



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“Evaluación de la mutagenicidad y teratogenicidad de dos etil-carbamatos  
propuestos para el control de *Rhipicephalus microplus*”**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA  
MARIBEL STRASSBURGER MADRIGAL**

**TUTOR: DR. MARCO ANTONIO MUÑOZ GUZMÁN (FES- CUAUTITLÁN)**

**COMITÉ TUTORAL:  
DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA (FES-CUAUTITLÁN)  
DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ (IIBO)**

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, Enero 2017



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.

Dedico este trabajo a mis padres por todas sus enseñanzas, apoyo y amor. A mi esposo Rodolfo, mis niños Isabella y Christopher por su paciencia, amor y apoyo incondicional en todo momento.

Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido. Es hora de comprender más, y temer menos..... Marie Curie

# Agradecimientos

---

Agradezco al **Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán** y al **Dr. Fernando Alba Hurtado** por su apoyo, por darme la oportunidad y confianza de trabajar en su laboratorio y por creer en mí.

A la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM** por darme la oportunidad de seguirme superando.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por la beca que me otorgaron para la realización de mis estudios.

Al **Dr. Enrique Ángeles Anguiano**, por proporcionarme los carbamatos utilizados para este trabajo.

A los miembros del Comité Tutorial: **Dra. Patricia Ramírez Noguera** y **Dra. Ana María Salazar Martínez** por sus valiosas aportaciones y consejos.

A todo el equipo de biomédicas: **Dr. Rafael Camacho Carranza**, **Dr. Jesús Espinosa Aguirre**, **Biol. Sandra Luz Hernández Ojeda** y **MC. Tzipe Govezensky** por todo su apoyo y darme la confianza de abrirme las puertas en su laboratorio.

A la **Dra. Yolanda Vera Montenegro** por sus aportaciones a este trabajo.

A **MC. Crisóforo Mercado Márquez** por su amistad, apoyo técnico y además la confianza de prestarme las instalaciones del Bioterio de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Al **Dr. José Alfredo Medrano Hernández** y a la **MC. Alicia Alcántar Rodríguez** por todo el aprendizaje y apoyo que me brindaron para la realización de mi proyecto, además de ofrecerme la confianza al abrirme las puertas de su laboratorio.

A la **Dra. Guadalupe Prado Ochoa** por su amistad, apoyo incondicional, consejos morales, académicos y técnicos para la realización de este proyecto.

A **Verito, Mayra, Aidee, Mario y Alejandro** por todo su apoyo con las ratitas y el proyecto, gracias por apoyarme tanto.

A mis compañeros del laboratorio: **Tabata, Omar, Aidee, Mario, Verónica, Alejandro, Adolfo y Ricardo** por la amistad, risas y la colaboración de este trabajo.

A la familia **Peters Drummer** por el cuidado de mis chaparros.

A mi hermano **Alejandro** por ser como un segundo padre y apoyarme cuando lo necesito.

A mis amigos **Norma, Guicela, Enid, Verónica, Mithzel, Gabriela, Daniel, Gerardo, Jesús y Antonio** por siempre estar ahí.

Esta investigación fue financiada por el **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la **UNAM** con clave de proyecto **PAPIIT-IN221515**.

# Índice

---

<b>Contenido</b>	<b>Pag.</b>
<b>Dedicatoria</b> .....	<b>I</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>II</b>
<b>Índice</b> .....	<b>IV</b>
<b>Índice de cuadros y figuras</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>XII</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>3</b>
Generalidades de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	<b>4</b>
Control .....	<b>4</b>
Resistencia .....	<b>5</b>
Carbamatos .....	<b>8</b>
Toxicidad carbamato .....	<b>8</b>
Mutagénesis .....	<b>10</b>
Teratogenicidad.....	<b>13</b>
Carbamatos con actividad ixodida sintetizados en FES Cuautitlán ...	<b>16</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>19</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>20</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>21</b>

<b>Contenido</b>	<b>Pag.</b>
<b>Material y métodos</b> .....	<b>22</b>
Ubicación .....	<b>22</b>
Cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	<b>23</b>
Ensayo de Ames.....	<b>25</b>
Animales.....	<b>27</b>
Ensayo de toxicidad reproductiva y del desarrollo.....	<b>27</b>
Diseño experimental.....	<b>30</b>
Análisis estadístico.....	<b>33</b>
<b>Resultados</b> .....	<b>34</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>62</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>70</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>71</b>

# Índice de figuras y cuadros

---

<b>Figuras</b>	<b>Pag.</b>
Figura 1: Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	<b>3</b>
Figura 2: Estructura de los carbamatos LQM 919 y LQM 996.....	<b>23</b>
Figura 3: Evaluación de la toxicidad del carbamato LQM 919, en el fondo de caja de la cepa TA98 de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	<b>25</b>
Figura 4: Diseño experimental.....	<b>30</b>
Figura 5: Cuerpos lúteos (izquierda) y útero (derecha) de rata.....	<b>31</b>
Figura 6: Consumo de agua de ratas expuestas antes del apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 o LQM996) .....	<b>38</b>



## **Figuras**

**Pag.**

Figura 7: Consumo de agua de las parejas de ratas (hembra y macho) expuestas durante el apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 o LQM996) ..... **39**

Figura 8: Consumo de agua de las parejas de ratas (hembra y macho) expuestas durante el apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 o LQM996) ..... **40**

Figura 9: Consumo de agua de ratas machos expuestos en la etapa pos-apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 o LQM996) ..... **41**

Figura 10: Consumo de alimento de ratas expuestas en el pre-apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 y LQM996) ..... **43**

Figura 11: Consumo de alimento de ratas expuestas en el apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 y LQM996) ..... **44**

<b>Figuras</b>	<b>Pag.</b>
Figura 9: Consumo de agua de ratas machos expuestos en la etapa pos-apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 o LQM996) .....	<b>41</b>
Figura 10: Consumo de alimento de ratas expuestas en el pre-apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 y LQM996) .....	<b>43</b>
Figura 11: Consumo de alimento de ratas expuestas en el apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 y LQM996) .....	<b>44</b>
Figura 12: Consumo de alimento de ratas expuestas en la gestación y lactancia a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 y LQM996) .....	<b>45</b>
Figura 13: Consumo de alimento de ratas expuestas en el pos-apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 y LQM996) .....	<b>46</b>
Figura 14: Crías con raquisquisis de ratas expuestas a 12.5 mg/kg con el carbamato LQM 996.....	<b>56</b>
Figura 15: Alteraciones reproductivas en hembras expuestas a la dosis de 12.5 y 25 mg/kg con el carbamato LQM 919.....	<b>57</b>

## **Figuras**

**Pag.**

Figura 16: Relación de tamaño en crías tratadas con el carbamato LQM 919.....

**58**

Figura 17: Morfoanomalía espermática secundaria (gota citoplasmática distal) en machos tratados a 12.5 mg/kg con el carbamato LQM 919.....

**61**

## Cuadros

	<b>Pag.</b>
Cuadro 1: Reportes de resistencia a ixodicidas a nivel mundial.....	<b>6</b>
Cuadro 2: Cepas de garrapatas resistentes en México.....	<b>7</b>
Cuadro 3: Principales ensayos para la determinación de genotoxicidad.....	<b>10</b>
Cuadro 4: Alteraciones genéticas.....	<b>11</b>
Cuadro 5: Reportes de teratogenicidad con etil-carbamatos.....	<b>15</b>
Cuadro 6: Reversión espontánea en cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	<b>24</b>
Cuadro 7. Diseño experimental para las pruebas de teratogenicidad .....	<b>28</b>
Cuadro 8: Evaluación de la mutagenicidad del carbamato LQM 919 en cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 and TA102 con y sin activación metabólica.....	<b>35</b>
Cuadro 9: Evaluación de la mutagenicidad del carbamato LQM 996 en cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 and TA102 con y sin activación metabólica.....	<b>36</b>
Cuadro 10: Resultados obtenidos del efecto de la exposición al carbamato LQM 919 sobre las variables categóricas reproductivas evaluadas en las ratas hembras.....	<b>48</b>

Cuadro 11: Resultados obtenidos del efecto de la exposición al carbamato LQM 919 sobre las variables categóricas reproductivas evaluadas en las ratas hembras.....	<b>49</b>
Cuadro 12: Resultados obtenidos del efecto de la exposición al carbamato LQM 919 sobre las variables promediabiles (no categóricas) reproductivas evaluadas en las ratas hembras.....	<b>51</b>
Cuadro 13: Resultados obtenidos del efecto de la exposición al carbamato LQM 996 sobre las variables promediabiles (no categóricas) reproductivas evaluadas en las ratas hembras.....	<b>52</b>
Cuadro 14: Resultados obtenidos del efecto de la exposición al carbamato LQM 919 sobre la generación de crías anormales y sobre la pérdida de descendencia en las ratas hembras.....	<b>54</b>
Cuadro 15: Resultados obtenidos del efecto de la exposición al carbamato LQM 996 sobre la generación de crías anormales y sobre la pérdida de descendencia en las ratas hembras.....	<b>55</b>
Cuadro 16: Resultados obtenidos del efecto de la exposición al carbamato LQM 919 sobre los parámetros reproductivos en machos.....	<b>60</b>
Cuadro 17: Resultados obtenidos del efecto de la exposición al carbamato LQM 996 sobre los parámetros reproductivos en machos.....	<b>61</b>

# Abreviaturas

---

DNA: Ácido desoxirribonucleico

Ach E: Acetilcolinesterasa

Buch E: Butirilcolinesterasa

Carb E: Carbamilcolinesterasa

DMSO: Dimetil sulfóxido

DE: Desviación estándar

GHS: *Globally Harmonized System*

His: Histidina

LQM: Laboratorio de Química Medicinal

NOM: Norma Oficial Mexicana

OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development*

UIM: Unidad de Investigación Multidisciplinaria

S9: Homogeneizado de hígado de rata

## Resumen

---

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es la garrapata más importante de los bovinos, el uso excesivo de ixodicidas para su control ha provocado la aparición de resistencia, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas moléculas. En la FES-Cuautitlán, UNAM se diseñaron y sintetizaron dos nuevos carbamatos (LQM 919 y LQM 996) con eficacia sobre *R. microplus*, afectando su reproducción, sin embargo, sus efectos biológicos en los mamíferos todavía son desconocidos. El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos mutagénicos y la toxicidad reproductiva y del desarrollo (teratogenicidad) de los dos nuevos carbamatos. La mutagenicidad de cada carbamato fue evaluada en diferentes cepas de *Salmonella typhimurium*, expuestas a diferentes concentraciones de los carbamatos siguiendo el protocolo Bacterial Reverse Mutation Test de la OECD con y sin activación metabólica. La teratogenicidad se evaluó de acuerdo al protocolo Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test de la OECD en parejas de ratas Wistar tratadas con 12.5 mg/kg, 25 mg/kg y 50 mg/kg de cada carbamato. No se observó aumento significativo del número de colonias revertantes de ninguna de las cepas de *Salmonella typhimurium* expuestas a los carbamatos evaluados ( $p > 0.05$ ). Los resultados de teratogenicidad mostraron que ambos carbamatos indujeron raquisquisis en el 6.3% y 1.2% de las crías provenientes de las ratas expuestas a 12.5 mg/kg, sin embargo esto no fue observado en las dosis más altas. La exposición a 25 mg/kg del carbamato LQM M919 disminuyó al 50% el número de hembras gestantes con respecto a las hembras testigo ( $p < 0.07$ ). En las ratas expuestas a dosis de 12.5 mg/kg de ambos carbamatos, se observó una mayor ( $p < 0.05$ ) pérdida de crías durante la etapa fetal con respecto a las hembras testigo. En relación a los machos, el carbamato LQM 919 indujo menores ( $p < 0.05$ ) porcentajes de motilidad espermática en las ratas expuestas que en las no expuestas en todas las dosis probadas. En conclusión, los carbamatos evaluados no fueron mutagénicos, indujeron teratogenicidad en las crías a dosis bajas y disminución de algunos parámetros reproductivos de las ratas expuestas.

## Abstract

---

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is the most important cattle tick in México and others tropical and subtropical countries in the world, the excessive use of ixodicides has induced resistance and failures in the control of the ticks, so, development of new molecules is necessary two new carbamates were designed and synthesized (LQM 919 y LQM 996) at Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México. The new carbamates affect reproduction and viability of *R. microplus* *in vitro* and *in vivo*; however, has been observed indirect evidence of moderate genotoxicity in mammals models. The aim of this study was to evaluate mutagenic effects and the reproductive/developmental (teratogenicity) toxicity of the new carbamates. Mutagenicity of each carbamate was tested according to OECD Bacterial Reverse Mutation Test in different *Salmonella typhimurium* strains, exposed to five different carbamates concentrations with and without S9 metabolic activation. Using the guidelines of Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test from OECD, teratogenicity was assessed in Wistar rats couples treated with 12.5 mg/kg, 25 mg/kg and 50 mg/kg of each carbamate. The results showed no significant increase in the number of revertant colonies in any of the *Salmonella typhimurium* strains exposed to the carbamates tested ( $p > 0.05$ ). Teratogenicity results showed that both carbamates induced rachischisis in 6.3% and 1.2% of the offspring from rats treated with 12.5 mg/kg, however, this effect was not seen in higher doses. Exposure to 25 mg/kg of LQM 919 reduced 50% the number of pregnant rats compared with the control group ( $p < 0.07$ ). In female rats exposed to 12.5 mg/kg of both carbamates, a higher loss of litters during fetal period was observed ( $p < 0.05$ ) in comparison with the rats of control group. In the male rats, the LQM 919 carbamate induced lower percentages ( $p < 0.05$ ) of sperm motility in all the doses tested. These results indicate that the carbamates assessed were not mutagenic, induced teratogenicity to offspring with lower doses and reduction of some reproductive parameters in treated rats.



# Introducción

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos que parasitan diversas especies. Dentro del ámbito ganadero se encuentra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, considerada como la más importante en áreas tropicales y subtropicales a nivel mundial (Castellanos, 1998). *R. microplus* produce importantes pérdidas económicas debido a los daños que induce en el hospedero; como son anemia, disminución en los parámetros productivos y reproductivos (disminución láctea, pérdida de peso, baja calidad de pieles), además de los daños asociados a la transmisión de diversos patógenos (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*) durante su alimentación (Buczen y Bartozic, 2006).

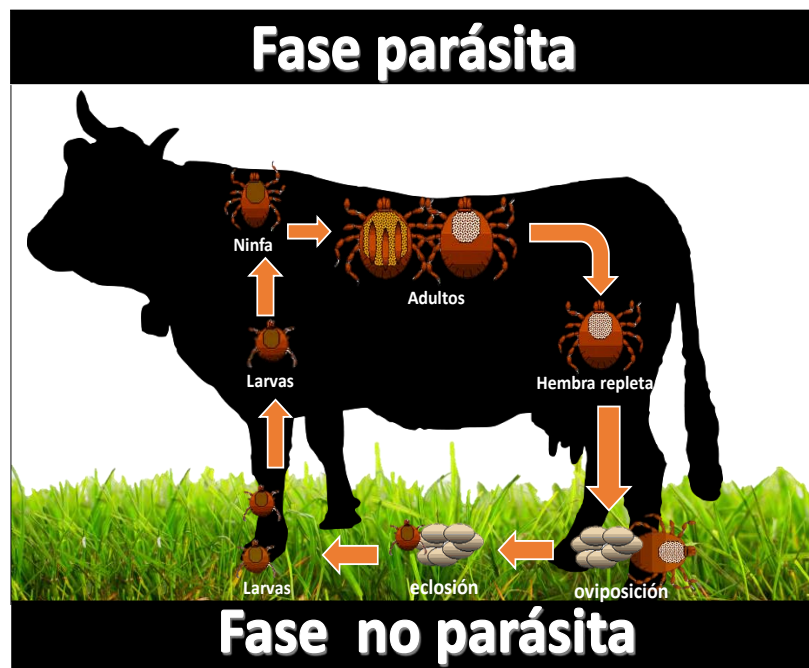


Figura 1.- Ciclo Biológico de *Rhipicephalus microplus*

El ciclo de vida de *R. microplus* es directo, parasitando un solo hospedero para completarlo; dentro de este se encuentran las fases de huevo, larva, ninfa y adulto (Figura 1). Este inicia con la oviposición de hembras repletas, una vez que las larvas han eclosionado, estas suben a la punta de los pastos para encontrar a su hospedero, posteriormente se adhieren al pelaje, insertan las piezas bucales y comienzan a alimentarse. Mientras se alimenta, la larva realiza la muda a ninfa y después a adulto. El macho busca a la hembra para la cópula y una vez que ésta se encuentra fecundada continúa alimentándose hasta repletarse. Finalmente, la hembra se desprende del hospedero para llevar a cabo la oviposición en el suelo cerrando el ciclo (Quiroz, 1984; Anderson y Magnarelli, 2008).

## **Control**

Actualmente se tienen dos tipos de manejo asociados al control de esta parasitosis: Químico y No Químico. El control no químico está basado en diversas estrategias en las cuales no se emplean ixodicidas como son las vacunas TickGard® y Gavac® (Castro, 1997; De la Fuente et al., 2007), selección de razas resistentes (Jonsson et al., 2000), hongos entomopatógenos (Kaaya y Hassan, 2000), rotación de praderas (Castro, 1997); sin embargo, estas estrategias no proporcionan un control en su totalidad, siendo necesario el empleo de ixodicidas para esto.

El control químico se basa en el uso de plaguicidas, dentro de los cuales tenemos diversas familias como son: organoclorados, organofosforados, piretroides, amidinas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazolonas, carbamatos. El empleo de estos ha sido la mejor estrategia a nivel mundial para el control de *R. microplus*, sin embargo, su uso excesivo ha ocasionado la aparición de resistencia. (Botana, 2002; George et al., 2004).

## **Resistencia a ixodicidas**

La resistencia es definida como “*la habilidad de una población de parásitos, para tolerar dosis de fármacos que serían letales para la mayoría de los individuos en una población normal (susceptible) de la misma especie*”. Este fenómeno forma parte del comportamiento evolutivo en las poblaciones, manteniendo de esta manera especies resistentes a un medio adverso (Soberanes-Céspedes et al., 2005).

## **Resistencia a ixodicidas en México y en el mundo**

Australia fue el primer país a nivel mundial en reportar la presencia de garrapatas resistentes, reportes provenientes de los años 30 indican que empezaban a encontrarse garrapatas del género *R. microplus* resistentes al arsénico; a partir de esa fecha diversos países incluyendo México, encontraron casos de resistencia a varias familias de ixodicidas. En el cuadro 1 se muestra el orden cronológico de resistencia a ixodicidas a nivel mundial (Gutiérrez, 2012), mientras que en el cuadro 2 se muestran los reportes de resistencia a nivel nacional.

Cuadro 1. Reportes de resistencia a ixodicidas (Tomado de Gutiérrez, 2012).

<b>Producto químico</b>	<b>Año de descubrimiento</b>	<b>País y año de reporte de resistencia</b>
<b>Arsénico</b>	1893	Aus.1936; Arg.1936; Bra.1948; Col.1948; Uru.1953.
<b>DDT</b>	1946	Arg.1953; Bra.1953; Aus.1953; Ven.1966; Sud.1979.
<b>Ciclodieno y Toxafeno</b>	1947	Aus.1953; Arg.1953; Bra.1953; Ven.1966; Col.1966; Sud.1979.
<b>Organofosforados y Carbamatos</b>	1955	Aus.1963; Arg.1964; Bra.1963; Col.1967; Ven.1967; Sud.1979; Uru.1983; Mex.1986.
<b>Formamidinas</b>	1975	Aus.1981; Bra.1995; Col.2000; Mex.2002.
<b>Piretroides</b>	1977	Aus.1978; Bra.1989; Mex.1994; Ven.1995; Col.1997; Arg.2000.
<b>Lactonas macrocíclicas</b>	1981	Bra.2001; Mex.2010.

**Aus.=Australia; Arg.=Argentina; Bra.=Brasil; Col.=Colombia; Uru.=Uruguay; Mex.=México; Ven.=Venezuela; Sud.=Sudáfrica.**

(Gutiérrez-Amézquita, 2012)

Cuadro 2. Cepas de Garrapatas Resistentes en México.

Cepa	Año	Ubicación	Resistencia	Referencia
Tuxpan	1981	Tuxpan, Veracruz	Organoclorados, organofosforados	Ortiz y col., (1995)
Tempoal	1984	Tempoal, Veracruz	Organoclorados, organofosforados	Aguirre y Santamaría, (1996)
San Jorge y La mora	1993	Golfo de México	Piretroides, organofosforados	Ortiz et al., (1995)
San Alfonso	2003	Golfo de México	Amidinas, organofosforados y piretroides sintéticos	Alonso- Díaz González et al., (2006)
LUADY	2008	Yucatan	Lactonas macrocíclicas	Pérez-Cogollo et al., (2010)

La resistencia se puede dar a través de dos mecanismos, uno de ellos está basado en una elevada actividad metabólica por enzimas del complejo P450, glutatión-transferasas y carboxiesterasas; como ejemplo de esta resistencia metabólica se encuentran los organofosforados (Aguilar-Tipacamú et al., 2008) y permetrininas (Foil et al., 2004). El otro se da por modificaciones en el sitio blanco encontrándose los organofosforados (Temeyer et al., 2007) y los piretroides (Rosario-Cruz et al., 2005). De acuerdo con reportes a nivel mundial, se han encontrado cepas de garrapatas con ambos tipos de resistencia (Miller et al., 2008; Baffi et al., 2008; Rosario-Cruz et al., 2009). Debido a este fenómeno, resulta de

suma importancia la síntesis de nuevas moléculas con actividad ixodicida, para que puedan ser empleadas en las cepas resistentes.

### **Carbamatos**

Los carbamatos son ésteres del ácido carbámico, los cuales presentan una región constituida por un metil-carbamato de fenol y un sustituyente básico (Botana, 2002); estas sustancias han sido empleados con distintos propósitos, algunos se han utilizado como cosméticos, otros como el uretano se han empleado como rellenos para muebles en forma cotidiana. En medicina, se usaron para el tratamiento del Alzheimer y como tratamientos anticancerígenos, en la agricultura y la ganadería algunos de ellos se han usado como pesticidas (Botana, 2002). La toxicidad de los carbamatos es muy variable, de tal forma que el uso de estas sustancias depende de su metabolismo, actividad biológica y de su grado de toxicidad.

Los carbamatos se pueden absorber por tracto respiratorio, mucosa ocular, piel y tracto gastrointestinal principalmente; dependiendo de la vía de entrada será el metabolismo, así como la perfusión a los diferentes tejidos (piel, tejido adiposo, riñón, bazo, hueso, músculo, cerebro e hígado). Cuando la vía de entrada es entérica, los carbamatos son hidrolizados por CarbE, y después conjugados con sulfatos y/o glucuronatos (Dependiendo del carbamato serán las enzimas empleadas para su metabolismo). El objetivo del metabolismo de los carbamatos se basa en la modificación de la polaridad y la hidrosolubilización para su excreción. Los subproductos presentan eliminación entérica (bilis) y renal (Botana, 2002; Gupta, 2011; Abass et al., 2009 y 2010).

## **Toxicidad de carbamatos**

Algunos carbamatos se consideran de alta toxicidad, esto puede ser debido a efectos adversos como la inhibición de la enzima AchE en mamíferos, daño oxidativo celular y alteraciones al citoesqueleto y alteraciones importantes al DNA o genotoxicidad (Karami-Mohajeri y Abdollahi, M, 2010). En algunos casos estas alteraciones pueden ser reversibles o contrarrestadas. La toxicidad por inhibición de la enzima AchE provoca acumulación de Ach, induciendo estimulación prolongada de receptores colinérgicos y muscarínicos; el daño dependerá de la zona afectada, provocando generalmente temblor muscular, salivación, diarrea, vomito (Hodgson, E., & Rose, R. L. 2005). El metabolismo de carbamatos induce daño hepático, renal, aunque también puede haber daño en eritrocitos, cerebro, diafragma y mitocondria (Moreno et al., 2007; Ozden et al., 2009).

La genotoxicidad es la capacidad de un agente físico, químico o biológico para causar daño al material genético; el daño puede ser de tipo mutágeno o carcinógeno. Existen diferentes métodos para evaluar la genotoxicidad de un compuesto químico (Cuadro 3). El potencial citotóxico, genotóxico y mutagénico ha sido estudiado en muchos carbamatos. Por ejemplo el Metolcarb induce interrupción del ciclo celular y alteraciones morfológicas asociadas en células de cebolla (Liman et al., 2010), Por otra parte, el carbosulfán incrementa la cantidad de eritrocitos policromáticos micronucleados, de anomalías espermáticas y de aberraciones cromosómicas en ratones expuestos (Giri et al., 2002)

Muchos compuestos genotóxicos tienen potencial teratogénico y varios de los mecanismos relacionados con ambos procesos, involucran la producción de micronúcleos. Los micronúcleos han sido utilizados en diversos estudios para tratar de relacionar el daño genotóxico con la teratogenicidad de algunos compuestos (Gómez-Meda y col., 2004).

Cuadro 3. Principales ensayos para la estimación de genotoxicidad (Tomado y modificado de Preston y Hoffman, 2008).

<b>Ensayos</b>
<b>Ensayos iniciales</b>
Estimación de mutaciones en genes (prueba de Ames)
Estimación de mutaciones en cromosomas (prueba de micronúcleos)
<b>Ensayos que ofrecen información extensa o específica</b>
Mutaciones de genes (reversión de mutaciones, mutaciones en cultivos celulares, dominantes letales en <i>Drosophila</i> )
Análisis citogenético en cultivos celulares de células de hámster o humanas (aberraciones cromosómicas, micronúcleos, aneuploidías)
Otros indicadores de daño genético (ensayos de daño y reparación de DNA y recombinación mitótica)
Pruebas en células germinales de mamíferos (locus-específico, mutaciones esqueléticas, análisis citogenético, translocaciones de tipo heredable y daño y reparación de DNA).

## **Mutagénesis**

Una mutación génica se considera como la modificación en la secuencia de las bases nitrogenadas que constituyen el material genético. Este cambio puede ocurrir en los genes o en los agrupamientos de genes, denominados cromosomas (Cuadro 4).

Algunos estudios demuestran una relación causal entre la mutagénesis y la transformación maligna de las células (Trosko, 1978; Kalter, 1971), además de ciertas alteraciones en el desarrollo (teratogénesis). Cabe mencionar que los efectos adversos de mutaciones dependen en gran medida del sitio alterado,



encontrándose de esta manera mutaciones que afectan la expresión génica de componentes esenciales para la célula, así como mutaciones que se localizan en zonas génicas no codificables (Intrones).

Las mutaciones pueden resultar de la acción directa de los agentes químicos sobre el material genético, o sobre otros componentes celulares ligados al DNA funcionalmente como los que participan en la división celular (centriolo y microtúbulos), las proteínas de la cromatina y las enzimas que contribuyen a la replicación del DNA.

Cuadro 4. Alteraciones genéticas (Tomado de Espinosa, 1980).

Nivel de mutación	Tipo de mutación	Descripción
	Intragénica	
<b>Alteraciones en la secuencia de bases</b>	Sustitución de bases	Cambio de una base por otra a) Transición purina – purina, pirimidina – pirimidina. b) Transversión purina - Pirimidina
	Desfasamiento	Corrimiento de la secuencia de bases por pérdida o adición
	Anomalías en el arreglo de los genes	
	Inversión	Cambio de orientación del gen, manteniendo su posición relativa respecto de otros genes
	Translocación	Cambio de posición de un gen con relación a otros genes
	Anomalías en el número de los genes	
	Eliminación	Pérdida de un gen, adquisición de una copia extra de un gen
	Duplicación	
<b>Aberraciones cromosómicas estructurales</b>	Rearreglos:	Cambio en el número, posición u orientación de grupos de genes
	Translocaciones	
	Inversiones, anillos	
<b>Modificación del número de cromosomas</b>	Aneuploidía	Segregación cromosómica defectuosa que resulta en pérdida o adquisición de uno o más cromosomas
	a) Monosomía b) Polisomía	
	Poliploidía	Aumento de juegos completos de cromosomas

Manual de métodos para la identificación de mutaciones y aberraciones

Las alteraciones intragénicas pueden producirse por sustitución de bases o por desfasamiento (“frameshift”). La primera resulta de una transición, reemplazo de una base por otra del mismo tipo, o de una transversión, en la que una base es sustituida por otra de tipo diferente. El desfasamiento consiste en el corrimiento de la secuencia nucleotídica por eliminación o adición de bases. Las anomalías que se refieren a grupos de genes pueden deberse a rearrreglos estructurales, tales como inversión, translocación y anomalías numéricas, como eliminación (“deletions”) o adquisición ya sea genes, pedazos de cromosomas, o cromosomas completos.

Debido a la complejidad que representa el uso de animales de laboratorio para la realización de estudios sobre mutagenicidad, se han empleado diferentes estrategias como son cultivos celulares, insectos y cepas bacterianas modificadas genéticamente. Se han usado diversas técnicas para evaluar la mutagenicidad; una de las más conocida es el ensayo de Ames.

### **Ensayo de Ames**

La prueba de Ames fue desarrollada por el grupo del Dr. Bruce N. Ames en la universidad de California (Ames, 1971), este ensayo se basa en el uso de diversas cepas mutantes aisladas a partir de cepas silvestres de *Salmonella typhimurium*. Las bacterias mutantes (auxótrofas, his -) requieren histidina para crecer, a diferencia de las silvestres (protótrofas, his +). La base de la prueba consiste en “revertir” el carácter auxótrofo de las bacterias y hacerlas protótrofas, mediante la inducción de mutaciones en el operón de histidina. Estas mutaciones confieren la capacidad de crecer en medios con cantidades limitadas de este aminoácido. A estas colonias bacterianas se les denomina revertantes.

Uno de los intereses de esta prueba se debe a la facilidad de realización, así como la pronta obtención de resultados que deriva en el conocimiento de cambios moleculares como consecuencia de mutaciones. Esto permite averiguar, si un

agente químico es mutagénico, así como el probable mecanismo de la mutación. Estas cepas se originaron a través de sustituciones de bases y otras por desfasamiento en el marco de lectura, lo que implica que su “reversión” requiere del mismo mecanismo mutagénico, es decir, sustitución de la base adecuada en el primer caso o eliminación de bases en el segundo, para “correr” la secuencia y restablecer el código genético.

La mutagenicidad de un compuesto puede manifestarse a concentraciones por debajo de su nivel tóxico letal. Para estos últimos, que inhiben el crecimiento bacteriano impidiendo evaluar su acción mutagénica, se han desarrollado estrategias para evitar falsos negativos. Cuando se utilizan concentraciones tóxicas aparecen pocas colonias que aún conservan el carácter auxótrofo, las cuales pueden ser confundidas con colonias revertantes. El crecimiento de fondo bacteriano que aparece normalmente en las cajas debido a las trazas de histidina presentes en el agar de superficie sirve de referencia para este propósito, por lo que si desaparece este crecimiento, indica toxicidad. Se recomienda incluir cuando menos una concentración del compuesto que muestre toxicidad. (Rossenkranz et al., 1976).

### **Teratogenicidad**

La teratogenicidad se define como la presencia de malformaciones estructurales, disfunciones metabólicas o fisiológicas, alteraciones en el comportamiento, o déficit en los productos, ya sea al nacimiento o en un periodo posnatal definido (Ecobichon, 1997); este término deriva de la raíz griega *teratos* que significa “monstruo asombroso”. Las malformaciones congénitas pueden ser causadas por diversos factores, tales como: fármacos y otros agentes químicos, hipertermia, infecciones, estados anormales del metabolismo materno e incluso factores físicos (Brent y Beckman, 1990).

Los mecanismos de la teratogénesis química, comprenden la interacción del embrión durante la fase de organogénesis con sustancias que pueden interactuar, de forma directa e indirecta, e interferir una variedad de eventos celulares que se llevan a cabo en tiempos precisos, como: proliferación, migración, asociación, diferenciación, y apoptosis (Schmid, 1985). La interferencia química de algunas sustancias con gametos y embriones durante el desarrollo fetal, causa infertilidad, pérdida del producto durante la concepción o defectos en el mismo (Vázquez-Sanchez J, 2009).

### **Estudios de teratogenicidad**

Un requerimiento básico para las llevar a cabo las pruebas de teratogénesis de una sustancia, es que deben efectuarse en diversas especies, tomando en cuenta que de menos una de ellas no debe ser roedora. Para realizar las pruebas de teratogenicidad se administran compuestos en hembras gestantes durante el periodo de la organogénesis, utilizando tres dosis diferentes (Wilson, 1977). La eutanasia de las hembras se realiza cuatro días después del parto, se contabiliza los nacimientos (vivos/muertos), se obtiene el peso de la camada y se examinan externa e internamente para identificar anomalías en tejido blando y esqueleto (OECD, 1995; Wilson, 1973). En algunos casos se permite el nacimiento y maduración para determinar latencia fisiológica o déficit en la conducta (Coyle et al., 1976; Schmid et al., 1996).

### **Teratogenicidad por carbamatos**

Algunos estudios experimentales en animales han puesto de manifiesto el potencial teratogénico de algunos carbamatos (García, 1998). En el cuadro 5 se presentan algunos de los efectos reportados para algunos carbamatos. Se ha reportado la alteración de las células germinales (espermatogonias y ovogonias), con la consecuente posibilidad de defectos en el desarrollo del embrión (Joffe,

1992). Por otro lado, se han observado alteraciones en el desarrollo del tubo neural en fetos de madres expuestas a carbamatos. (Rull et al. 2006).

Cuadro 5. Reportes de teratogenicidad con etil-carbamatos

<u>Especie</u>	<u>Carbamato</u>	<u>Vía de aplicación</u>	<u>Dosis</u>	<u>Efecto</u>	<u>Referencia</u>
<b>Ratas Wistar</b>	Uretano	Vía oral	1000 mg/kg	Disminución volume fetal, reabsorciones fetales, exencefalia, malformaciones esqueléticas-	Takaori et al., (1966)
<b>Hamsters</b>	Uretano	Intraperitoneal e intravenosa	400, 800 o 1.200 mg/kg	Exencefalia, espina bífida, anomalías Cardiacas	Ferm y Hannover (1966)
<b>Ratones</b>	Uretano	vía subcutánea	1,500 mg/kg	Abortos, degeneración del cerebro y la médula espinal	Sinclair (1950)
<b>Ratones</b>	Uretano	intraperitoneal	1,500 mg/kg	Malformaciones esqueléticas	Nishimura y Kuginuki (1958)
<b>Ratones</b>	Uretano	subcutánea	1000 mg/kg	muerdes embrionarias y malformaciones defectos esquelético y paladar hendido	Nomura (1974)
<b>Ratas Sprague dawley</b>	Benomyl	Vía oral por sonda	0, 125, 200, 250, 500, 1000 mg	Daño testicular (alteración en la concentración espermática y disminución en el pes testicular.	Carter et al., (1984)
<b>Xenopues laevis</b>	Carbaryl	Vía oral	at 5, 10, 50 y 100 µM	Daño axio-esquelético, tronco flexionado, colas dobladas.	Kang et al., (2010)
<b>Wistar</b>	Benomyl	Vía oral	1.0, 6.3,203 ppm	Disminución de peso en la madre y fetos, disminución en del número total de implantaciones y nacidos vivos.	Barnes (1983)
<b>Wistar</b>	Carbaryl	Vía oral	10,100,200 y 500mg/kg	Cambios histológicos en el tejido intersticial, parénquima y epitelio espermatogénico.	Rybakova (1966)

## **Carbamatos con actividad sobre *R. microplus* desarrollados en la FES-Cuautitlán**

El mecanismo de acción de algunos carbamatos utilizados en general para el control de artrópodos como el carbaril, el propoxur o el carbofurán es la unión con la fracción éster de las enzimas: acetilcolinesterasa (AChE), butirilesterasa (BChE) y carbamilesterasa (CarbE), bloqueando su actividad. El efecto de los carbamatos más importante para la actividad contra artrópodos es la inhibición de la AChE aunque estos tienen una mayor afinidad por CarbE. (Botana, 2002; Pope et al., 2005; Gupta, 2011).

Dada la resistencia de las garrapatas a los diversos ixodicidas empleados para su control, surge la necesidad de crear nuevos compuestos eficaces para este problema. Partiendo de esta necesidad, en la FES Cuautitlán, UNAM se sintetizó un grupo de carbamatos para este propósito (Angeles et al., 2000). Se ha estudiado el efecto de estos carbamatos sobre la viabilidad de diferentes organismos, encontrándose actividad importante sobre *Haemonchus contortus*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Rhipicephalus microplus*, (Bernabe-Pérez, 2007; Bernal, 2000; Reyes-González, 2007). En el laboratorio 1 de la UIM se evaluó la eficacia *in vitro* de más de 30 de los nuevos carbamatos de los cuales ocho tuvieron actividad sobre cepas susceptible (Media Joya) y resistentes (“San Alfonso” y “La Mora”) a ixodicidas convencionales. Los dos carbamatos con la mejor actividad fueron el LQM919 y el LQM996 los cuales disminuyeron en más de un 99% la oviposición y la eclosión de huevos después del tratamiento *in vitro* de garrapatas adultas (Prado-Ochoa et al., 2013), lo cual los proyecta como buenos candidatos para ser empleados como ixodicidas en el control de la garrapata.

Posteriormente se determinó el posible mecanismo de acción de los dos carbamatos seleccionados. Se determinó que ambos tienen poca afinidad por la AChE de *R. microplus*, y que además provocan alteraciones morfológicas en los

órganos reproductivos de las garrapatas adultas tratadas; disminuyendo la vitelogénesis, la viabilidad de las células del ovario y alterando la morfología y viabilidad de los huevos producidos (Prado-Ochoa et al., 2014).

Para poder considerar a los carbamatos LQM919 y LQM 996 como una alternativa en el control de *R. microplus* fue necesario evaluar la toxicidad oral y dérmica aguda, así como la toxicidad oral subcrónica en mamíferos, basándose en los lineamientos establecidos por la OECD (2002). Los resultados obtenidos en dichos estudios mostraron que los carbamatos son de baja toxicidad aguda en ratas cuando son administrados por vía oral o dérmica. Lo anterior siguiendo los criterios de la *Globally Harmonized System* (Prado-Ochoa, 2013; Prado-Ochoa et al., 2012). Los resultados de la toxicidad oral subcrónica en ratas mostraron que la exposición a dosis altas de ambos carbamatos induce la elevación de las transaminasas AST y GGT en plasma de ratas expuestas, lesiones histopatológicas leves en hígado y aumento moderado de las especies reactivas al ácido tiobarbiturico (daño oxidativo). En general se deduce que los carbamatos son ligeramente hepatotóxicos sin embargo, no produjo la muerte en ninguna de las ratas tratadas durante 90 días. De acuerdo a los resultados se estableció que el nivel sin efectos adversos observables (*no observed Adverse effects level*, NOAEL) de los carbamatos fue menor a 12.5 mg/kg (Prado-Ochoa, 2013). En forma paralela a los estudios de toxicidad se evaluó en parte la genotoxicidad y citotoxicidad de los carbamatos evaluados por medio de los ensayos de micronúcleos y cinética de proliferación celular. Los resultados mostraron que a dosis de 300 mg/kg en los ensayos de toxicidad aguda y en todas las dosis (12.5, 25 y 50 mg/kg) en los ensayos de toxicidad subcrónica aumentó significativamente el número de eritrocitos policromáticos micronucleados en las ratas expuestas a los carbamatos en relación a las ratas no expuestas. Sin embargo, en el ensayo de toxicidad subcrónica estos cambios fueron reversibles 21 días posteriores a la suspensión de la exposición. También se observaron alteraciones en la cinética de proliferación celular con

evidencia de arresto en metafase, indicando posibles efectos citostáticos (Prado-Ochoa et al., 2016).



# Justificación

---

Las garrapatas generan pérdidas importantes en la producción pecuaria, el principal tratamiento se basa en el uso de ixodicidas. El uso indiscriminado de estos productos ha generado la aparición de resistencia; debido a este fenómeno, es indispensable el desarrollo de moléculas eficientes para el tratamiento de esta parasitosis.

En la FES Cuautitlán se desarrollaron ocho nuevas moléculas de carbamatos que fueron probadas contra cepas susceptibles y resistentes de *R. microplus in vitro*, demostrando tener un efecto inhibitor de la reproducción (Prado Ochoa et al., 2013, Pérez González et al., 2014). De este grupo de carbamatos se seleccionaron los dos (LQM 919 y LQM 996) más eficaces para continuar con los estudios de toxicidad en mamíferos.

Se realizaron estudios de toxicidad aguda, subcrónica y estudios de cito toxicidad y genotoxicidad en ratas. Los resultados de toxicidad aguda y subcrónica obtenidos hasta el momento indican que los carbamatos seleccionados son de baja toxicidad (Prado-Ochoa et al., 2014a y 2014b), sin embargo, las alteraciones histológicas, observadas junto con algunos efectos reversibles genotóxicos y citostáticos observados (Prado-Ochoa et al., 2016), sugieren que estos carbamatos pueden inducir alteraciones celulares de tipo genético, mutaciones o malformaciones (teratogénesis). Por lo anterior, es importante evaluar el potencial mutagénico y teratogénico de los carbamatos LQM919 y LQM996 con el fin de establecer su utilización segura en futuros ensayos, que permitan continuar con el desarrollo de nuevos ixodicidas para el control de *R. microplus*.

# Hipótesis

---

Los carbamatos evaluados tienen una baja mutagenicidad y teratogenicidad, lo que permite utilizarlos como nuevas moléculas para el control de *R. microplus*.

# Objetivos

---

## Objetivo general

Conocer la capacidad mutagénica, la toxicidad reproductiva y la teratogenicidad de dos nuevos carbamatos (etil[4-bromofenil] carbamato y etil[4-clorofenil] carbamato) con actividad ixodocida.

## Objetivos particulares

- Estimar *in vitro* la mutagenicidad por el ensayo de Ames de los carbamatos a estudiar en diferentes modelos bacterianos.
- Estimar por pruebas *in vivo* en ratas la toxicidad reproductiva y del desarrollo (teratogenicidad) de los carbamatos estudiados.

# Material y métodos

---

## Lugar de realización

El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos ubicado en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Los animales experimentales se mantuvieron en el bioterio de la UIM. La evaluación de algunos parámetros reproductivos se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción y Etología Animal de la UIM. Los ensayos de Ames se realizaron en el Laboratorio de Mutágenos y Carcinógenos Ambientales del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

## Carbamatos

Los carbamatos fueron sintetizados por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM (Figura 2.). Se sintetizaron usando aril y alquilaminas 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 et al., 2000).

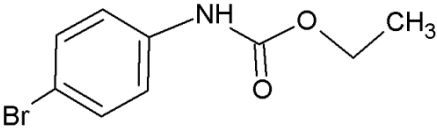
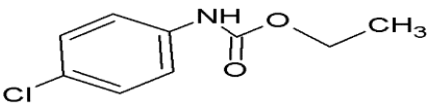
Estructura química	Peso molecular (g/mol)	Clave
 <p>etil[4-bromofenil] carbamato</p>	244	LQM 919
 <p>etil[4-clorofenil]carbamato</p>	199.63	LQM 996

Figura 2. Estructura de los carbamatos estudiados.

### Cepas utilizadas para prueba de Ames

Las cepas utilizadas fueron clonas directas de las descritas por Dr. Bruce N. Ames: Biochemistry Department, University of California, Berkeley, California, 94720, BC43, USA, las cuales se han mantenido en el Laboratorio de Mutágenos y Carcinógenos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Las cepas se encontraron en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y fueron reactivadas 48 horas antes de su utilización. Las cepas recomendadas por la OECD para la realización del ensayo fueron: TA98, TA100, TA1535, TA1537 Y TA102. (Cuadro 6)

Cuadro 6. Reversión espontánea en cepas de *Salmonella typhimurium*.

Cepa	Detección mutagénesis	Punto de mutación	Reversión espontánea reportada por Maron y Ames, (1983)		Reversión espontánea reportada por Mortemans, (2000)		Genotipo (Ames et al., 1975; Maron y Ames, 1983)
			- S9	+ S9	- S9	S9	
TA 1537	Frameshift	CG	-----	-----	5-20	5-20	<i>his C3076, rfa, uvrB, bio-</i>
TA 98	Frameshift	CG	30-50	-----	20-50	20-50	<i>his D3052, rfa, uvrB, bio-, pKM101(ApR)</i>
TA1535	Sustitución pares de bases	CG	-----	-----	5-20	5-20	<i>his G46, rfa, uvrB, bio-</i>
TA 100	Sustitución pares de bases	CG	120-200	-----	75-200	75-200	<i>his G46, rfa, uvrB, bio-, pKM101(ApR)</i>
TA 102	Sustitución pares de bases	AT	240-320	-----	100-300	100-300	<i>his G428, rfa, bio-, pKM101(ApR), Paq1(TtR)</i>

### Verificación de la presencia de marcadores genéticos y frecuencia de reversión espontánea de las cepas.

Se tomaron cinco colonias de cada cepa y se probaron en cada una los marcadores genéticos apropiados. Los marcadores probados fueron: requerimiento de histidina, sensibilidad al cristal violeta (marcador *rfa*), presencia del plásmido(s) con resistencia a ampicilina y/o tetraciclina, sensibilidad a la luz UV (marcador *uvrB*) y reversión espontánea. Se escogieron las colonias que mostraron la mejor respuesta a cada uno de los marcadores para la realización del ensayo de Ames.

## Ensayo de Ames

Se utilizaron cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 (*hisD3052*, *rfa*, *uvrB*, *bio*-, *pKM101*[ApR]), TA100 (*hisG46*, *rfa*, *uvrB*, *bio*-, *pKM101*[ApR]), TA1535 (*hisG46*, *rfa*, *uvrB*, *bio*-), TA1537 (*hisC3076*, *rfa*, *uvrB*, *bio*-) y TA102 (*hisG428*, *rfa*, *bio*-, *pKM101*[ApR], *pAQ1*[TtR]) mantenidas en el laboratorio de Mutágenos y Carcinógenos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Previo a los ensayos se aislaron colonias simples de cada cepa y sus características genotípicas fueron verificadas siguiendo el procedimiento descrito por Maron y Ames (1983). En todas las cepas se evaluó la toxicidad de las dosis mediante la observación microscópica del crecimiento de fondo bacteriano en las cajas seleccionadas (Figura 3), una distribución homogénea de bacterias fue considerada indicativa de no toxicidad, la pérdida de homogeneidad y la disminución de la dosis dependiente del número colonias revertantes fueron considerados indicadores de toxicidad.

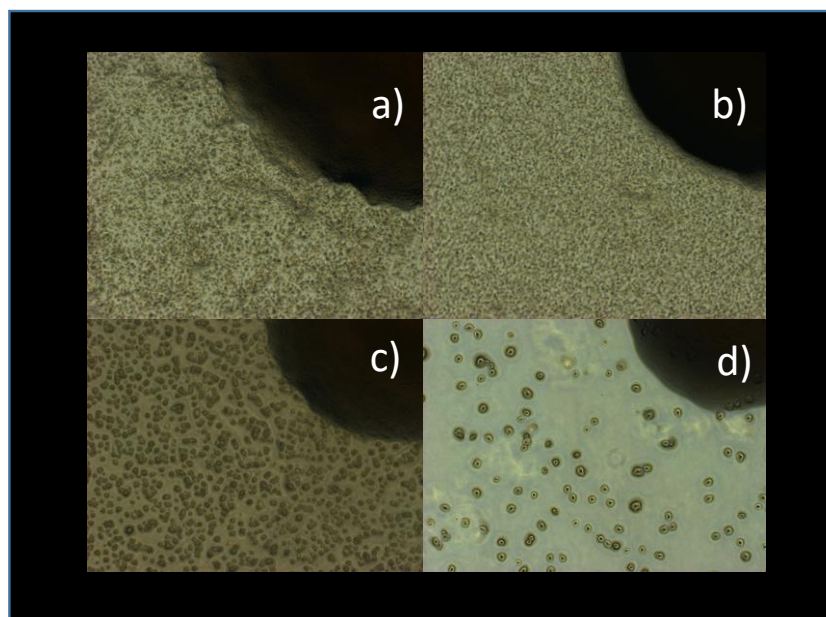


Figura 3. Evaluación de la toxicidad del carbamato LQM919 en fondo de caja de la cepa TA98. a) Control negativo; b) Control negativo con S9; c) LQM919 a dosis de 0.5 mg/mL; d) LQM919 a dosis de 1 mg/mL

El extracto S9 de hígados de ratas machos Sprague-Dawley inducidas con fenobarbital y B-naftoflavona fue preparado y almacenado (-80 °C) como fue descrito por Espinosa (1980).

Una colonia de cada cepa crecida en medio sólido NB se transfirió a 10 mL de caldo NB-Oxoid y se mantuvo en agitación (150 rpm) por 12 horas. Posteriormente, 0.1 mL de los cultivos de cada cepa (aproximadamente  $10^8$  células), se preincubaron por 30 minutos con una mezcla de 0.5 mL de la mezcla S9 o 0.5 mL de solución buffer fosfato a pH 7.4. y a diferentes concentraciones finales de los carbamatos evaluados (0.1, 0.2, 0.4, 0.5 y 1 mg/mL) prediluidos en DMSO. La concentración menor (0.1 mg/mL) fue seleccionada considerando ensayos previos en los que no se observó toxicidad y a partir de esta, se utilizaron concentraciones mayores.



La mezcla preincubada, fue homogeneizada en 2 mL de top agar (0.6% de agar, 0.5% de NaCl, 0.5 mM de biotin y 0.05 mM de L-histidina) y posteriormente esta solución fue distribuida en forma homogénea sobre la superficie de cajas con agar mínimo. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 48 horas. y el número de colonia revertantes en cada placa fue contado. Los carbamatos fueron considerados mutagénicos cuando se observó un incremento dosis dependiente del número de colonias revertantes o cuando el número de colonias revertantes inducidas fue el doble al número de colonias revertantes encontradas en las placas control (Claxton et al., 1987; OECD, 1997).

Se incluyeron controles positivos (mutágenos específicos) y controles negativos (vehículo; DMSO) en cada ensayo. Los controles específicos fueron 2-nitrofluoreno (10 µg/placa para la cepa TA98 sin S9); Azida de sodio (1 µg/placa para las cepas TA100 y TA1535 sin S9); Ácido picrolónico (100 µg/placa para la cepa TA1537 sin S9); 4-Nitroquinoline N-óxido (1 µg/placa para la cepa TA102 sin S9) y 2-amino antraceno (2 µg/placa para todas las cepas con S9). Todos los mutágenos fueron previamente diluidos en DMSO excepto, la azida de sodio que fue disuelta en agua. Como control negativo para todas las cepas se utilizó DMSO al 2% (Espinosa, 1983; Williams, 1983).

### **Animales experimentales para ensayos de toxicidad reproductiva y del desarrollo embrionario (teratogenicidad).**

Se utilizaron 140 ratas hembras y machos de la cepa Wistar Charles River, de 7-8 semanas de edad, clínicamente sanas, con un peso de 200 a 250 g. Los animales fueron alojados en grupos de 5 individuos, en cajas plásticas colectivas, en parejas (hembra y macho) o en jaulas individuales (hembras gestantes) según la etapa reproductiva. La temperatura ambiental fue mantenida a 22±2 °C, con una humedad relativa de 30-70 % y un fotoperiodo de 12 x 12 horas luz-oscuridad. Se mantuvieron con alimento comercial peletizado y agua *at libitum*.

## Diseño experimental de los ensayos de teratogenicidad.

EL estudio se realizó en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. El potencial teratogénico y tóxico para la función reproductiva de los carbamatos LQM 919 Y LQM 996 se evaluó de acuerdo al protocolo *Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test* recomendado por la OECD, (1995). Este estudio fue aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales.

Todas las ratas experimentales fueron aclimatadas a las condiciones del bioterio una semana antes del experimento. Las ratas fueron distribuidas en siete grupos (n=10 hembras; n=10 machos) Los tratamientos de cada grupo se muestran en el cuadro 7. La administración de los carbamatos durante todo el experimento fue dosificada en el agua de bebida previa dilución en DMSO haciendo ajustes semanales de acuerdo al peso de las ratas. Se expuso a todos los animales a las dosis de carbamatos correspondientes a cada grupo durante dos semanas, posteriormente se formaron parejas macho/hembra dentro de cada grupo y se dejaron por dos semanas con la finalidad de que se cubrieran dos ciclos estrales.

Cuadro 7. Diseño experimental para las pruebas de teratogenicidad.

GRUPO (n=10 M; n=10 H)	CARBAMATO	DOSIS (mg/Kg P.V.)
1	TESTIGO	Vehículo
2	LQM919	12.5
3	LQM919	25
4	LQM919	50
5	LQM996	12.5
6	LQM996	25
7	LQM996	50

En cada pareja, se tomó como día 0 de gestación cuando se observó en la rata hembra el tapón vaginal. Después de las dos semanas de apareamiento se separaron los machos y se depositaron en cajas colectivas en grupos de cinco y las hembras se dejaron en jaulas individuales durante las siguientes etapas de gestación, parto y lactancia. Dos semanas después de la separación de las parejas, los machos fueron sacrificados por desnucamiento según la NOM-033-1995, se obtuvieron los órganos reproductivos (próstata, vesículas seminales, testículos y epidídimo) y se registró el peso de cada órgano. Se realizó la evaluación espermática en cada macho tomando una muestra de semen directamente del epidídimo.

Después de la gestación, las hembras fueron mantenidas con sus camadas hasta el día seis pos-parto y se registraron sus parámetros reproductivos. Posteriormente fueron sacrificadas y se obtuvieron sus órganos reproductivos (ovarios, útero y glándula mamaria) y se registró el peso de cada órgano. Las crías de cada camada fueron sexadas, pesadas y revisadas en búsqueda de malformaciones (paladar hendido y/o labio leporino, ciclopi, exencefalia, espina bífida, anomalías cardíacas, colas cortas, colas dobladas, polidactilia, sindactilia y redrojos. A los seis días del nacimiento todas las crías fueron sacrificadas y se realizó la necropsia para buscar malformaciones internas.

Durante todo el experimento se observó diariamente a las ratas en búsqueda de signos clínicos y/o alteraciones asociados a toxicidad, se midió semanalmente la ganancia de peso, el consumo de alimento y el consumo de agua.

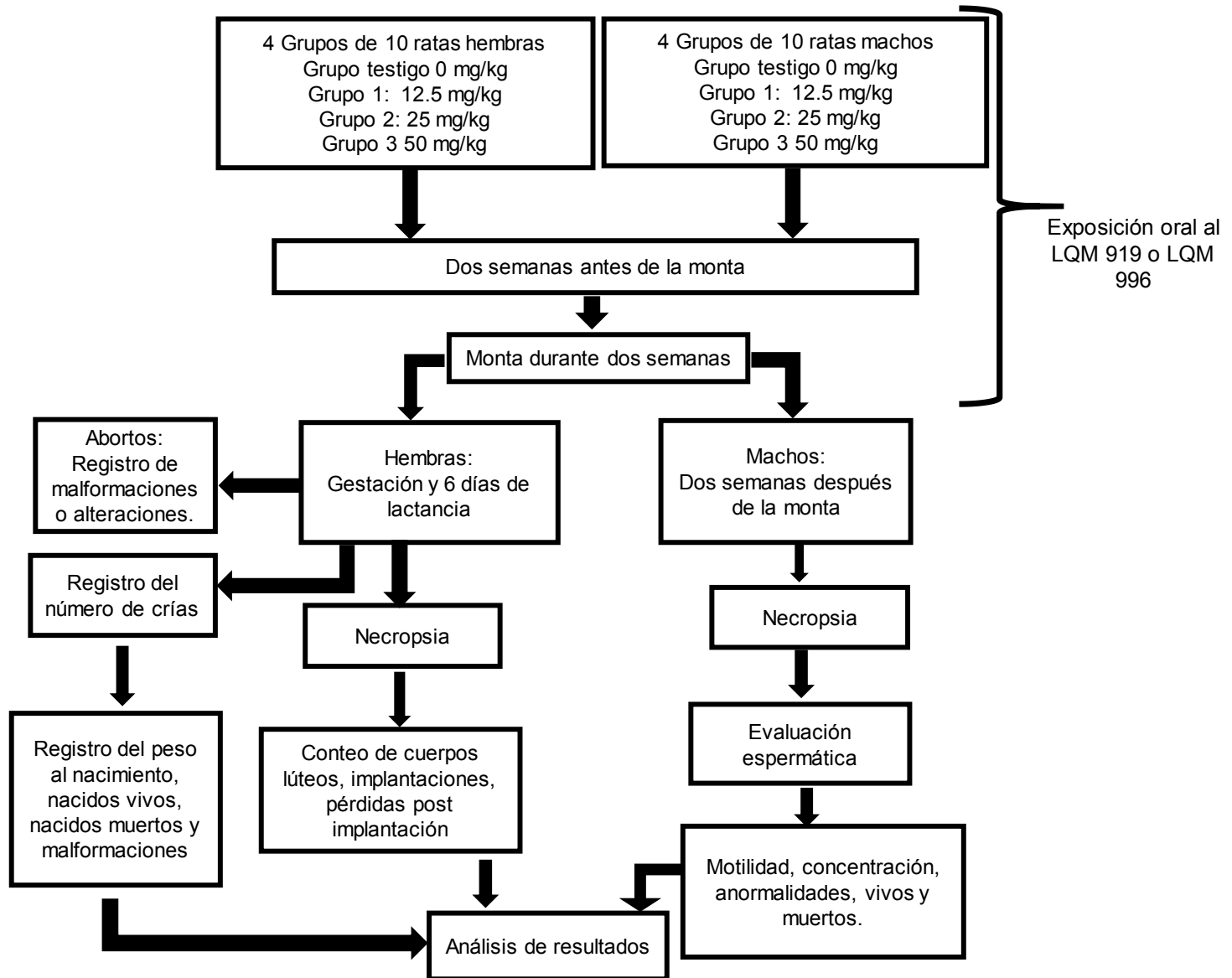


Figura 4.- Diseño experimental del ensayo de toxicidad reproductiva y del desarrollo

## **Evaluación espermática en ratas macho expuestas a los carbamatos**

Para la obtención de la muestra de semen se realizó un lavado del epidídimo con 2 ml de PBS (37°C) y esta se conservó en baño maría a (37°C). La motilidad progresiva, viabilidad, porcentaje de morfoanomalías y la concentración espermática fueron evaluados como describió Alcantar (2016) y Arencibia et al., (2010). El porcentaje de motilidad (% MOT) se evaluó en el semen fresco. Se tomó 1 gota de la muestra obtenida por lavado del epidídimo y se colocó en un portaobjetos atemperado a 37°C, posteriormente se colocó encima un cubreobjetos atemperado y se observó en un microscopio de campo claro con el objetivo de 10x para asignar un valor porcentual de motilidad entre 1-100%. Para la evaluación del porcentaje de viabilidad (% VI) y porcentaje de morfoanomalías (% MA) se colocó sobre un portaobjetos atemperado una gota de la muestra de semen y se homogenizó con una gota de colorante Eosina-Nigrosina se extendió la mezcla sobre el portaobjetos y se secó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se determinó el número de vivos (blancos) y muertos (rosas), y el número de espermatozoides con anomalías primarias y/o secundarias en 200 espermatozoides. La concentración espermática se midió a partir de una dilución de la muestra 1:200 en rosa de bengala espermática en una cámara de Neubauer.

## **Evaluación de parámetros reproductivos en ratas hembra expuestas a los carbamatos**

En cada grupo se registró el número de hembras gestantes y el número de los días de gestación. Las hembras no gestantes fueron sacrificadas después de una semana de la fecha establecida para el parto. En la camada de cada hembra gestante se registró el número de crías vivas, número de crías muertas, número de nacidas débiles, número de redrojos y número de crías nacidas con malformaciones aparentes, además se calcularon los promedios del peso al nacimiento y al día seis.

Diariamente se revisaron y contaron las crías para determinar el porcentaje de mortalidad (% MOR). Al sexto día del parto todas las madres y crías se sacrificaron. Se obtuvieron los ovarios y útero de todas las hembras para contar el número de cuerpos y el número de implantaciones en cada órgano respectivamente.

Las pérdidas preimplantación (PPI), prenatal (PPreN) y posnatal (PPosN) de crías se calcularon en cada hembra con las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned} \text{PPI} &= \text{No. De cuerpos lúteos} - \text{No. de implantaciones} \\ \text{PPreN} &= \text{No. De implantaciones} - \text{No. de nacidos vivos} \\ \text{PPosN} &= \text{No. Nacidos vivos} - \text{No. vivos al día seis} \end{aligned}$$



Figura 5. Cuerpos lúteos (izquierda) y útero (derecha) de rata observados en un microscopio estereoscópico.

## Estadística

Los resultados del ensayo de Ames se expresaron descriptivamente como la media  $\pm$  desviación estándar. Los datos promediables de los ensayos de teratogenicidad (en machos: % MOT, concentración espermática, % VI, % MA y peso de órganos reproductivos; en hembras y crías: No. cuerpos luteos, No. de implantaciones, No. de nacidos vivos, No. crías vivas al día seis, peso de la camada al nacimiento, peso de la camada al día seis, peso de las crías al nacimiento y peso de las crías al día seis) se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar y se analizaron por ANDEVA de una vía, estableciéndose las diferencias entre medias por prueba *a posteriori* de Tukey, utilizando el Software Graph Pad PRISM para Windows versión 5.01.

Los datos obtenidos en las ratas hembras y las crías: número de hembras que copularon, número de hembras gestantes, número de días de detección del tapón vaginal, número de días de gestación, número de hembras con nacidos vivos y número de hembras con crías vivas al día seis, número de hembras con anomalías en crías, pérdida de crías preimplantación, pérdida de crías prenatal y pérdida de crías posnatal, fueron categorizados según cada variable. Estos datos se analizaron por pruebas de  $X^2$  y prueba exacta de Fisher.

# Resultados

---

## **Ensayo de Ames**

En los cuadros 8 y 9 se presentan el número de colonias revertantes de las cepas expuestas a las diferentes concentraciones de los carbamatos LQM 919 y LQM 996 respectivamente, con y sin activación metabólica. En ambos carbamatos, el número de colonias revertantes espontaneas en todas las concentraciones utilizadas no aumentó en forma dependiente de la dosis ni fue mayor al doble del número de revertantes espontaneas de cada cepa encontradas en la dosis cero. En general, las dosis mayores de estos carbamatos produjeron toxicidad en el fondo de caja.



Cuadro 8. Evaluación de la mutagenicidad del carbamato LQM 919 en cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 and TA102 con y sin activación metabólica.

Concentración (mg/mL)	Número de colonias revertantes* (media Desviación estándar)																					
	TA98		TA100		TA1535		TA1537		TA102													
	-S9	+S9**	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9				
0	18.5	3.2	27.7	2.5	104.1	10.8	120	9	9.1	3.9	16.5	1.9	9.1	3	14.6	3	319.5	75.7	330	66		
0.1	16.3	4.9	31	6.2	112	20.7	133.3	10.5	10	1.7	13.6	1.5	10.6	2.5	14	5.2	225	26.5	347.6	41.5		
0.2	20.3	4.1	28.7	7.1	107.6	15.8	118.6	4.5	6	3.4	9.3	2.0	4.3	0.5	9.6	2	219.6	5.8	265	13		
0.4	16.3	2	30	7.5	125.6	19.4	89.6	19.8	11	2.6	11	4.3	6.33	3.2	9.3	2	118.3	21.9	250.3	15.8		
0.5	20.3	4.5	32.3	8.6	78	2	106.3	16.8	4	3.4	12	3	4	2.6	9.6	1.5	80.6	2.8	101.6	89.2		
1	10	5.2	25.6	5.1	35	22.9	28.3	19.4	5	1	6.6	1.5	2	2	6	4.5	3.3	5.7		0		
Controles positivos:																						
2-NF	2017.3	460.7																				
Azida de sodio			1666	99.5			731	77.2														
Ácido picrolónico															48.33	25.1						
4-NQO																	1573.3	61				
2-AA			1831.6	163.1			2277.6	146.6			765.6	45.7			441.3	99.1			2050	93.9		

\*Cada dato representa la media ( $\pm$ DS) del número de colonias revertantes de tres repeticiones.

\*\*S9 Fracción microsomal de hígados de ratas tratadas con fenobarbital y B-naftoflavona enriquecida con NADP y Glucosa-6-fosfato.

(2-NF: 2-nitrofluoreno, 2-AA: 2-aminoantraceno, 4-NQO: 4-nitroquinolide N-óxido).

Cuadro 9. Evaluación de la mutagenicidad del carbamato LQM 996 en cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 and TA102 con y sin activación metabólica

Número de colonias revertantes* (media ± Desviación estándar)										
Concentración (mg/mL)	TA98		TA100		TA1535		TA1537		TA102	
	-S9	+S9**	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0	18.5 ± 3.2	27.7 ± 2.5	104.1 ± 10.8	120 ± 9	9.1 ± 3.9	16.5 ± 1.9	9.1 ± 3	14.6 ± 3	319.5 ± 75.7	330 ± 66
0.1	20.3 ± 4.1	28.3 ± 6.1	94.6 ± 27.7	92.6 ± 5.5	8.3 ± 3.2	7.6 ± 4.6	7.3 ± 3.2	8.3 ± 1.1	395.3 ± 6.1	473 ± 17.5
0.2	20 ± 5	30.3 ± 4.0	96 ± 3	101.3 ± 12.3	4 ± 1.7	10.6 ± 3.5	4.6 ± 2	8.3 ± 2.5	251.6 ± 49.8	419.6 ± 31.6
0.4	17 ± 4	22.6 ± 8	83.6 ± 17.6	95 ± 4.3	2.6 ± 1.5	11.6 ± 1.5	1.6 ± 2.8	5.3 ± 3	241.3 ± 49.1	367.3 ± 58.2
0.5	18.3 ± 4	30.3 ± 1.1	96.6 ± 12.5	81.6 ± 16.6	2.6 ± 2.3	4.6 ± 3.2	0	0	194.3 ± 43	335.6 ± 18
1	13 ± 1.7	21.3 ± 3	34.6 ± 26.2	0	0	6.6 ± 2.8	0	0	150 ± 16.7	185.3 ± 29.2
Controles positivos:										
2-NF	2166.3 ± 968.7									
Azida de sodio			1519.3 ± 93.3		158.6 ± 15.9					
Ácido picrolónico							41.3 ± 3.5			
4-NQO									1020.6 ± 126.5	
2-AA	2488 ± 1080.7		2875.3 ± 72.2		226.3 ± 16.2		313.6 ± 62.5		2316 ± 158.6	

\*Cada dato representa la media (±DS) del número de colonias revertantes de tres repeticiones.

\*\*S9 Fracción microsomal de hígados de ratas tratadas con fenobarbital y B-naftoflavona enriquecida con NADP y Glucosa-6-fosfato.

(2-NF: 2-nitrofluoreno, 2-AA: 2-aminoantraceno, 4-NQO: 4-nitroquinolide N-oxido).

## **Consumo de agua**

En este estudio se midió el consumo de agua en cuatro etapas: pre-apareamiento, apareamiento, gestación-lactancia en hembras y pos-apareamiento en machos. En la etapa de pre-apareamiento los machos tratados con el carbamato LQM 996 (Figura 6) con la dosis de 25 y 50 mg/kg tuvieron menor consumo ( $p < 0.05$ ) de agua con respecto a los machos no tratados (testigos) y los machos y hembras tratados con el carbamato LQM 919 (Figura 6) en todas las dosis consumieron menor cantidad ( $p < 0.05$ ) de agua comparados con sus homólogos de los grupos testigos.

En la etapa de apareamiento (Figura 7), en todas las dosis probadas (12.5, 25 y 50 mg/kg) se observó que las ratas tratadas con LQM 919 o con LQM 996 consumieron menor cantidad ( $p < 0.05$ ) de agua que las ratas no tratadas de los respectivos grupos testigo.

En la etapa de gestación y lactancia (Figura 8), las hembras tratadas con 12.5 y 25mg/kg del carbamato LQM 919, tuvieron un menor ( $p < 0.05$ ) consumo de agua que las hembras no tratadas. Las hembras tratadas con 12.5 mg/kg del carbamato LQM 996 tuvieron un mayor consumo ( $p < 0.05$ ) de agua comparadas con las hembras no tratadas.

En la etapa pos-apareamiento, los machos tratados con 12.5mg y 50mg/kg del carbamato LQM 919 consumieron menor cantidad de agua (Figura 9).

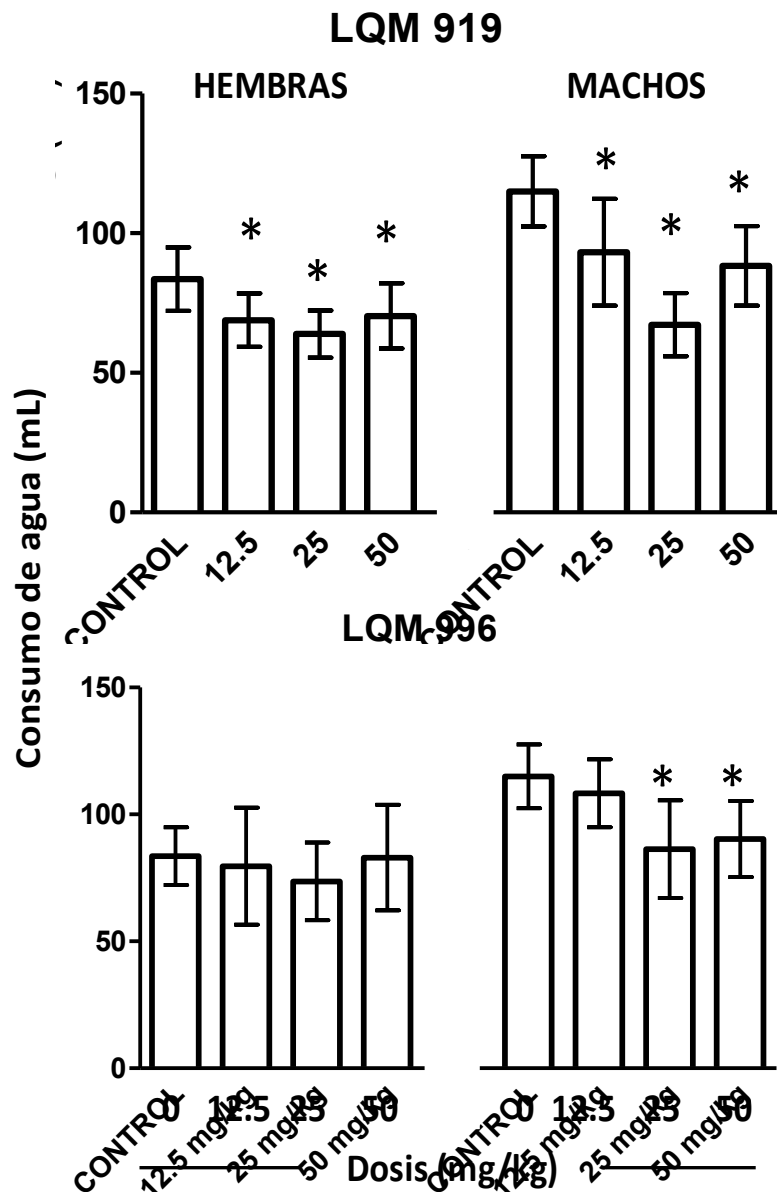


Figura 6.- Consumo de agua de ratas expuestas antes del apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 o LQM996). Se muestra el promedio DE. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la media del grupo testigo (0 mg/mL).

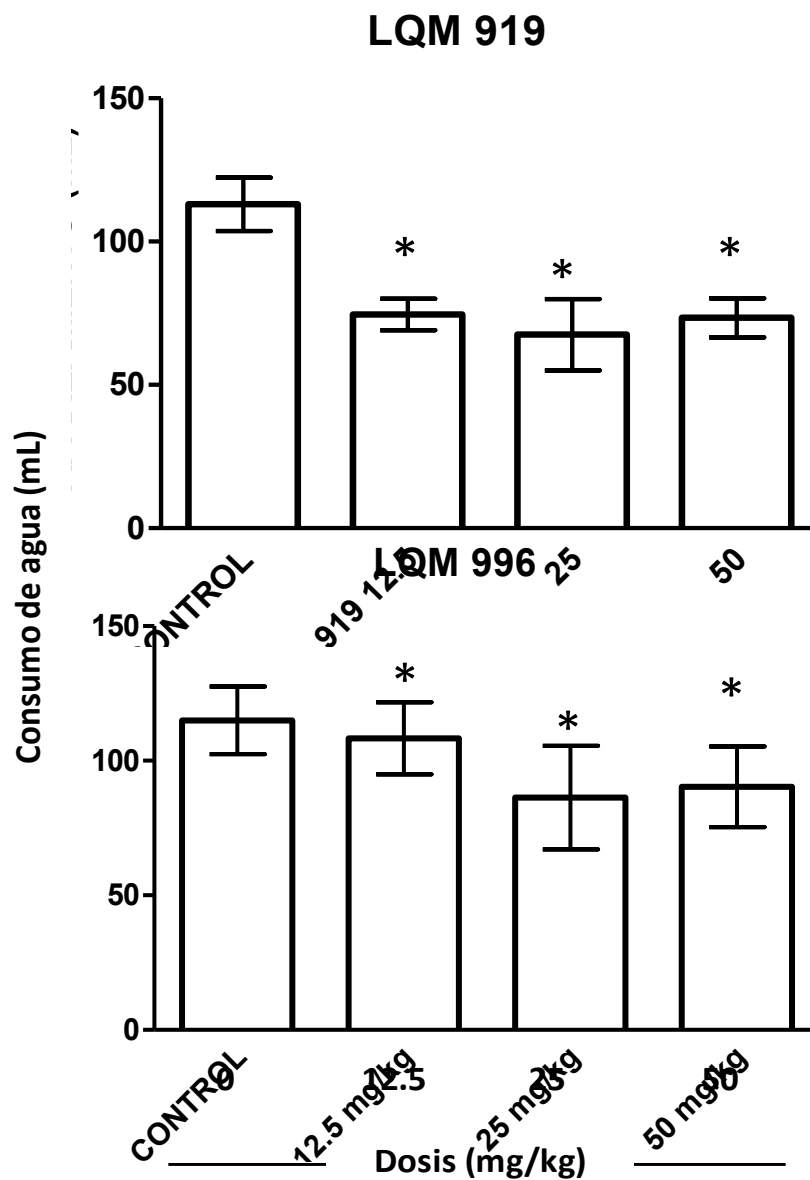


Figura 7.- Consumo de agua de las parejas de ratas (hembra y macho) expuestas durante el apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 o LQM996). Se muestra el promedio  $\pm$  DE. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la media del grupo testigo (0 mg/mL).

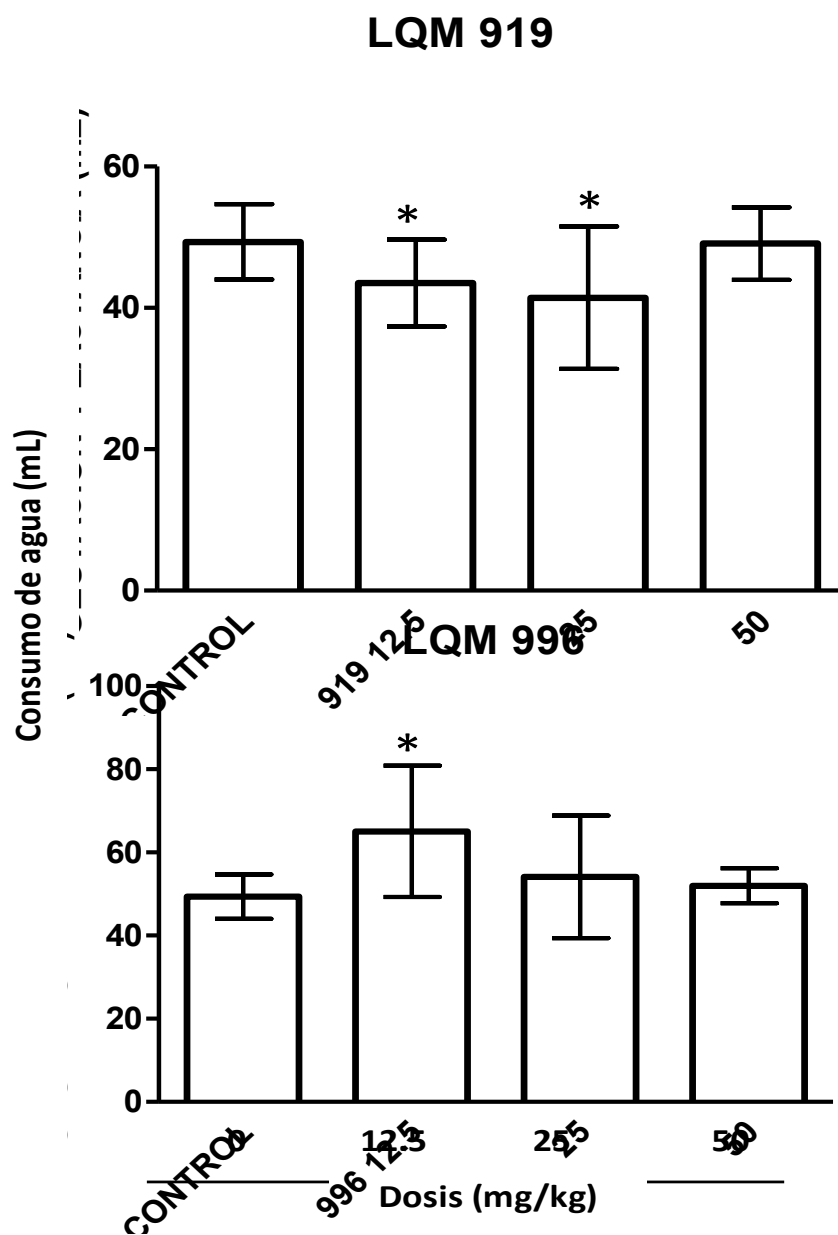


Figura 8.- Consumo de agua de ratas expuestas durante la gestación y lactancia a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 y LQM996). Se muestra el promedio ± DE. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la media del grupo testigo (0 mg/mL).

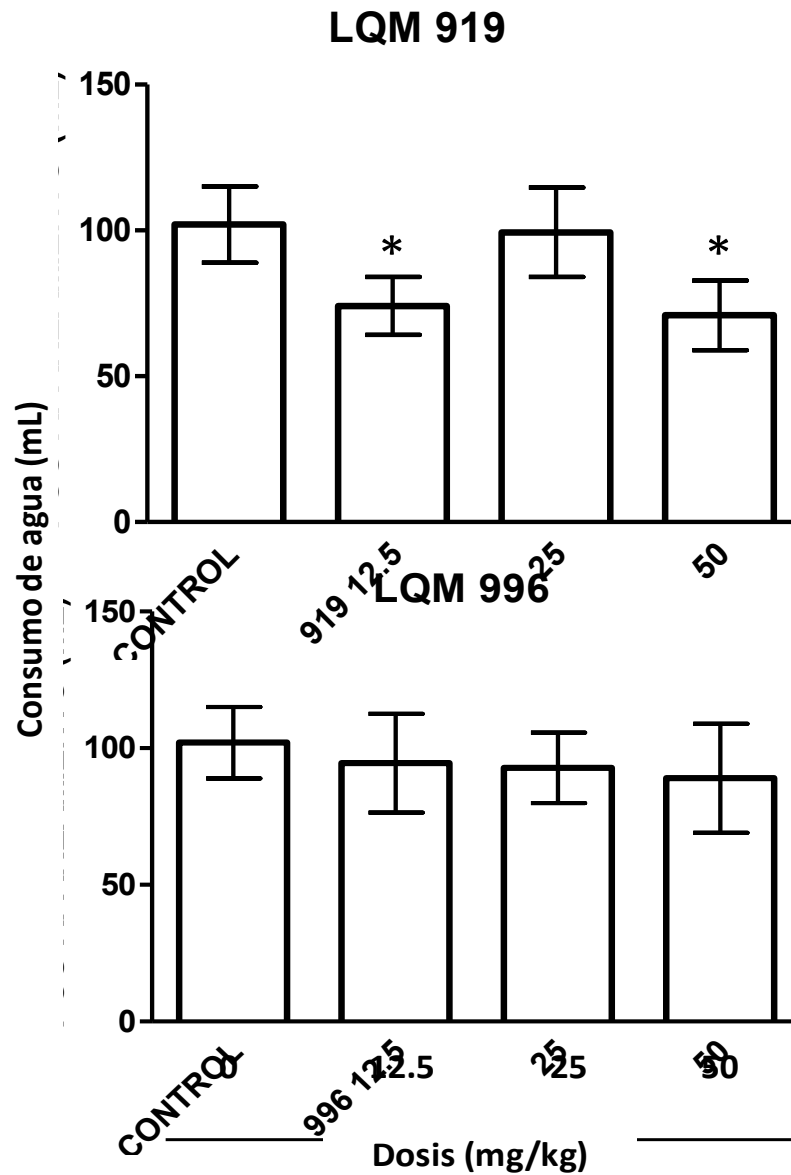


Figura 9.- Consumo de agua de ratas machos expuestas en la etapa pos-apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 o LQM996). Se muestra el promedio  $\pm$  DE. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la media del grupo testigo (0 mg/mL).

## **Consumo de alimento**

El consumo de alimento se midió en las mismas etapas en las que fue medido el consumo de agua.

En la etapa de apareamiento (hembras y machos juntos), las ratas tratadas con 25 mg/kg del carbamato LQM 919 y las ratas tratadas con 50 mg/kg del carbamato LQM 996 consumieron menor cantidad ( $p < 0.05$ ) de alimento que las ratas no tratadas del grupo testigo (Figura 11).

En la etapa de gestación y lactancia (Figura 12), las hembras tratadas con 25mg/kg del carbamato LQM 919 y las hembras tratadas con 12.5 mg/kg del carbamato LQM 996 tuvieron un menor ( $p < 0.05$ ) consumo de alimento que las hembras no tratadas. Por el contrario, las hembras tratadas con 12.5 mg/kg del carbamato 919 y las hembras tratadas con 50 mg/kg del carbamato LQM 996 consumieron una mayor ( $p < 0.05$ ) cantidad de alimento comparadas con las hembras no tratadas.

En las etapas de pre-apareamiento en los dos sexos y pos-apareamiento en machos (Figuras 10 y 13) ninguno de los carbamatos alteró el consumo de alimento de las ratas tratadas ( $p > 0.05$ ).



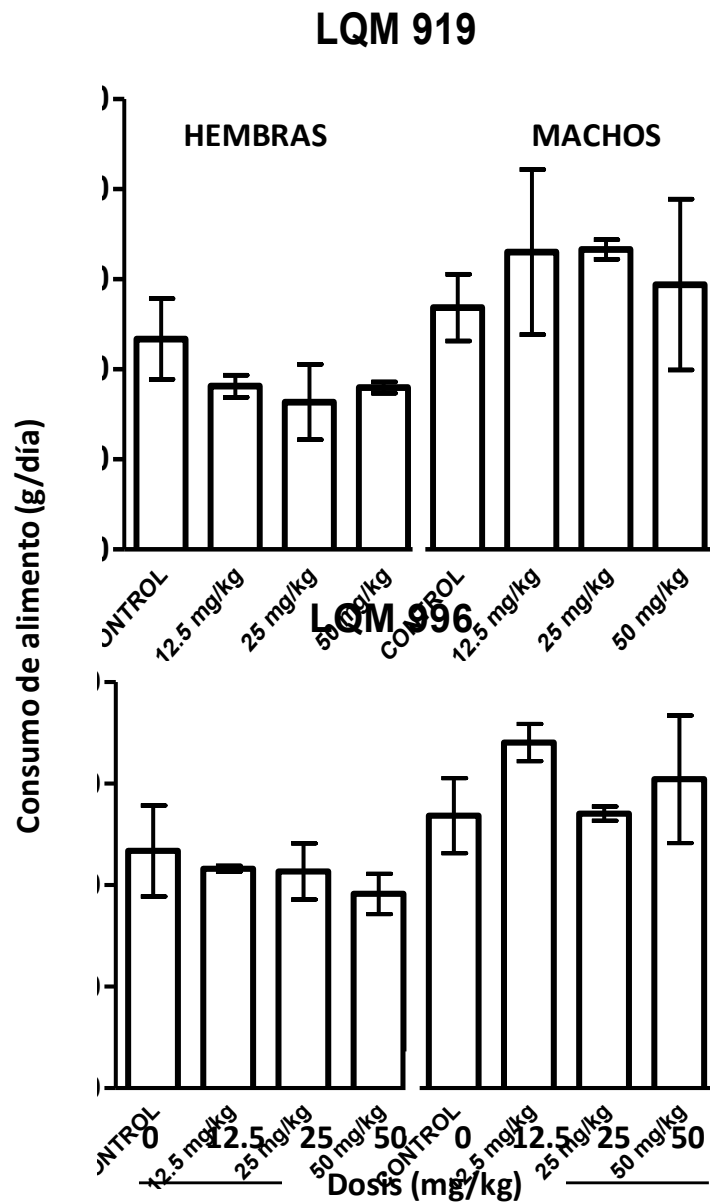


Figura 10.- Consumo de alimento de ratas expuestas en el pre-apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 y LQM996). Se muestra el promedio  $\pm$  DE. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la media del grupo testigo (0 mg/mL).

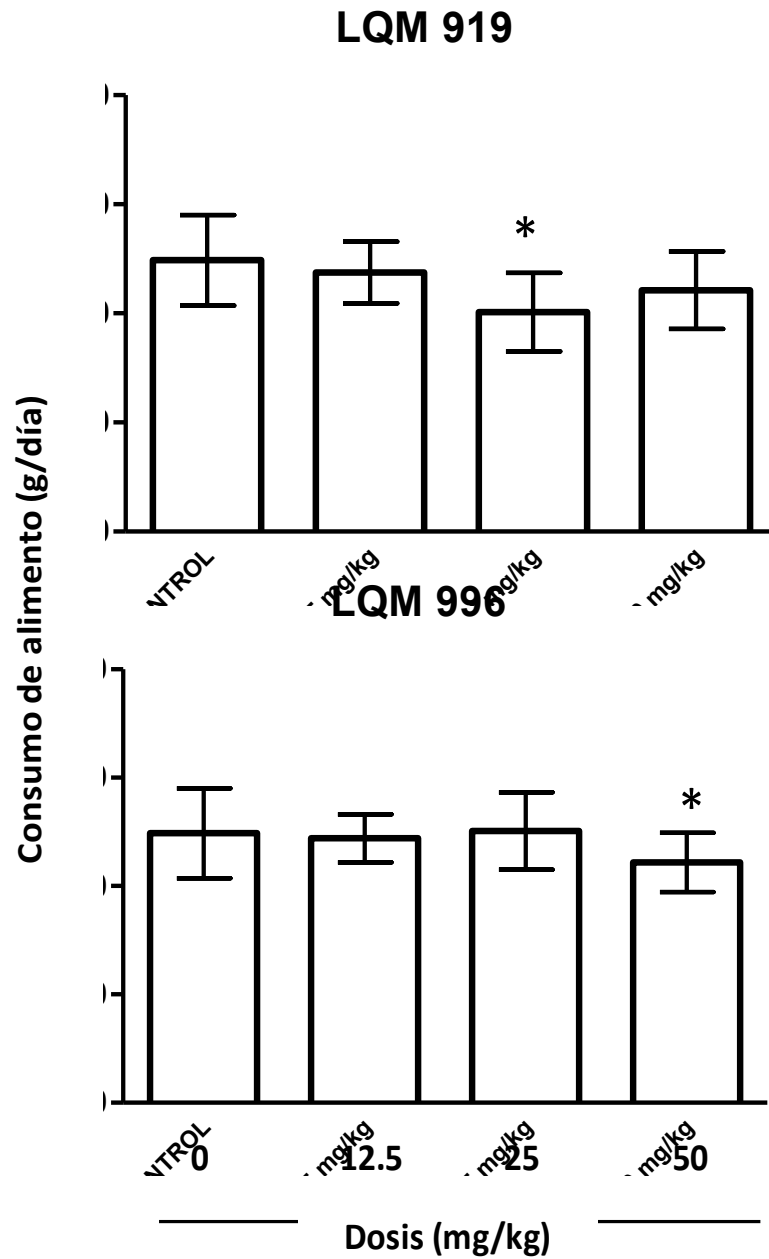


Figura 11.- Consumo de alimento de ratas expuestas en el apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 y LQM996). Se muestra el promedio  $\pm$  DE. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la media del grupo control (0 mg/mL).

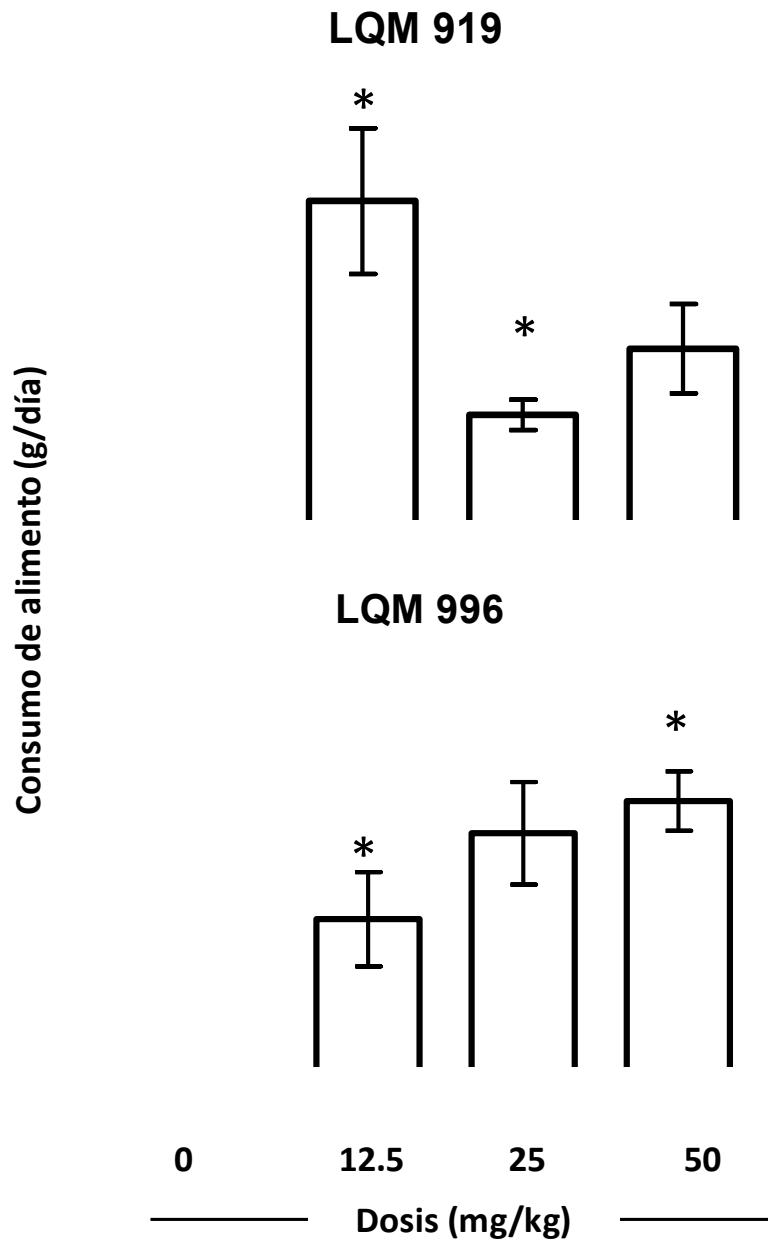


Figura 12.- Consumo de alimento de ratas expuestas en la gestación y lactancia a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 y LQM996). Se muestra el promedio  $\pm$  DE. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la media del grupo control (0 mg/mL).

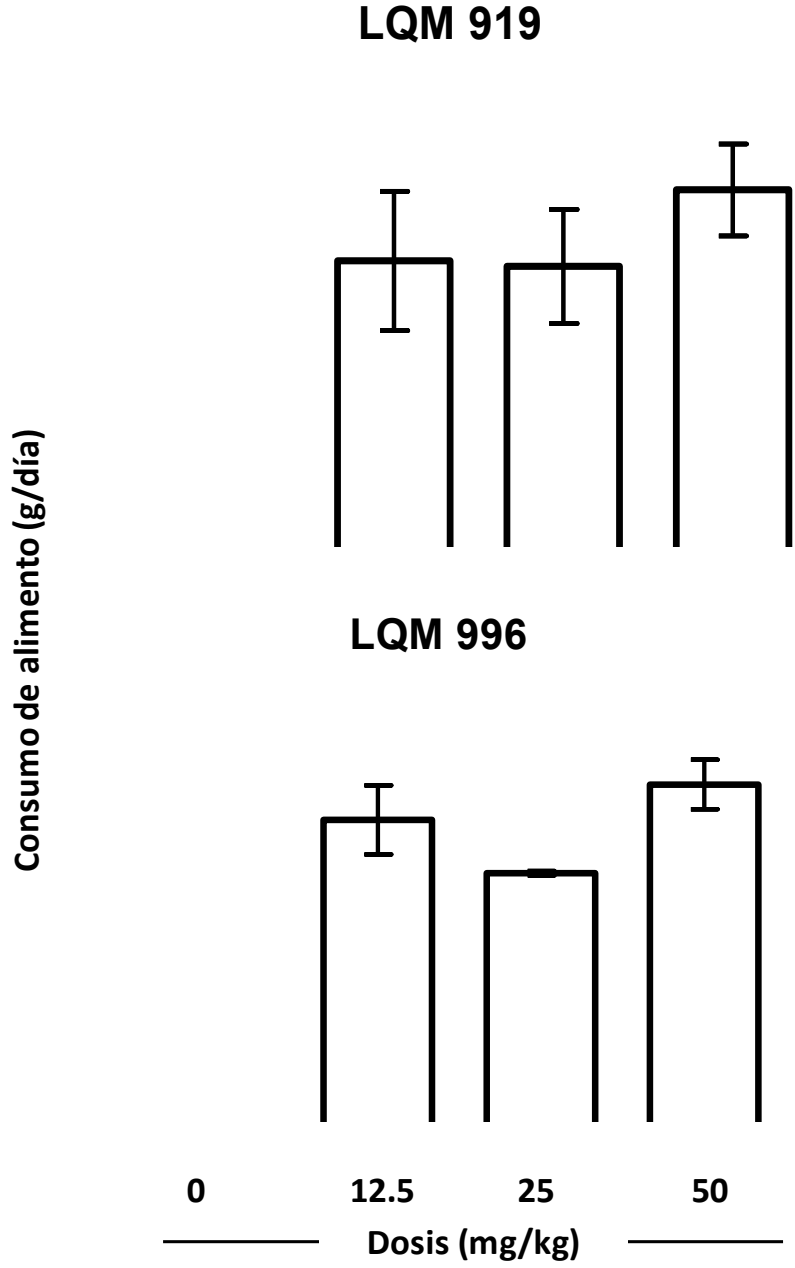


Figura 13.- Consumo de alimento de ratas expuestas en el pos-apareamiento a diferentes dosis de dos etil-carbamatos (LQM919 y LQM996). Se muestra el promedio DE. \*Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la media del grupo control (0 mg/mL).

## **Resultados parámetros reproductivos hembras**

Los resultados obtenidos del efecto de la exposición a los carbamatos LQM 919 o LQM 996 sobre las variables categóricas reproductivas evaluadas en las ratas hembras (número de hembras que copularon, número de hembras gestantes, número de días a la concepción, número de días de gestación, número de hembras con nacidos vivos y número de hembras con crías vivas al día 6), se muestran en los cuadros 10 y 11 respectivamente.

En las hembras expuestas a la dosis de 25 mg/kg del carbamato LQM 919 se observó una reducción ( $p < 0.05$ ) del número de hembras gestantes y en consecuencia, del número de hembras con nacidos vivos con respecto a las hembras no expuestas, las dosis de 12.5 y 50 mg/kg de este carbamato no tuvieron efecto sobre estas variables. El resto de las variables no fueron afectadas por la exposición a este carbamato. La exposición al carbamato LQM 996 no afectó ninguna de las variables categóricas reproductivas estudiadas en las hembras.

**Cuadro 10. Resultados parámetros reproductivos hembras LQM919**

	<b>CONTROL (n=10)</b>	<b>12.5 (n=10)</b>	<b>25 (n=10)</b>	<b>50 (n=10)</b>
PAREJAS (N)	10	10	10	10
Número de hembras que copularon (N)	10	10	9	10
Hembras gestantes(N)	9	9	<b>5*</b>	9
Día de detección del tapón(N) (1-5)	10	9	9	9
Día de detección del tapón (N) (6-14)	0	1	0	1
Gestación <21 días (N)	4	1	2	2
Gestación =22 días (N)	3	4	2	4
gestación>=22 días	2	4	1	2
Hembras con nacidos vivos (N)	9	8	<b>4*</b>	7
Hembras con nacidos vivos al día 6 (N)	9	8	<b>4*</b>	6

\*Diferencia significativa con respecto al control (P< 0.05).

**Cuadro 11. Resultados parámetros reproductivos hembras LQM996**

	<b>CONTROL (n=10)</b>	<b>12.5mg/kg (n=10)</b>	<b>25mg/kg (n=10)</b>	<b>50mg/kg (n=10)</b>
PAREJAS (N)	10	10	10	10
Número de hembras que copularon (N)	10	10	10	10
Hembras gestantes(N)	9	10	10	10
Día de detección del tapón(N) (1-5)	10	9	8	10
Día de detección del tapón (N) (6-14)	0	1	2	0
Gestación <21 días (N)	4	2	1	2
Gestación =22 días (N)	3	2	8	6
Gestación >22 días	2	6	1	2
Hembras con nacidos vivos (N)	9	10	10	10
Hembras con nacidos vivos al día 6 (N)	9	10	10	10

\*Diferencia significativa con respecto al control (P< 0.05).

Los resultados obtenidos del efecto de la exposición a los carbamatos LQM 919 o LQM 996 sobre las variables promediables (no categóricas) reproductivas evaluadas en las ratas hembras (número de cuerpos lúteos, implantaciones y crías vivas; proporción hembras/machos de las camadas; peso de la camada y peso de las crías), se muestran en los cuadros 12 y 13 respectivamente. Las crías de las hembras expuestas a la dosis de 12.5 mg/kg del carbamato LQM919 tuvieron un menor ( $p<0.05$ ) peso al nacimiento y un menor ( $p<0.05$ ) peso al día seis pos-nacimiento comparadas con las crías de las ratas no expuestas. Por el contrario, la dosis de 50 mg/kg del mismo carbamato produjo un mayor ( $p<0.05$ ) peso al nacimiento en las crías de las ratas expuestas en comparación a las crías de las ratas no expuestas. Las hembras tratadas con la dosis de 12.5 mg/kg del carbamato LQM 996 tuvieron un mayor número ( $p<0.05$ ) de cuerpos lúteos que las hembras no expuestas. Todas las dosis de este carbamato produjeron un mayor número ( $p<0.05$ ) de implantaciones en las hembras expuestas comparadas con las hembras del grupo testigo. Las crías de las hembras expuestas a la dosis de 50 mg/kg del mismo carbamato tuvieron un menor peso ( $p<0.05$ ) al nacimiento y al día seis pos-nacimiento en comparación a las crías de las ratas no tratadas.



**Cuadro 12. Resultados parámetros reproductivos hembras LQM919**

	<b>CONTROL</b>	<b>12.5mg/kg</b>	<b>25mg/kg</b>	<b>50mg/kg</b>
Cuerpo lúteo/ hembra (media +/- SD)	15.8 4.84	15.4 3.20	18 9.37	14.9 5.97
Implantaciones/ hembra (media	12.44 4.75	12.6 4.83	10.4 6.79	12.88 6.50
Nacidos vivos al nacimiento (media +/- SD)	11.66 4.52	9.75 5.39	11.5 6.02	9.77 6.17
Crías vivas al día 6 (media +/- SD)	11.66 4.52	8.625 5.10	10.75 5.73	9 6.008
Proporción de género al nacimiento (machos/hembras) media +/-SD	1.55 1.60	0.59 0.30	0.88 0.59	1.01 0.82
Proporción de género al día 6 (machos/hembras) media +/-SD	1.55 1.60	1.28 1.20	0.89 0.51	1.77 1.28
Peso de la camada al nacimiento (media)	72.22 26.90	56.5 29.98	70.5 36.1	73 43.96
Peso de la camada al día 6(media)	167.22 60.35	103.5 53.56	160.75 84.33	151.75 105.65
Peso de las crías al nacimiento (media)	6.21 0.90	<b>5.51 1.42*</b>	6.45 2.26	<b>6.58 1.15*</b>
Peso de las crías al día 6 (media)	14.17 2.28	<b>12 4.86*</b>	14.14 4.88	14.63 5.32

\*Diferencia significativa con respecto al control (P< 0.05).

**Cuadro 13. Resultados parámetros reproductivos hembras LQM996**

	<b>CONTROL</b>	<b>12.5mg/kg</b>	<b>25mg/kg</b>	<b>50mg/kg</b>
Cuerpo lúteo/ hembra (media +/- SD)	15.8 4.84	<b>21.7 5.1650*</b>	16.1 4.50	20.4 2.95
Implantaciones/ hembra (media	12.44 4.75	<b>15.6 2.63*</b>	<b>16 2.56*</b>	<b>16.9 0.994*</b>
Nacidos vivos al nacimiento (media +/- SD)	11.66 4.52	11.4 3.77	12.7 4.05	15.1 1.66
Crías vivas al día 6 (media +/- SD)	11.66 4.52	10.4 4.32	12.4 3.97	13.8 2.29
Proporción de género al nacimiento (machos/hembras) media +/-SD	1.55 1.60	0.989 0.79	1.08 0.61	1.19 1.12
Proporción de género al día 6 (machos/hembras) media +/-SD	1.55 1.60	0.89 0.52	0.99 0.61	1.73 1.78
Peso de la camada al nacimiento (media)	72.22 26.90	74.5 19.96	141.1 52.33	151.4 66.65
Peso de la camada al día 6(media)	167.22 60.35	141.1 52.33	151.4 66.65	179.77 42.78
Peso de las crías al nacimiento (media)	6.21 0.90	6.28 0.83	6.47 0.63	<b>5.89 0.68*</b>
Peso de las crías al día 6 (media)	14.17 2.28	13.79 4.20	13.57 2.11	<b>12.45 3.96*</b>

\*Diferencia significativa con respecto al control (P< 0.05).

Los resultados obtenidos del efecto de la exposición a los carbamatos LQM 919 o LQM 996 sobre la generación de crías anormales y sobre la pérdida de descendencia en las ratas hembras se muestran en los cuadros 14 y 15. Las dosis de 12.5 y 50 mg/kg del carbamato LQM 919 produjo mayor ( $p < 0.05$ ) pérdida prenatal de crías (calculado por el número de implantaciones menos el número de nacidos vivos) en las hembras expuestas en comparación a las hembras no expuestas. De la misma manera se observó que todas las dosis evaluadas de este carbamato produjeron una mayor ( $p < 0.05$ ) pérdida pos-natal de crías (nacidos vivos menos vivos al día 6) en las ratas expuestas en comparación a las hembras del grupo testigo. Con el carbamato LQM 996, las dosis de 12.5 y 25 mg/kg produjeron una mayor pérdida ( $p < 0.05$ ) prenatal de crías en las hembras expuestas en comparación a las hembras no expuestas. De la misma manera se observó que todas las dosis evaluadas de este carbamato produjeron una mayor ( $p < 0.05$ ) pérdida pos-natal de crías en las ratas expuestas en comparación a las hembras del grupo testigo.

**Cuadro 14. Resultados parámetros reproductivos hembras LQM919**

<b>ANORMALIDADES EN CRÍAS</b>	<b>CONTROL (n=10)</b>	<b>12.5mg/kg (n=10)</b>	<b>25mg/kg (n=10)</b>	<b>50mg/kg (n=10)</b>
Hembras sin crías anormales 0	10	9	10	10
<b>Hembras con 1 cría anormal</b>	0	1	0	0
Hembras con 2 crías anormales	0	0	0	0
Hembras con > = 3 crías anormales	0	0	0	0
<b>PÉRDIDA DE DESCENDENCIA</b>				
<b>Pre-implantación ( cuerpos lúteos menos implantaciones)</b>				
Hembras con 0	2	5	0	0
Hembras con 1	1	1	0	1
Hembras con 2	0	0	0	1
Hembras con > = 3	6	3	4	6
<b>Pre-natal (implantaciones menos nacidos vivos)</b>				
Hembras con 0	4	<b>2*</b>	0	<b>1*</b>
Hembras con 1	3	<b>0*</b>	3	<b>1*</b>
Hembras con 2	2	<b>0*</b>	0	<b>2*</b>
<b>Hembras con &gt; = 3</b>	0	<b>6*</b>	1	<b>4*</b>
<b>Pos-natal (nacidos vivos menos vivos al día 6)</b>				
Hembras con 0	9	<b>4*</b>	<b>2*</b>	<b>3*</b>
Hembras con 1	0	<b>2*</b>	<b>1*</b>	<b>3*</b>
Hembras con 2	0	<b>0*</b>	<b>1*</b>	<b>1*</b>
Hembras con > = 3	0	<b>2*</b>	<b>0*</b>	<b>1*</b>

\*Diferencia significativa con respecto al control (P< 0.05).

**Cuadro 15. Resultados parámetros reproductivos hembras LQM996**

<b>ANORMALIDADES EN CRÍAS</b>	<b>CONTROL (n=10)</b>	<b>12.5mg/kg (n=10)</b>	<b>25mg/kg (n=10)</b>	<b>50mg/kg (n=10)</b>
Hembras sin crías anormales 0	9	7	10	10
Hembras con 1 cría anormal	0	1	0	0
Hembras con 2 crías anormales	0	1	0	0
Hembras con > = 3 crías anormales	0	1	0	0
<b>PÉRDIDA DE DESCENDENCIA</b>				
<b>Pre-implantación ( cuerpos lúteos menos implantaciones)</b>				
Hembras con 0	2	2	4	1
Hembras con 1	1	1	1	1
Hembras con 2	0	0	1	3
Hembras con > = 3	6	7	4	5
<b>Pre-natal (implantaciones menos nacidos vivos)</b>				
Hembras con 0	4	<b>1*</b>	<b>3*</b>	3
Hembras con 1	3	<b>1*</b>	<b>1*</b>	2
Hembras con 2	2	<b>3*</b>	<b>1*</b>	2
Hembras con > = 3	0	<b>5*</b>	<b>5*</b>	3
<b>Pos-natal (nacidos vivos menos vivos al día 6)</b>				
Hembras con 0	9	<b>6*</b>	<b>6*</b>	<b>3*</b>
Hembras con 1	0	<b>1*</b>	<b>4*</b>	<b>4*</b>
Hembras con 2	0	<b>1*</b>	<b>0*</b>	<b>2*</b>
Hembras con > = 3	0	<b>2*</b>	<b>0*</b>	<b>1*</b>

\*Diferencia significativa con respecto al control (P< 0.05).

Durante el experimento se observó que de las diez ratas expuestas a la dosis de 12.5 mg/kg del carbamato LQM 996, tres parieron crías con espina bífida y anencefalia determinada posteriormente como raquisquisis (Figura 14). El porcentaje de crías con raquisquisis observado en la dosis de 12.5 mg/kg del carbamato LQM 996 fue del 6.3 %. No se observó raquisquisis ni ninguna otra anomalía en ratas expuestas a las dosis más altas de este carbamato. Con base en este resultado, se repitió el experimento con un nuevo grupo de diez ratas expuestas únicamente a la dosis de 12.5 mg/kg. De este nuevo experimento, resultó una rata con una cría con la misma anomalía anteriormente observada. De esta rata se obtuvieron dos camadas consecutivas (ya sin la exposición al carbamato) y en cada una de las camadas se observó al menos una cría con la misma anomalía. Adicionalmente en cada una de las camadas obtenidas de este grupo, se observaron colas dobladas en aproximadamente el 5.3 % de las crías.

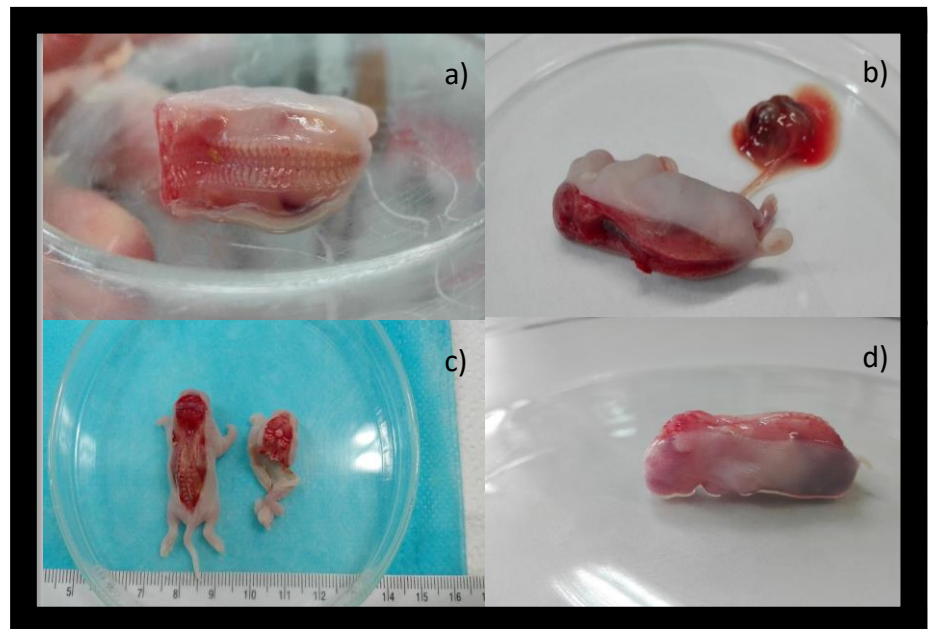


Figura 14. Crías con raquisquisis de ratas expuestas a 12.5 mg/kg con el carbamato LQM 996. a) Cría con anencefalia, b) cría con raquisquisis sin anencefalia, c) crías con raquisquisis vista dorsal, d) cría con raquisquisis vista lateral.

La exposición a la dosis de 12.5 mg/kg del carbamato LQM919 también produjo en una de las 10 hembras tratadas una cría con raquisquisis, correspondiente al 1.2% del total de las crías nacidas de hembras expuestas a esta dosis. No se llevó a cabo la repetición de la exposición a este carbamato.

Eventualmente otros hallazgos encontrados en hembras expuestas al carbamato LQM 919 fueron: mucómetra (5), mortalidad al parto (2), masa amorfa en útero (1) (Figura 16)., esplenomegalia (1) (Figura 15) y crías más pequeñas (15) (Figura 16). La exposición al carbamato LQM996 no produjo otros hallazgos.

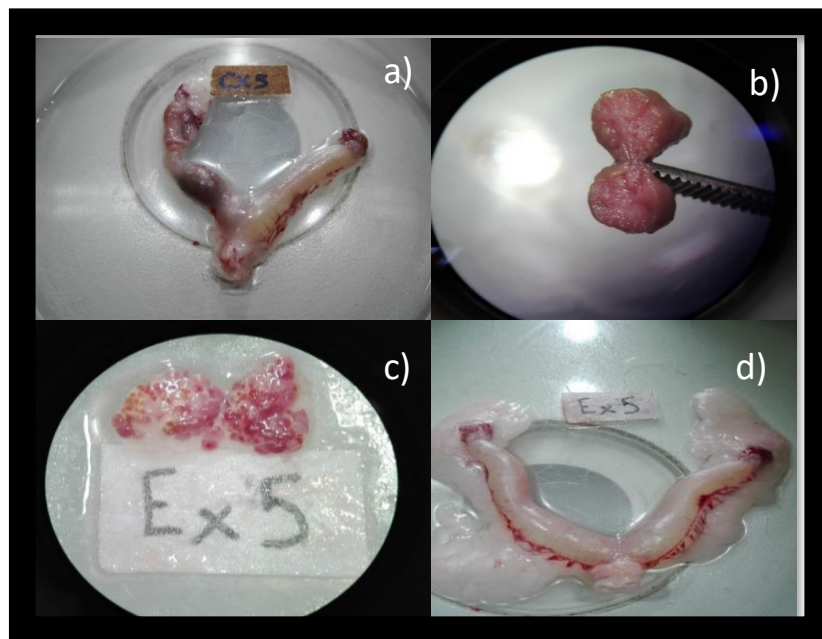


Figura 15. Alteraciones reproductivas en hembras expuestas a 12.5 mg/kg y 25 mg/ kg del carbamato LQM 919. a) útero con mucómetra y masa amorfa, b) masa amorfa, c) ovario con ausencia de cuerpos lúteos, d) útero con mucómetra.



Figura 16. Diferencias de tamaño entre crías tratadas con el carbamato LQM 919.

### **Resultados parámetros reproductivos machos**

Los resultados obtenidos del efecto de la exposición al carbamato LQM919 y LQM 996 sobre los parámetros reproductivos en machos (motilidad progresiva, concentración espermática parcial y total, viabilidad, morfoanomalías y peso de órganos reproductivos) se muestran en los cuadros 16 y 17. Todas las dosis del carbamato LQM 919 produjeron en los machos tratados menor motilidad espermática ( $p < 0.07$ ), menor porcentaje de morfoanomalias y menor peso de los testículos en comparación con los machos del grupo no tratado.

Todas las dosis evaluadas del carbamato LQM 996 produjeron en los machos tratados menor peso de próstata y vesículas seminales ( $p < 0.05$ ) y menor porcentaje de morfoanomalias secundarias (Figura 17) ( $p < 0.05$ ) que los machos del grupo testigo. El peso de los testículos fue mayor ( $p < 0.05$ ) en los machos expuestos a la dosis de 12.5 mg/kg de este carbamato en comparación a los machos del grupo no tratado.



**Cuadro 16. Resultados parámetros reproductivos machos LQM919**

	<b>CONTROL</b>	<b>12.5mg/kg</b>	<b>25mg/kg</b>	<b>50mg/kg</b>
<b>Motilidad (%)</b>	84.5 6.8	<b>42 15.4*</b>	<b>65.5 26.7*</b>	<b>65 20.683*</b>
Concentración espermática (millones)				
Parcial	22.0 11.8	26.0 17.6	26.1 11.5	30.5 15.5
Total	142 9.7	120.5 60.8	125 51.7	113.2 52.9
<b>Viabilidad (%)</b>	69.65 9.930	60.45 14.692	72.889 25.405	72.4 5.626
Morfoanomalías				
Normales	86.9 4.97	86.65 30.46	95.61 0.99	93.85 1.94
Primarias	0.6 0.699	0.444 0.699	0.111 0.333	0.3 0.483
<b>Secundarias</b>	13.85 3.98	<b>3.15 1.37*</b>	<b>4.33 1*</b>	<b>6 1.95*</b>
Peso de órganos reproductivos				
<b>Testículo derecho</b>	4.2 0.422	<b>3.4 0.966*</b>	<b>3 0.667*</b>	<b>3.2 0.422*</b>
<b>Testículo izquierdo</b>	4.3 0.483	<b>3.5 1.179*</b>	<b>3 1.054*</b>	<b>3.3 0.483*</b>
Próstata y vesículas seminales	3 0	3 0.471	2.7 0.675	3 0.471

\*Diferencia significativa con respecto al control (P< 0.07).

**Cuadro 17. Resultados parámetros reproductivos machos LQM996**

	<b>CONTROL</b>	<b>12.5mg/kg</b>	<b>25mg/kg</b>	<b>50mg/kg</b>
Motilidad (%)	84.5 6.852	79.5 6.852	71 17.488	73 15.492
Concentración espermática (millones)				
Parcial	22.0 11.8	30.5 20.6	43.5 28.5	34 8.4
Total	142 97.5	167.5 124.9	187.5 77.8	131.5 39.3
Viabilidad (%)	69.65 9.930	66.27 24.804	69.65 17.907	80.6 10.384
Morfoanomalías (%)				
<b>Normales</b>	86.9 4.97	<b>97.38 1.29*</b>	<b>95.15 1.61*</b>	<b>92.05 1.99*</b>
Primarias	0.3 0.34	0.66 0.7071	0.25 0.3535	0.3 0.3496
<b>Secundarias</b>	13.85 3.98	<b>1.83 1.22*</b>	<b>4.6 1.79*</b>	<b>7.65 1.91*</b>
Peso de órganos reproductivos				
Testículo derecho	4.2 0.422	5.034 1.252	4.1 0.568	4.4 0.699
Testículo izquierdo	4.3 0.483	5.136 0.997*	4.2 0.63	4.4 0.516
<b>Próstata y vesículas seminales</b>	3 0	<b>2.144 1.241*</b>	<b>2.4 0.516*</b>	<b>2.9 0.568*</b>

\*Diferencia significativa con respecto al control (P< 0.05).

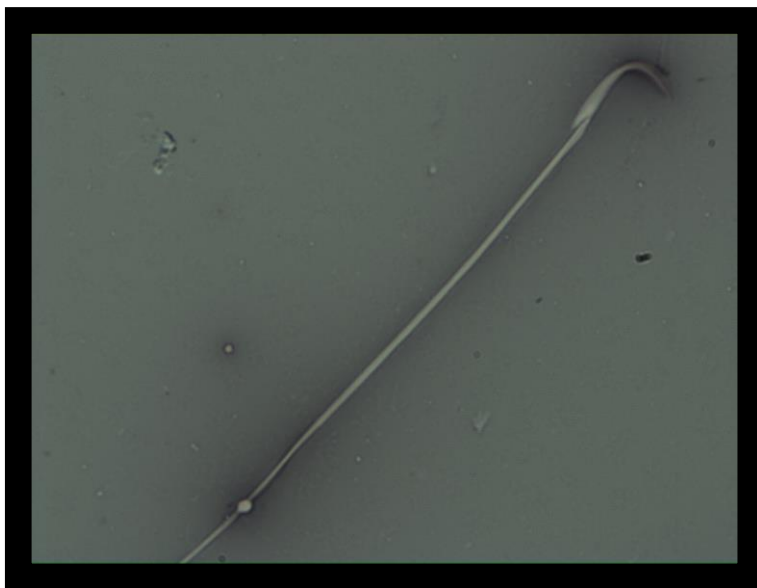


Figura 17. Morfoanomalía espermática secundaria (gota citoplasmática distal) en machos tratados a 12.5 mg/kg con el carbamato LQM 919.

## Discusión

---

*Rhipicephalus microplus* es considerada como la garrapata más importante a nivel mundial, ya que produce fuertes pérdidas económicas a la ganadería (Castellanos, 1998). El tratamiento para su control ha consistido en la aplicación de ixodicidas, sin embargo, su mal uso ha generado la aparición de resistencia (Rosario-Cruz et al., 2009). Una alternativa para el manejo de resistencia es el desarrollo de nuevos ixodicidas. Se ha demostrado que los carbamatos LQM 919 y LQM 996 tienen efectos negativos sobre la reproducción de la garrapata de *R. microplus* por lo que han sido propuestos para su control (Prado-Ochoa et al., 2013; Pérez-González et al., 2014), sin embargo, una de las limitantes para el uso terapéutico de carbamatos, son los reportes de mutagenicidad y teratogenicidad de algunos carbamatos como el metolcarb y uretano entre otros, por lo que es necesario evaluar la mutagenicidad y potencial teratogénico de nuevos carbamatos que sean propuestos para su utilización en animales. En el presente estudio se demostró que los carbamatos evaluados no tuvieron potencial mutagénico sobre cinco cepas de *Salmonella typhimurium* en la prueba de Ames con activación y sin activación metabólica, sin embargo, se observó la disminución de parámetros reproductivos en ratas hembras y machos expuestas a los carbamatos y la inducción de teratas, los cuales son efectos que debe ser ampliamente estudiado.

La prueba de Ames es una prueba ampliamente utilizada en todo el mundo para la evaluación de la mutagenicidad de pesticidas. Esta prueba es altamente sensible y puede demostrar diferentes tipos de mutaciones como las de sustitución de pares de bases y las de desfaseamiento en el marco de lectura en cepas de *S. typhimurium* (Maron y Ames- 1983). El ensayo se puede utilizar con la mezcla S9 la cual es una fracción microsomal de hígado de rata cuya función es un sistema de activación metabólica, que permite la evaluación de metabolitos de la muestra

problema. La base de la prueba consiste en revertir el carácter auxótrofo (organismo modificado) de la bacteria y hacerla protótrofa a histidina. Los resultados de este estudio mostraron que los carbamatos no indujeron la reversión de la auxotrofia a histidina en ninguna de las cinco cepas de *Salmonella* a ninguna de las dosis evaluadas, por lo que resultaron negativos a mutagenicidad. Lo anterior es concordante con lo reportado por Ordaz-Pichardo et al. (2005), quienes observaron que el LQM996 no fue mutagénico en ninguna de cuatro cepas probadas entre las cuales se encontró la TA97, TA98, TA100 y TA102 con y sin activación metabólica. En estudios previos se observó que los carbamatos evaluados inducen un aumento de eritrocitos policromáticos micronucleados en ratas, que puede ser el resultado de daño al DNA (Prado-Ochoa et al., 2016), por otro lado, se observó un aumento de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (oxidative stress) que puede provocar daño a macromoléculas incluyendo al DNA (Prado-Ochoa et al., 2014). Otros carbamatos como el uretano y el benomyl resultaron mutagénicos en ensayos de Ames con *S. typhimurium* sin embargo, la estructura química de estos dos compuestos es muy distinta a los etil-carbamatos evaluados en este estudio por lo que no necesariamente comparten características de toxicidad. Los resultados encontrados muestran que, aunque los carbamatos pudieran inducir daño genotóxico en mamíferos, este daño no se expresa como un potencial mutagénico sobre bacterias en la prueba de Ames.

Parte de los estudios de toxicidad sobre mamíferos son los que evalúan los efectos de una sustancia sobre su capacidad reproductiva y sobre el desarrollo de sus crías. La OECD en su guía número 421: *Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test* establece los lineamientos protocolarios para la evaluación de los efectos de una sustancia sobre parámetros reproductivos y el desarrollo de órganos reproductivos de animales adultos, así como pérdida de crías antes de la implantación embrionaria (pre-implantación), durante la etapa gestacional (pre-natal) o en la etapa posterior al nacimiento (pos-natal), incluyendo la aparición de malformaciones (teratogenicidad). Estas evaluaciones se hacen utilizando como

modelo experimental a la rata, debido a su alta fecundidad, prolificidad, corto tiempo de gestación, homogeneidad genética (en las líneas de bioterio) y su alta sensibilidad a este ensayo. En este trabajo se observó que el carbamato LQM 919 a la dosis de 25 mg/kg produjo una reducción del 50% de la fertilidad en el grupo de hembras expuestas y redujo el peso de sus crías nacidas vivas, además todas las dosis de este carbamato incrementaron la mortalidad pre- y pos-natal de las crías. Hallazgos similares con otros carbamatos fueron reportados por Collins et al. (1971), quienes observaron una reducción drástica de la fertilidad en la segunda generación de ratas Osborne-Mendel expuestas a 10,000 ppm de carbaryl. La reducción en la fertilidad observado en las ratas del presente estudio produjo en consecuencia, la reducción en el número de crías vivas de las ratas expuestas a LQM919. Este resultado indica que este carbamato a dosis altas afecta en forma importante la reproducción en ratas por lo que se deben evaluar sus posibles efectos en la reproducción de especies domésticas superiores en particular, en los bovinos.

Con respecto a la mortalidad de crías existen reportes de otros carbamatos que inducen este efecto. Nishimura y Kuginuki (1958), encontraron una mortalidad variable entre 5.8 hasta el 42.8% de las crías de ratonas expuestas a 1500 mg/kg del carbamato uretano. Eto et al., (1980), reportaron que una inyección del 0.0008% de la DL50 de carbaryl produjo 100% de mortalidad en embriones de pollo. Weil and Carpenter (1966), reportaron que la administración de carbaryl a dosis de 500 mg/kg/día redujo significativamente la sobrevivencia de crías en ratas Harlan-Wistar. En contraste, Hart (1971), no observó mortalidad en crías de ratas Sprague-Dawley tratadas con 300 y 525 mg/kg/día de carbaryl. La variabilidad de la mortalidad observada por la administración de carbamatos puede estar relacionada a factores como la dosis, la vía de administración, el modelo experimental y la absorción de cada compuesto.

En contraste a lo observado con el carbamato LQM919, el carbamato LQM996 incrementó el número de cuerpos lúteos y el número de implantaciones en

el útero de las ratas expuestas, adicionalmente se observó un aumento en la cantidad de crías nacidas vivas y de su peso al nacimiento, aunque también se observó mortalidad pre- y pos-natal. No se encontraron precedentes de este efecto en otros carbamatos. Probablemente el LQM 996 induce fenómenos de hiperovulación que incrementan directamente el número de embriones implantados y en consecuencia, el número de crías nacidas. Algunas hormonas son utilizadas como inductores de la ovulación para corregir problemas de fertilidad, sin embargo, otras sustancias no hormonales como la micotoxina zaeralenona inducen hiperovulación severa alterando la fisiología del ovario y en consecuencia la fertilidad de las hembras, en este contexto, el efecto observado el LQM 996 resulta interesante y debe ser confirmado y estudiado para ampliar sus perspectivas de uso, así como para abundar en los mecanismos de acción.

Por otra parte, se evaluó la toxicidad de los carbamatos sobre algunos parámetros reproductivos en las ratas macho. Los resultados de la evaluación espermática mostraron una disminución significativa de la motilidad espermática y del peso de los testículos de los machos expuestos a las tres dosis del carbamato LQM 919. Por su parte, el LQM 996 sólo produjo la disminución del peso de las glándulas accesorias (vesícula seminal y próstata). Rybakova (1966), administrando dosis de 14 a 70 mg/kg/día de carbaryl por 12 meses a ratas blancas observó una disminución de la motilidad espermática a partir de los 6 meses de administración. En otro estudio, Vashakidze (1975), administró carbaryl por vía oral en dosis de 5 a 15 mg/kg/día y observó la disminución de la motilidad y la longevidad espermática.

Se ha reportado la afectación del peso de los órganos reproductivos de ratas macho expuestas a otros carbamatos. Vashakidze (1970), administró 0.3 a 10 mg/kg/día de carbaryl y observó una reducción del peso de los testículos de los machos expuestos con evidencia histológica de daño a las espermátides y las espermatogonias. Con base en esta última observación, la disminución de la calidad espermática de los machos expuestos principalmente al LQM 919 puede ser debida

a un daño directo producido por este carbamato a las células del testículo, lo cual también podría explicar su menor peso.

Los carbamatos evaluados fueron administrados en el agua de consumo diario por lo que además de evaluarse los signos reproductivos se midió también el consumo de agua. En general, el carbamato LQM 919 disminuyó el consumo de agua tanto en hembras como machos a los cuales les fue administrado este carbamato. Esta disminución se observó en las tres etapas que duró el experimento: pre-apareamiento, apareamiento y pos-apareamiento. Por su parte el carbamato LQM 996 sólo disminuyó el consumo de agua en machos antes del apareamiento y en la pareja durante el apareamiento no siendo así en la etapa pos-apareamiento. En un estudio previo, Prado-Ochoa et al. (2014b), observaron también la disminución en el consumo de agua de las ratas a las que se les administró el carbamato en el agua de bebida. Estas observaciones indican que posiblemente la palatabilidad de los carbamatos evaluados es diferente entre sí, mientras que el LQM 919 inhibió en cierto grado la ingesta de agua durante todo el experimento, el LQM 996 aparentemente fue mejor tolerado. El efecto sobre el consumo de agua de los carbamatos posiblemente no sea relevante para su uso puesto que la vía de administración propuesta es la vía cutánea, por el contrario, tal vez resulte benéfica una mala palatabilidad del compuesto.

El consumo de alimento y la ganancia de peso se midieron en cuatro etapas que fueron pre-apareamiento, apareamiento, gestación y lactancia en hembras y pos-apareamiento en los machos con la finalidad de evaluar el comportamiento y bienestar de los animales. En la etapa de apareamiento, la dosis de 25 mg/kg del LQM 919 disminuyó el consumo de alimento en las parejas, posteriormente también se vio disminuido el consumo de las hembras expuestas a esta dosis en la etapa de gestación y lactancia. Esta dosis también produjo la disminución del 50% de la fertilidad de las hembras, por lo que es posible que el menor consumo de alimento observado en este grupo fuese debido a que la mitad de las hembras no quedaron



gestantes. Por su parte, el LQM 996 disminuyó el consumo de alimento en la etapa de apareamiento, sin embargo y contrario a lo observado con el otro carbamato, en la etapa de gestación y lactancia el consumo de alimento aumento de manera significativa. Esta observación coincide con el hecho de que en este grupo de hembras la misma dosis del carbamato aumentó significativamente el número de crías vivas. Ambas observaciones sugieren un efecto positivo del carbamato sobre la condición de las hembras gestantes, una posibilidad, es que estimule el apetito y el mayor consumo de alimento en consecuencia, mejore su prolificidad.

La raquisquisis es una de las más graves alteraciones en el desarrollo fetal del tubo neural. se caracteriza por una hendidura amplia del raquis generalmente asociada a anencefalia y que deja al descubierto a la médula espinal, la cual habitualmente no se encuentra bien formada. Esta malformación se debe a que los pliegues neurales no se unen, ya sea por una inducción defectuosa por parte de la notocorda o por la acción de agentes teratogénicos sobre las células neuroepiteliales. La raquisquisis, al igual que la anencefalia, no es compatible con la vida (Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, 2005). En este estudio se observó que los carbamatos LQM 919 y LQM 996 indujeron raquisquisis en el 1.1 y 5.8% respectivamente de las crías de hembras tratadas con cada carbamato. En algunos estudios hechos con otros carbamatos se han reportado malformaciones a nivel del desarrollo de la columna vertebral y el sistema nervioso, por ejemplo, Mathur y Bhatnagar (1991), reportaron la ocurrencia de columnas vertebrales parcialmente osificadas en el 72% de los fetos expuestos a 100 mg/kg de carbaryl. Por otro lado, Nishimura y Kuginuki (1958), reportaron la ocurrencia de malformaciones esqueléticas (colas cortas, malformaciones en la nuca y protrusión craneal) en el 7.1% de las crías de ratonas expuestas a 1500 mg/kg del carbamato uretano por vía peritoneal por periodos de entre 9 y 16 días. Reportes de otros carbamatos como el uretano, benomyl y carbaryl administrados en diversos modelos experimentales (ratas, hamsters, perros y embriones de *Xenopus laevis*) mostraron efectos teratogénicos como: paladar hendido, polidactilia, daño axio-

esquelético, tronco flexionado, hernia umbilical y disminución de nacidos vivos (Takaori et al., 1966; Smalley et al., 1969; Nomura, 1977; Kang et al., 2010). Ninguno de estos defectos del desarrollo fueron observados en este estudio. La aparición de morfoanomalías en fetos expuestos a los diferentes carbamatos mencionados incluyendo a los evaluados en este estudio, indican que estos son capaces de llegar a los fetos e interrumpir su desarrollo. En particular, los carbamatos LQM 919 y LQM 996 probablemente afecten al desarrollo de los pliegues neurales de la notocorda en desarrollo, sin embargo, son necesarios más estudios específicos para conocer a que nivel de la diferenciación y desarrollo los carbamatos pudieran ejercer un efecto específico.

Aunque la teratogenicidad es un efecto indeseable para cualquier sustancia utilizada en la terapéutica, el costo-beneficio de muchos fármacos con efectos teratogénicos utilizados actualmente en medicina y en veterinaria, hace justificable su utilización. Fármacos comúnmente utilizados tales como: albendazol (Delatour, 1983), diclofenaco, captopril, isotreianina y metrotexate (Prasad et al. 2014), han sido reportados con efectos teratogénicos. Para que sea posible utilizar estos fármacos es imprescindible, conocer a fondo sus efectos sobre el desarrollo embrionario y fetal a fin de utilizarlos estratégica e inteligentemente. Por ejemplo, el albendazol es un carbamato con actividad nematodocida ampliamente utilizado en medicina y veterinaria para el control de parasitosis gastrointestinales. En México es la molécula más utilizada en los programas oficiales de control parasitario en el sector salud y cada año se desparasitan millones de niños en el país. Desde hace muchos años se sabe que el albendazol es teratogénico y sobre todo produce malformaciones fetales en los pequeños rumiantes, la terata más común es la excencefalia. En este estudio, se encontró un efecto teratogénico en los dos carbamatos evaluados, manifestado principalmente por alteración en el desarrollo del sistema nervioso central.

La dosis a la cual se encontró este efecto fue la de 12.5 mg/kg por vía oral, sin embargo, esto no fue detectado en las dosis más altas. La dosis y la vía de administración (oral) que se emplearon para los carbamatos en el modelo experimental (rata) no son los que se proponen para la utilización de los carbamatos en bovinos (cutánea). Con base en las concentraciones eficaces *in vitro* (0.68 mg/mL para el LQM 919 y 0.27 mg/mL para el LQM 996) reportadas por Prado-Ochoa et al. (2013) y las concentraciones en ensayos *in vivo* realizados por Iturbe-Requena (2014), se proponen para los carbamatos evaluados dosis de 5.6 mg/kg para el LQM 919 y de 4.6 mg/kg para el LQM 996 por vía cutánea en baños de aspersión, ambas dosis están más de dos veces por debajo de la dosis a la cual se observaron los efectos teratogénicos. Para que un bovino adulto (promedio de 500 kg) esté expuesto a una dosis oral de 12.5 mg/kg, tendría que ingerir 8.9 litros de la solución de baño para el carbamato LQM 919 y 10.6 litros de la solución de baño para el carbamato LQM 996. Por lo tanto, la cantidad de carbamato que los animales pudieran ingerir por acicalamiento es mínima y el riesgo puede considerarse bajo.

Faltan estudios adicionales para determinar por completo la toxicidad reproductiva y genotóxica de estos carbamatos y que confirmen el efecto teratogénico de los carbamatos evaluados, además de que establezcan las dosis mínimas a las cuales se presenta este efecto. Por otro lado, existen otros modelos en células eucariontas (*Saccharomyces cerevisiae*) células de mamífero, células de cebolla, etc.) para evaluar la mutagenicidad, las cuales deben ser utilizadas para confirmar la ausencia de potencial mutagénico de los carbamatos. Los resultados de este estudio y los ya existentes asociados a la toxicidad aumentan la información disponible sobre los carbamatos LQM 919 y LQM 996 para poder ser empleados en el futuro como posibles alternativas para el control de infestaciones por garrapatas en el ganado.

# Conclusiones

---

- Los carbamatos evaluados o sus metabolitos generados por activación metabólica no mostraron efecto mutagénico en cepas de *S. typhimurium* en la prueba de Ames.
- Los carbamatos LQM 996 y LQM 919 indujeron raquisquisis en el 6.3% y 1.2 % respectivamente de las crías expuestas a la dosis de 12.5 mg/kg de los mismos en la etapa gestacional.
- El carbamato LQM 919 redujo el número de hembras gestantes y el número de crías vivas en las hembras expuestas con 25 mg/kg.
- Ambos carbamatos generaron pérdida pre-natal y pos-natal de crías, el carbamato LQM 996 en la dosis de 25-50mg/kg y el carbamato LQM 919 en todas las dosis.
- El carbamato LQM 996 disminuyó el peso de las vesículas seminales y próstata de las ratas machos expuestas.
- En los machos expuestos al carbamato LQM 919, disminuyó la motilidad espermática además de que disminuyó el peso de los testículos.
- En ambos carbamatos, la menor dosis a la que se presentó la teratogénesis y las alteraciones reproductivas (12.5 mg/kg) es dos veces mayor que las dosis propuestas para su utilización en bovinos, adicionalmente, la vía de administración cutánea propuesta, sugiere un menor riesgo de exposición a la dosis teratogénica observada.

## Referencias

---

Abass, K., Reponen, P., Mattila, S., & Pelkonen, O. (2009). Metabolism of carbosulfan. I. Species differences in the *in vitro* biotransformation by mammalian hepatic microsomes including human. *Chemico-biological interactions*, 181(2), 210-219.

Abass, K., Reponen, P., Mattila, S., & Pelkonen, O. (2010). 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*, 185(3), 163-173.

Aguilar-Tipacamú, G., Miller, R. J., Hernández-Ortiz, R., Rodríguez-Vivas, R. I., Vásquez-Peláez, C., García-Vázquez, Z., ... & Rosario-Cruz, R. (2008). Inheritance of pyrethroid resistance and a sodium channel gene mutation in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Parasitology research*, 103(3), 633-639.

Aguirre E J, V M Santamaría (1996). Purificación y caracterización toxicológica de garrapatas *B. microplus* resistentes a ixodicidas organofosforados y organoclorados. Memorias de IV Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria. 4 al 5 de octubre Cd. Victoria, Tamaulipas, México. Pp. 4.

Alcántar-Rodríguez (2015). Evaluación de la criosupervivencia y la fluidez de la membrana de espermatozoides de perro enfriados a 5°C previos a la congelación [Tesis de Maestría]. México: UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Allen, N., Anderson, L. M., Beland, F. A., Bénichou, J., Beral, V., Bloomfield, K., ... Russell, D. (2010). Alcohol consumption and ethyl carbamate. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 96, 1-1379.

- Alonso-Díaz, M. A., Rodríguez-Vivas, R. I., Fragoso-Sánchez, H., & Rosario-Cruz, R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Archivos de medicina veterinaria*, 38(2), 105-113.
- Ames, B. N. (1971). The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In *Chemical mutagens* (pp. 267-282). Springer US.
- Ames, B. N., McCann, J., & Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(6), 347-363.
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of ticks. *Infectious disease clinics of North America*, 22(2), 195-215.
- Angeles, E., Martínez, P., Keller, J., Martínez, R., Rubio, M., Ramírez, G., Castillo, R., López-Castañares, R., Jiménez, E. (2000). Ethyl and methylphenylcarbamates as antihelmintic agents: theoretical study for predicting their biological activity by PM3. *J. Mol. Struct: THEOCHEM* 504, 141-170.
- Arencibia, D. F., Vidal, A., Rosario, L.A., & Delgado, L. (2010). Comparison of the response of Sprague Dawley rats against cyclophosphamide and bleomycin in the sperm head morphology assay. *ARS Pharmaceutica*, 51(3), 155-162.
- Baffi, M.A., de Souza, G.R., de Sousa, C.S., Ceron, C.R., Bonetti, A.M. (2008). Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae). *Molecular and Biochemical Parasitology*. 160(1):70-73.

Barnes, T.B., Verlangieri, A. J., & Wilson, M.C. (1983). Reproductive toxicity of methyl-1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazole carbamate (benomyl) in male Wistar rats. *Toxicology*, 28(1-2), 103-115.

Bernabe-Pérez, A.G. (2007). Evaluación antiparasitaria de nueve principios de síntesis derivados del ácido carbámico utilizando como modelo el cestodo *Hymenolepis nana* var. *fraterna* en ratones de la cepa CD1 con infestación inducida. Tesis de Licenciatura. UNAM, México.

Bernal, S. (2000). Evaluación de algunos productos derivados del ácido carbámico como agentes antimicrobianos. Tesis de Licenciatura. UNAM, México.

Botana, L., Landoni, F., & Jiménez, T. (2002). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. 1ª Edición, Editorial McGraw-Hill.

Brent, R. L., & Beckman, D. A. (1990). Environmental teratogens. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 66(2), 123.

Buczek, A., Bartosik, K. (2006). Tick-host interactions. *Przeglad Epidemiologiczny*. 1:28-33.

Carter, S.D., Hein, J.F., Rehnberg, G.L. and Laskey, J.W. (1984). Effect of benomyl on the reproductive development of male rats. *J. Toxicol Environ. Health*, 13, 53-68

Castellanos, J. (1998). Seguimiento a predios con garrapatas resistentes hacia los ixodicidas y alternativas para su control. Curso de diagnóstico y control de las principales enfermedades parasitarias. Ciudad Victoria, Tamaulipas, México.

Castro, J. J. (1997). Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Veterinary parasitology*, 71(2), 77-97.

Collins, T.F.X., Hansen, W.H. and Keeler, H.V. (1971). The effect of carbaryl (Sevin) on reproduction of the rat and gerbil. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 19,202-216.

Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E., & Zeiger, E. (1987). Guide for the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 189(2), 83-91.

Coyle, I., Wayner, M. J., & Singer, G. (1976). Behavioral teratogenesis: A critical evaluation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 4(2), 191-200.

De la Fuente, J., Almazán, C., Canales, M., de la Lastra, J. M. P., Kocan, K. M., & Willadsen, P. (2007). A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews*, 8(01), 23-28.

Delatour, P. (1983). Some aspects of the teratogenicity of veterinary drugs. *Veterinary research communications*, 7(1), 125-131

Subsecretaría de Prevención y promoción de la Salud. (2005). Manual de Procedimientos para la Vigilancia Epidemiológica de los Defectos del Tubo Neural.

Ecobichon, D. J. (1997). The basis of toxicity testing. CRC press. Ferm VH &

Espinosa (1980). Principios de mutagénesis y su relación con carcinogénesis y teratogénesis. En: Instituto de Investigaciones Biomédicas. Manual de métodos para la identificación de mutágenos y carcinogénicos.

Ferm VH & Hanover NH (1966). Severe developmental malformations. Malformations induced by urethane and hydroxyurea in the hamster. *arch.pathol*, 81: 174–177.



Foil, L.D., Coleman, P., Eisler, M., Fragoso-Sanchez, H., Garcia-Vazquez, Z., Guerrero, F.D., Jonsson, N.N., Langstaff, I.G., Li, A.Y., Machila, N., Miller, R.J., Morton, J., Pruett, J.H., Torr, S. (2004). Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. *Vet. Parasitol.* 125, 163-181.

García, A. M., Benavides, F. G., Fletcher, T., & Orts, E. (1998). Paternal exposure to pesticides and congenital malformations. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 473-480.

George, J. E., Pound, J. M., & Davey, R. B. (2004). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 129(S1), S353-S366

Giri, S., Sharma, G. D., Giri, A., & Prasad, S. B. (2002). Genotoxic Effects of Malathion in Chick *in Vivo* Micronucleus Assay. *Cytologia*, 67(1), 53-59.

Gómez-Meda, B. C., Zúñiga-González, G. M., Zamora-Perez, A., Ramos-Ibarra, M., Batista-González, C. M., & Torres-Mendoza, B. M. (2004). Folate supplementation of cyclophosphamide-treated mothers diminishes micronucleated erythrocytes in peripheral blood of newborn rats. *Environmental and molecular mutagenesis*, 44(2), 174-178.

Gupta, R. C. (Ed.). (2011). *Toxicology of organophosphate & carbamate compounds*. Academic Press.

Gutiérrez-Amézquita (2012). *Evaluación histológicos en diferentes órganos de ratas tratadas con carbamatos de nueva síntesis [Tesis de Licenciatura]*. México: UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Hanover NH (1966). Severe developmental malformations. Malformations induced by urethane and hydroxyurea in the hamster. *arch.pathol*, 81: 174–177.

Hart, E.R. (1971). Teratology Study. Sevin®, Vitamin A, aspirin and malathion. Unpublished report from Bionetics Research Laboratories to Union Carbide Corporation, (cited in Cranmer, 1986) 71

Hodgson, E., & Rose, R. L. (2005). Human metabolism and metabolic interactions of deployment-related chemicals. *Drug metabolism reviews*, 37(1), 1-39.

Iturbe-Requena (2014). Evaluación de la eficacia in vivo de dos carbamatos de nueva síntesis sobre *Rhipicephalus microplus* [Tesis de Maestría]. México: UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Joffe, M. 1992. Epidemiology of occupational reproductive hazards: methodological aspects. *Rev. Epidemiol. et Santé. Publ.*, 40: S17-S25.

Johsson, N. N., Matschoss, A. L., Pepper, P., Green, P. E., & Ansell, J. (2000). Resistance of Holstein–Friesian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Veterinary Parasitology*, 89(4), 297-305.

Kaaya, G. P., & Hassan, S. (2000). Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental & applied acarology*, 24(12), 913-926.

Kalter, H. (1971). Correlation between teratogenic and mutagenic effects of chemicals in mammals. In *Chemical mutagens* (pp. 57-82). Springer US.

Kang, H. S., Park, C. J., & Gye, M. C. (2010). Effect of carbaryl on survival and development in *Bombina orientalis* (Boulenger) embryos. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 84(5), 550-553.

Karami-Mohajeri, S., & Abdollahi, M. (2010). Toxic effects of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A comprehensive review. *Human & experimental toxicology*, 0960327110388959.

Liman, R., Akyil, D., Eren, Y., & Konuk, M. (2010). Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium* test. *Chemosphere*, 80(9), 1056-1061.

Maron, D. M., & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3-4), 173-215.

Mathur, A., & Bhatnagar, P. (1991). A teratogenic study of carbaryl in Swiss albino mice. *Food and Chemical Toxicology*, 29(9), 629-632.

Mexicana, N. O. NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. *Diario oficial de la federación*, 7.

Miller, R.J., Li, A.Y., Tijerina, M., Davey, R.B., George, J.E. 2008. Differential response to diazinon and coumaphos in a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected in Mexico. *Journal of Medical Entomology*. 45:905-911.

Moreno, A. J., Serafim, T. L., Oliveira, P. J., & Madeira, V. M. (2007). Inhibition of mitochondrial bioenergetics by carbaryl is only evident for higher concentrations—relevance for carbaryl toxicity mechanisms. *Chemosphere*, 66(3), 404-411. Maron, D. M. y B. N. Ames, 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 11: 173-215.

Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1), 29-60.

Nishimura, H., & Kuginuki, M. (1958). Congenital malformations induced by ethyl-urethan in mouse embryos. *Okajimas folia anatomica Japonica*, 31(1), 1-10\_2.

Nomura T (1974). An analysis of the changing urethan response of the developing mouse embryo in relation to mortality, malformation, and neoplasm. *Cancer Research* 34: 2217–2231.

Nomura T (1977). Similarity of the mechanism of chemical carcinogen-initiated teratogenesis and carcinogenesis in mice. *Cancer Research* 37: 969–973.

Ordaz-Pichardo, C., Shibayama, M., Villa-Trevino, S., Arriaga-Alba, M., Angeles, E., & De La Garza, M. (2005). Antiamoebic and toxicity studies of a carbamic acid derivative and its therapeutic effect in a hamster model of hepatic amoebiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(3), 1160-1168.

Organisation for Economic Co-operation and Development. (1995). Test No. 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing.

Organisation for Economic Co-operation and Development. (1997). Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing.

Organisation for Economic Co-operation and Development. (2002). Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing.

Ortiz E M, V M Santamaría, N A Ortiz, C N Soberanes, M J Osorio, B R Franco, I F Martínez, D R Quezada, S H Fragoso. (1995). Caracterización de la resistencia de *Boophilus microplus* a ixodicidas en México. *Memorias de IV Seminario Internacional de Parasitología Animal, Resistencia y Control en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria*. Acapulco, Guerrero, México. Pp. 58-66.

Ozden, S., Catalgol, B., Gezginci-Oktayoglu, S., Arda-Pirincci, P., Bolkent, S., & Alpertunga, B. (2009). Methiocarb-induced oxidative damage following subacute exposure and the protective effects of vitamin E and taurine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7), 1676-1684.

Perez-Cogollo, L. C., Rodriguez-Vivas, R. I., Ramirez-Cruz, G. T., & Miller, R. J. (2010). First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Veterinary parasitology*, 168(1), 165-169

Pérez-González, I.E., Prado-Ochoa, M.G., Muñoz-Guzmán, M.A., Vázquez-Valadez, V.H., Velázquez-Sánchez, A.M., Avila-Suárez, B.L., Cuenca-Verde, C., Angeles, E., Alba-Hurtado, F. (2014). Effect of new ethyl and methyl carbamates on *Rhipicephalus microplus* larvae and adult ticks resistant to conventional ixodicides. *Veterinary Parasitology*, 199, 235-241.

Pope, C., Karanth, S., & Liu, J. (2005). Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(3), 433-446.

Prado-Ochoa, M.G., Muñoz-Guzmán, M.A., Abrego-Reyes, V.H., Velázquez-Sánchez, A.M., Lara-Rocha, M., Cuenca-Verde, C., Angeles, E., Alba-Hurtado, F. (2013). Effect of new ethyl and methyl carbamates on biological parameters and reproduction of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 194, 49-57.

Prado-Ochoa, M.G., Ramírez-Noguera, P., Díaz-Torres, R., Garrido-Fariña, G.I., Vázquez-Valadez, V.H., Velázquez-Sánchez, A.M., Muñoz-Guzmán, M.A., Angeles, E., Alba-Hurtado, F. (2014). The action of two ethyl carbamates on acetylcholinesterase and reproductive organs of *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 199, 215-224.

Prado-Ochoa, M. G., Gutiérrez-Amezquita, R. A., Abrego-Reyes, V. H., Velázquez-Sánchez, A. M., Muñoz-Guzmán, M. A., Ramírez-Noguera, P., ... & Alba-Hurtado, F. (2014a). Assessment of acute oral and dermal toxicity of 2 ethyl-carbamates with activity against *Rhipicephalus microplus* in rats. *BioMed research international*, 2014.

Prado-Ochoa, M. G., Abrego-Reyes, V. H., Velázquez-Sánchez, A. M., Muñoz-Guzmán, M. A., Ramírez-Noguera, P., Angeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2014b). Subchronic toxicity study in rats of two new ethyl-carbamates with ixodidical activity. *BioMed research international*, 2014.

Prado-Ochoa, M. G., Muñoz-Guzmán, M. A., Vázquez-Valadez, V. H., Velázquez-Sánchez, A. M., Salazar, A. M., Ramírez-Noguera, P., ... & Alba-Hurtado, F. (2016). Genotoxicity and cytotoxicity assessment of new ethyl-carbamates with ixodidical activity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 807, 8-14.

Prasad J, Kalyani D, Prakash G. (2014). Teratogenicity: a mechanism based short review on common teratogenic agents. *Asian Pac Journal Tropical Disease* 2014; 4(6): 421-432.

Preston, R. j. y Hoffman, G. R. (2009), *Genetic Toxicology*, en Casarett and Doull's, *The basic science of poisons*, 7<sup>th</sup> edition. McGraw-Hill, pp. 381-414.

Quiroz Romero, H., & Romero, H. Q. (1984). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*.

Reyes-González, R. (2007). Evaluación de la actividad antibiótica del compuesto LQM 996 en *Meriones unguiculatus* infectado con *Helicobacter pylori* [Tesis de Licenciatura]. México: UNAM.

Rosario-Cruz, R., Almazan, C., Miller, R.J., Domínguez-García, D.I., Hernández-Ortiz, R., de la Fuente, J. (2009). Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Frontiers in Bioscience*. 14:2657-2665.

Rosario-Cruz, R., Guerrero, F.D., Miller, R.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Domínguez-García, D.I., Cornel, A.J., Hernández-Ortiz, R., George, J.E. (2005). Roles played by esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in populations of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from Yucatan, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, 42, 1020- 1025

Rosenkranz, H.S., Gutter, B., & Speck, W.T. (1976). Mutagenicity and DNA-modifying activity: a comparison of two microbial assays. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 41(1), 61-70.

Rull, R.P., Ritz, B., & Shaw, G.M. (2006). Neural tube defects and maternal residential proximity to agricultural pesticide applications. *American journal of epidemiology*, 163(8), 743-753.

Rybakova, M.N. (1966). Toxic effects of Sevin on animals. *Hyg. Sanit (USSR)*, 31, 402-407

Schmid, B.P. (1985). Teratogenicity testing of new drugs with the postimplantation embryo culture system. *Concepts in Toxicology*, 3, 46-57.

Schmid, B., & Bechter, R. (1996). Use of Whole Embryo Cultures in *In Vitro* Teratogenicity Testing. *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, 353.

Sinclair, J.G. (1950). A specific transplacental effect of urethane in mice. *Texas reports on biology and medicine*, 8(4), 623-632.

Smalley, H.E., Curtis, J.M. and Ear, F.L. (1968). Teratogenic action of carbaryl in Beagle dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 13, 392-403.

Soberanes-Céspedes, N., Rosario Cruz, C., Garcia Vazquez, Z. (2005). Variabilidad en la actividad general de esterasas de la garrapata *Boophilus microplus* y su relación con la resistencia a organofosforados. *Técnica Pecuaria en México* 43, 239-246.

Takaori, S., Tanabe, K., Shimamoto, K. (1966). Developmental abnormalities of skeletal system induced by ethylurethan in the rat. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 16, 63-73.

Temeyer, K.B., Pruett, J.H., Olafson, P.U., & Chen, A.C. (2007). R86Q, a mutation in BmAChE3 yielding a *Rhipicephalus microplus* organophosphate-

insensitive acetylcholinesterase. *Journal of Medical Entomology*, 44(6), 1013-1018.

Trosko, J.E., & Chang, C.C. (1978). Relationship between mutagenesis and carcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*, 28(2), 157-168.

Vashakidze, V.I. (1970) The influence of Granosan and Sevin on the generative function of the organism and its progeny under experimental conditions. Tbilisi State Medical Institute.

Vashakidze, V.I. (1975). Effect of small doses of Sevin® (NMC) on gonad function following its repeated effect on white rats. *Sb Tr Nil Gisieny Trida i Profzabolevanii. GruzSSR*, 14, 253-266.

Vázquez-Sánchez (2009). Efecto de la Spirulina máxima contra la teratogenicidad y genotoxicidad producidas por la hidroxiurea [Tesis de doctorado]. México: Instituto Politécnico Nacional.

Weil, C.S. and Carpenter, C.P. (1965). Results of a three generation reproduction study on rats fed Sevin® in their diets. Mellon Institute Report No. 28-53.

Williams, L.R., & Preston, J.E. (1983). Interim procedures for conducting the *Salmonella*/microsomal mutagenicity assay (Ames test). US Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring Systems Laboratory.

Wilson, J. G. (1973). Mechanisms of teratogenesis. *American Journal of Anatomy*, 136(2), 129-131.

Wilson, J. G. (1977). Current status of teratology. In *General Principles and Etiology* (pp. 47-74). Springer US.