatocito, debido a que se ha perdido la estructura normalmente descrita para el núcleo del hepatocito. Estos hepatocitos con núcleos basófilo homogéneos indican una posible variación de la necrosis

coagulativa como es definida por Robbins (1967), McGavin et al (2007); ya que el citoplasma observado en estos hepatocitos se aprecia granular eosinófilo y el núcleo tiene un aspecto de picnosis pero se encuentra aumentado de tamaño; Sternberg (1997), denomina este núcleo basófilo homogéneo como el inicio de un daño irreversible (necrosis). La variación de la necrosis coagulativa encontrada en los grupos experimentales, posiblemente se deba a una inhibición de la actividad de la mitocondria por parte del carbamato, anulando la producción de ATP con lo que se genera muerte celular. Moreno *et al.* encontró que el Carbaryl en altas dosis tiene un efecto depresor en la cadena respiratoria a nivel mitocondrial afectando el funcionamiento celular y desencadenando la muerte.

El aumento de hepatocitos binucleados puede ser indicativo de una lesión a nivel nuclear generada por la presencia de este carbamato, o un aumento en la actividad mitótica en el hepatocito como mecanismo de adaptación (hiperplasia) para sustituir los hepatocitos necrosados. El grupo de Brkic *et al*, 2007, reportó un aumento de núcleos dobles en el hepatocito como parte de la regeneración celular del órgano, al evaluar la toxicidad subcrónica de Carbofuran (25, 100 y 400ppm) administrado en el agua de bebida en ratas.

Con base en los cambios histológicos reportados en los grupos tratados con 5, 50 y 300 mg de ambos carbamatos, se encuentra al producto *Etil (4-bromofenil) carbamato*, como el menos tóxico. Esto debido a que la presencia de hepatocitos con un metabolismo aumentado y la presencia de regeneración celular, se observó todos los animales del grupo tratado con 300 mg/kg y solo en uno de las ratas de los grupos tratados de las dosis menores (5 y 50 mg/kg); además de presentar focos necróticos en una proporción muy baja. El único grupo tratado con este carbamato que presentó focos necróticos más severos fue el de 2000 mg/kg (ratas que murieron a las 24 horas del tratamiento). Posiblemente los focos necróticos observados en este grupo se deban a una saturación de las enzimas encargadas del metabolismo de este producto, por lo que se presentó un exceso de carbamato el cual generó estas lesiones. Por otra parte el producto *Etil (4-clorofenil) carbamato* resultó ser el más tóxico, ya que desde la dosis más baja (5

mg/kg) se observó la presencia de focos necróticos, lesión que aumentó conforme a la dosis, encontrando en un integrante del grupo tratado con 300 mg/kg necrosis severa del hígado al observarse en su totalidad la presencia de núcleos basófilo homogéneos.

Debido a que en los grupos tratados con *Etil (4-clorofenil)* la presencia de focos necróticos fue común a todas las dosis y no se encontró la presencia de macrófagos tisulares (células de Kupfer) aumentados, presencia de tejido de reparación y aumento de figuras mitóticas, se puede sugerir que el metabolismo y excreción es más lento, lo cual genera una mayor permanencia en el tejido, provocando una mayor presencia de focos necróticos. Posiblemente si se hubiera extendido el periodo de vida de los animales se hubieran encontrado cambios histológicos relacionados con la reparación y cicatrización del órgano, como los reportados por Brkic *et al*, 2007, el cual encontró presencia de tejido conectivo cercano a la vena porta, al evaluar la toxicidad subcrónica de Carbofuran (25, 100 y 400ppm) administrado en el agua de bebida en ratas.

Los focos necróticos encontrados en el parénquima hepático no se relacionaron específicamente a un vaso sanguíneo (Vena Porta o Vena Central) como lo menciona Greaves, 1990, por lo que no se puede diferenciar si el daño generado por estos carbamatos se deben a la estructura inicial adquirida por absorción intestinal, encontrándose la lesión asociada al espacio Porta; si el daño es generado por algún metabolito liberado durante su metabolismo encontrándose la lesión asociada a la vena central; o si estos focos necróticos se deben a ambas situaciones. Lo que sí se pudo apreciar, es que el grupo tratado con Etil (4-clorofenil) carbamato presento un aumento de focos necróticos derivado del aumento de la dosis. Esto posiblemente indica que parte de la toxicidad de este carbamato se debe a la estructura inicial adquirida post absorción.

A pesar de encontrar lesiones necróticas en el parénquima hepático de los grupos experimentales principalmente en los grupos tratados con *Etil (4-clorofenil) carbamato*, faltan pruebas para determinar el grado de lesión del hepatocito como

son la medición de enzimas hepáticas (aspartato aminotransferasa, alanino aminotransferasa, gamma glutamil transpeptidasa) en sangre.

Los carbamatos evaluados, no se clasificaron como productos de alta toxicidad. Esto basándose en los lineamientos establecidos por la OECD #33, en la cual establecen la toxicidad aguda de nuevos productos, dividiéndola en 5 categorías, siendo la categoría uno la más tóxica y la cinco la menos tóxica. Ambos carbamatos se encuentran en la categoría 4, drogas de baja toxicidad en la evaluación oral aguda, ya que ambos productos presentaron una letalidad al 100% en la dosis mayor empleada en el experimental (2000 mg/kg).

Los resultados obtenidos en este trabajo al evaluar los cambios histológicos generados por la administración de los carbamatos *Etil (4-clorofenil) carbamato* y *Etil (4-bromofenil) carbamato*, solo muestran un panorama general sobre los cambios celulares existentes en los diferentes órganos expuestos a la toxicidad de estos productos. Los principales cambios asociados a estos carbamatos, principalmente el del producto *Etil (4-clorofenil) carbamato*, sugieren un daño hepático, así como un aumento de actividad por parte del hepatocito para metabolizarlo.

Los cambios histológicos presentados en este trabajo, asociados a la administración de estos carbamatos, forman parte de la evaluación de la toxicidad oral aguda (1 sola dosificación); faltando la evaluación de los cambios celulares y genéticos inducidos por la administración de estos productos. Para poder utilizar estas moléculas como posible alternativa en el control de *R. microplus* falta determinar la toxicidad derivadas de una aplicación subcrónica y crónica, así como terminar de evaluar las toxicidades agudas (oral y dérmica), para poder tener presente cuales son los efectos negativos que estos carbamatos pudieran generar. Después de terminar estas evaluaciones toxicológicas, se deben realizar las mismas sobre los bovinos, especie a la cual va dirigida el uso de estos productos.

Como se puede apreciar, falta mucho trabajo para determinar por completo la toxicidad de estos carbamatos, para poder emplearlos en un futuro como posibles alternativas para el control de infestaciones por garrapatas en el ganado.

CONCLUSIONES

- Los productos *Etil (4-bromofenil) carbamato* y *Etil (4-clorofenil) carbamato*, administrados de forma oral en aplicación única a dosis de 5, 50, 300 y 2000 mg/kg, no generaron cambios histopatológicos asociados en cerebro, cerebelo, estómago, músculo esquelético, y corazón de ratas cepa Wistar tratadas.
- El principal órgano afectado por la administración de ambos carbamatos fue el hígado, ya que en este se observaron la mayor cantidad de cambios histopatológicos.
- El producto *Etil (4-bromofenil) carbamato*, resultó ser el producto menos tóxico, esto debido a que los cambios histopatológicos se presentaron hasta el grupo tratado con 2000 mg/kg.
- El producto *Etil (4-clorofenil) carbamato* fue el producto más tóxico, debido a que desde la dosis más baja (5mg/kg), se observó la presencia de focos necróticos en el hígado; encontrando necrosis difusa severa en 1 miembro del grupo tratado con 300 mg/kg.
- La dosis de 2000 mg/kg en ambos carbamatos resultó ser letal para todas las ratas tratadas. En el grupo tratado con *Etil (4-clorofenil) carbamato*, se observó necrosis multifocal hepática en el 100% del grupo; en el grupo tratado con *Etil (4-bromofenil) carbamato* la necrosis hepática se observó de tipo multifocal en el 60% del grupo y necrosis zonal en riñón en el 40% del grupo respectivamente.

REFERENCIAS

1. **Abass K**, Reponen P, Mattila S, Pelkonen O. Metabolism of carbosulfan I. Species differences in the *in vitro* biotransformation by mammalian hepatic microsomes including human. *Chemico-Biological Interactions*. 2009;181:210-219.
2. **Abass K**, Reponen P, Mattila S, Pelkonen O. Metabolism of carbosulfan II. Human interindividual variability in its *in vitro* hepatic biotransformation and the identification of the cytochrome P450 isoforms involved. *Chemico-Biological Interactions*. 2010;185:163-173.
3. **Aguilar-Tipacamú G**, Miller RJ, Hernández-Ortiz R, Rodríguez-Vivas RI, Vázquez-Peláez C, García-Vázquez Z, Olvera-Valencia F, Rosario-Cruz R. Inheritance of pyrethroid resistance and a sodium channel gene mutation in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Parasitol. Res.* 2008;103:633-639.
4. **Alonso-Diaz MA**, Rodríguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H, Rosario-Cruz R. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Arch Med Vet.* 2006;38(2).
5. **Anderson JF**, Magnarelli LA. Biology of ticks. *Infect Dis Clin N Am.* 2008;22:195-215
6. **Ángeles E**, Jiménez E, Flores A, Moreno E, Arroyo V, Martínez P, Martínez R, López R. Ethyl and methyl-phenylcarbammates as antihelmintic agents; theoretical study for predicting their biological activity by PM3. *Journal Mol Struct (Techoem)*. 2000;504:141–170.
7. **Botana L**. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. España: McGraw Hill, 2002.
8. **Brkic DV**, Vitorovic SL, Gasic SM, Neskovic NK. Carbofuran in wáter: Subchronic toxicity to rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2008;25;334-341.
9. **Cambridge University Press**. Tick control: an industry point of view. 2004:S427-S442.
10. **Castro JJ**. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet Parasitol.* 1997;71:77-97.

11. **Center for Drug Evaluation and Research (CDER)**. Guidance for industry: Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals. Agosto 1996.
12. **CONASA**. Plan estratégico de la campaña nacional contra la garrapata *Boophilus microplus* en México 2008-2012.
13. **De Castro JJ**, Newson RM. Host resistance in cattle tick control. *Parasitology Today*. 1993;9:13-17
14. **De la Fuente J**, Almazán C, Canales M, de la Lastra JM, Kocan KM, Willadsen P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews*. 2007;8(1):23-28.
15. **Domínguez-García DI**, Rosario-Cruz R, Almazán-García C, Saltijeral JA, De la Fuente J. Revisión *Boophilus microplus*: Aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2010;12:181–192.
16. **Gartner L**, Hiatt J. Texto atlas de histología. USA: McGraw Hill, 2001.
17. **George JE**, Pound JM, Davey RB. Chemical control of ticks on cattle and resistance of these parasites to acaricides. *Parasitol*. 2004;129:S353-S366.
18. **Graff JF**, Gogolewski R, Leach-Bing N, Sabatini GA, Molento MB, Bordin EL, Arantes GJ. Tick control: an industry point of view. *Parasitol*. 2004;129:S427-S442.
19. **Greaves P**, *Histopathology of preclinical toxicity studies; interpretation and relevance in drug safety evaluation*. England: Elsevier, 1990.
20. **Gupta RC**. *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. USA: Elsevier, 2006.
21. **Iturbe S**. Eficacia de nuevos compuestos derivados del ácido bórico sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Tesis de Licenciatura por presentar). Cuautitlán Izcalli (México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2012.
22. **Jonsson NN**, Matschoss AL, Pepper P, Green PE, Ansell J. Resistance of holstein-Friesian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Vet Parasitol*. 2000;89:297-305.

23. **Kaaya GP**, Hassan S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Exp Appl Acarol*. 2000;24:913-926.
24. **Karczmar A**. Invited review Anticholinesterases: dramatic aspects of their use and misuse. *Neurochem Int*. 1998;32:401-411.
25. **Li AY**, Pruett JH, Davey RB, George JE. Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman strain of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2005;81:145-153.
26. **McGavin D**, Zachary J. Pathologic basis of veterinary disease. USA: Mosby-Elsevier, 2007.
27. **Moreno A**, Serafim T, Oliveira P, Madeira V. Inhibition of mitochondrial bioenergetics by Carbaryl is only evident for higher concentrations – Relevance for carbaryl toxicity mechanisms. *Chemosphere*. 2007;66:404-411.
28. **Moreno AJ**, Serafim TL, Oliveira PJ, Madeira VM. Inhibition of mitochondrial bioenergetics by Carbaryl is only evident for higher concentrations – Relevance for Carbaryl toxicity mechanisms. *Chemosphere*. 2007;66:404-411.
29. **Munglang M**, Nagar M, Prakash R. Liver in carbaryl treated rats-a morphological and morphometric study. *Journal Anat. Soc. India* 2009;1:6-9.
30. **Murrell A**, Campbell NJ, Barker SC. Value of idiosyncratic markers and changes to conserved tRNA sequences from the mitochondrial genome of hard ticks (Acari:Ixodida:Ixodidae) for phylogenetic interference. *Syst Biol*. 2003;52(3):296-310.
31. **OECD/OCDE**. OECD Guideline for testing of chemicals: Acute oral toxicity – Fixed dose procedure. Diciembre, 17, 2001.
32. **Ozden S**, Catalgol B, Gezginci-Oktayoglu S, Arda-Pirincci P, Bolkent S, Alpertunga B. Methiocarb-induced oxidative damage following subacute exposure and the protective effects of vitamin E and taurine in rats. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:1676-1684.

33. **Pérez IE**, Evaluación *in vitro* del efecto de nuevos carbamatos sobre cepas de garrapatas del género *Boophilus sp.*, resistentes a ixodicidas (Tesis de Maestría). Cuautitlán Izcalli (México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2010.
34. **Pérez-Cogollo LC**, Rodríguez-Vivas RI, Ramírez-Cruz GT, Miller RJ. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Vet Parasitol.* 2010;168:165-169.
35. **Pope C**, Karanth S, Liu J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2005;19:433-446.
36. **Prado MG**. Evaluación *in vitro* de la eficacia de nuevos carbamatos sobre garrapatas *Boophilus microplus* (Tesis de Maestría). Cuautitlán Izcalli (México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2009.
37. **Quiroz H**. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México: Limusa, 1984.
38. **Rodríguez-Vivas RI**, Rodríguez-Arevalo F, Alonso-Díaz MA, Fragoso-Sánchez H, Santamarina VM, Rosario-Cruz R. Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico. *Prev Vet Med.* 2006;75:280-286.
39. **Robbins S**. Pathology. USA: W B Saunders, 1967.
40. **SAGARPA**. "Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus spp.*". Mayo, 19, 1995.
41. **Socrates L**, Guimaraes CA. Poisoning due to ilegal use of carbamates as a rodenticide in Rio de Janeiro. *Clin Toxicol.* 1995;33(6):687-690.
42. **Stenberg S**. Histology for pathologist. Alemania: Lippincott, 1997.
43. **Tada Y**, Fujitani T, Yoneyama M. Acute renal toxicity of thiabendazole (TBZ) in ICR mice. *Fd Chem Toxic.* 1992;12(30):1021–1030.
44. **Tos-Luty S**, Przebirowska D, Latuszynska J, Tokarska-Rodak M. Histological and ultraestructural studies of rats exposed to Carbaryl. *Ann Agric Environ Med.* 2001;8:137–144.

45. **Uilenberg G.** International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet Parasitol.* 1995;57:19-41.
46. **Wikel, SK.** Host immunity to ticks. *Annu Rev Entomol.* 1996;41:1-22.
47. **Young AS,** Grocock CM, Kariuki DP. Integrated control ticks and tick-borne diseases of cattle in Africa. *Parasitol.* 1988;96:403-432.