



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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**EVALUACIÓN DE LA NEUROTOXICIDAD DE NUEVOS
CARBAMATOS IXODICIDAS Y SU EFECTO ELECTROFISIOLÓGICO
EN UN MODELO MURINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ARIADNA GABRIELA MARTÍNEZ GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. MARÍA GUADALUPE PRADO OCHOA (FES-Cuautitlán, UNAM)

COMITÉ TUTORAL:

DRA. YAZMÍN ALCALÁ CANTO (FMVZ, UNAM)
DR. ROBERTO DÍAZ TORRES (FES-Cuautitlán, UNAM)



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.

DEDICATORIA

A mi amada familia, cuyo amor y apoyo han sido mi mayor fortaleza a lo largo de este viaje académico. A mis queridos papás Luis y Lucía, quienes desde el inicio creyeron en mí y me han guiado con sabiduría y paciencia. Sus sacrificios y constante aliento han sido el motor que me impulsó a alcanzar mis metas. A mi hermanito Francis, mi compañera incondicional y la mejor hermana del mundo, cuyo amor y complicidad han iluminado cada día. A Mayu por su siempre valioso cariño y a Cagua, por su infinito apoyo y motivación que me llevó a levantarme en los momentos difíciles.

A mis queridos tíos Paty, Ángel, Silvia y América, quienes no solo me brindaron su apoyo incondicional, sino que también compartieron su sabiduría y experiencia, guiándome en cada paso del camino.

A Paco García, cuyo generoso apoyo y consejos fueron una luz en mi camino. Siempre estaré agradecida por su escucha atenta, sus consejos sabios y su ayuda desinteresada.

A mi perrita Padme y a mi gatita Negra que fueron, quienes con su amor incondicional y compañía han iluminado mis días y me dieron la fuerza para seguir adelante en cada momento.

Ustedes fueron más que familia; fueron mis pilares y mi red de seguridad en momentos de incertidumbre. Cada uno de ustedes ha dejado una huella indeleble en mi corazón y en este trabajo. Este logro es también suyo, porque sin su amor, comprensión y aliento constante, no habría llegado tan lejos. Gracias por estar siempre a mi lado, por celebrar mis triunfos y por ser mi luz en los momentos oscuros. Les amo profundamente y les dedico con todo mi cariño este logro que compartimos juntos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todos los Doctores que contribuyeron al desarrollo y culminación de esta tesis. En primer lugar, quiero agradecer a la Doctora Guadalupe Prado, mi tutora principal, por su incansable apoyo, orientación y paciencia a lo largo de todo este proceso. No solo fue una guía académica, sino también una fuente constante de motivación y aliento. Su compromiso con mi formación académica y profesional ha sido invaluable, y siempre estaré en deuda con ella por todas las horas dedicadas a revisar mi trabajo, a escucharme en mis momentos de desesperación y por todo el apoyo brindado para enriquecer mi formación.

También deseo expresar mi gratitud a los miembros de mi comité tutor, la Doctora Yazmín Alcalá y al Doctor Roberto Díaz, por sus valiosas contribuciones, críticas constructivas y sugerencias que enriquecieron significativamente este trabajo. Su experiencia y conocimiento han sido un recurso invaluable y sus comentarios han mejorado la calidad y profundidad de mi investigación.

Agradezco asimismo a los miembros de mi jurado, el Doctor Enrique Ángeles, la Doctora Rosa Higuera y a la Doctora Patricia Ramírez, por tomarse el tiempo de revisar esta tesis y por sus observaciones perspicaces y detalladas. Su compromiso con la excelencia académica y su atención minuciosa a los detalles han sido esenciales para la culminación exitosa de este proyecto.

Al Maestro Crisóforo Márquez, encargado del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Su apoyo constante y su dedicación en el manejo de las ratas para mi proyecto fueron cruciales. Su experiencia, sentido del humor y disposición para ayudar en todo momento facilitaron enormemente mi investigación, y su colaboración fue invaluable para el desarrollo de este trabajo.

A Kevin, mi compañero y mi fuente constante de apoyo y amor. Llegaste a mi vida en un momento de dificultades brindándome comprensión, paciencia y motivación. Gracias por estar acompañarme, escucharme y por alentarme a perseguir mis sueños sin juzgarme.

A mis mejores amigos, Paola, Daniel, Abraham, Paco, Lorena, Joseph, Edgar, Lalo y Diego cuyo cariño y apoyo han sido invaluable a lo largo de este viaje. Gracias por acompañarme en cada paso, por escucharme siempre y por brindarme su amistad incondicional. Su presencia constante y su aliento han sido fundamentales para superar los momentos difíciles y celebrar los logros.

A mis compañeros de laboratorio, a Sam, por su apoyo y compañerismo durante la realización de este proyecto; a Adolfo, por su constante y grata compañía a lo largo de todo el proceso experimental; a Rafa por su amistad y su bondad. Con especial mención a César Cuenca, cuya excelencia como técnico y ser humano ha sido fundamental para el funcionamiento del laboratorio 1, le agradezco profundamente por sus invaluable conocimientos, su apoyo con el material y equipo, así como por su siempre dispuesta y atenta escucha.

A Carlos Alejandro, por su invaluable apoyo y paciencia durante el desarrollo de esta tesis. Gracias por todas las veces que me escuchaste y me brindaste consuelo. Tu paciencia y comprensión en los momentos más difíciles fueron fundamentales para mí por lo que siempre apreciaré todo lo que hiciste por mí durante este proceso.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo otorgado durante mis estudios de maestría.

Este estudio fue financiado por los proyectos PAPIIT/UNAM IN-211222, IN-215324 PIAPI CI2257, CI2417 y Comecyt EDOMEX-F1CDTEM-2022.

A todos ustedes, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	7
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN.....	13
MARCO TEÓRICO.....	14
<i>Riphicephalus microplus</i>	14
Generalidades	14
Control.....	15
Resistencia de <i>R. microplus</i>	17
Etil-carbamatos	19
Generalidades	19
Efectos en <i>R. microplus</i>	19
Antecedentes de toxicidad.....	20
Estudios de toxicidad oral y dérmica aguda.....	20
Estudios de genotoxicidad	21
Estudios de ecotoxicidad.....	21
Neurotoxicidad	22
Definición.....	22
Neurotoxicidad de carbamatos.....	23
Sistema nervioso periférico.....	23
Definición.....	23

Clasificación del sistema nervioso periférico.....	24
Motoneuronas	24
Unión neuromuscular	26
Neurotransmisores.....	26
Acetilcolina	26
Receptor de acetilcolina.....	27
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO GENERAL.....	32
OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
MATERIAL Y MÉTODOS	33
Lugar de estudio	33
Compuestos utilizados.....	33
Animales	34
Diseño experimental	34
Metodología	37
Obtención de AChE.....	37
Cinética de AChE <i>in vitro</i>	38
Cinética de inhibición de AChE	38
Inhibición de actividad de AChE <i>in vivo</i>	40
Estudio electrofisiológico.....	40
Análisis estadístico.....	44
RESULTADOS	44
Cinética de AChE	44
Cinética de inhibición de AChE	46
Porcentajes de reducción de la actividad de AChE	46
Estudio electrofisiológico.....	49

DISCUSIÓN.....	56
CONCLUSIONES.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	66

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<i>Figura 1. Ciclo de vida de Rhipicephalus microplus</i>	<i>15</i>
<i>Figura 2. Corte histológico transversal de un nervio periférico.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 3. Neurona motora con axón mielinizado.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 4. Microscopia electrónica de la unión neuromuscular con una célula muscular esquelética coloreada para denotar las estructuras que lo conforman.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 5. Receptor nicotínico de la ACh.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 6. Modelo de la estructura de una subunidad del receptor de acetilcolina.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 7. Esquema de una sinapsis colinérgica.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 8. Diseño experimental de la primera fase (estudios in vitro).</i>	<i>35</i>
<i>Figura 9. Diseño experimental de la segunda fase (estudios in vivo).</i>	<i>36</i>
<i>Figura 10. Representación de medición de parámetros electrofisiológicos de amplitud y duración en un potencial de acción muscular compuesto obtenido durante el ensayo electrofisiológico.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 11. Representación de medición del parámetro electrofisiológico de latencia en un potencial de acción muscular compuesto obtenido durante el ensayo electrofisiológico.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 12. Representación de medición del parámetro electrofisiológico de área en un potencial de acción muscular compuesto obtenido durante el ensayo electrofisiológico.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 13. Representación de la obtención de los valores de amplitud de pico a pico.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 14. Porcentajes de inhibición de la actividad de la enzima AChE obtenidos mediante ensayos in vitro e in vivo en fantasmas de eritrocitos y cerebro de ratas.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 15. Porcentajes de reducción de actividad de AChE a diferente concentración de inhibidor.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 16. Voltaje empleado en el estimulador durante estudio electrofisiológico.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 17. Potenciales de acción muscular compuesto (cMAP) de los diez estímulos de baja frecuencia</i>	<i>50</i>
<i>Figura 18. cMAP de los diez estímulos de alta frecuencia.....</i>	<i>51</i>

<i>Figura 19. Amplitudes de desvanecimiento tetánico.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 20. Amplitudes de los cMAP obtenidos en el estudio electrofisiológico en ratas expuestas a los carbamatos.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 21. Duración de los cMAP obtenidos en el estudio electrofisiológico en ratas expuestas a los carbamatos.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 22. Latencia de los cMAP obtenidos en el estudio electrofisiológico en ratas expuestas a los carbamatos.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 23. Área bajo la curva de los cMAP obtenidos en el estudio electrofisiológico en ratas expuestas a los carbamatos.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 24. Porcentaje de decremento de amplitud del cMAP durante el desvanecimiento tetánico.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 25. Representación del patrón decremento-incremento del electromiograma obtenido a través de estímulos de desvanecimiento tetánico en rata del grupo control y ratas tratadas con propoxur, LQM 919 y LQM 996.....</i>	<i>55</i>
<i>Tabla 1. Compuestos evaluados.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabla 2. Grupos experimentales.</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 3. Constantes cinéticas de AChE in vitro.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 4. Constantes cinéticas de AChE in vivo.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 5. Constantes cinéticas de inhibición de AChE.....</i>	<i>46</i>

ABREVIATURAS

°C: grados centígrados

A. mellifera: *Apis mellifera*

ACh: acetilcolina

AChE: acetilcolinesterasa

ANOVA: análisis de varianza

BuChE: butirilcolinesterasa

Ca⁺²: calcio

CB: carbamatos

CH1: canal 1

CH2: canal 2

CH3: canal 3

cm: centímetros

cMAP: potencial de acción muscular compuesto

DTNB: ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico

E. foetida: *Eisenia foetida*

EPA: Agencia de Protección Ambiental

g: gravedades

GHS: Sistema Global de Armonización

Hz: hertz

K⁺: potasio

k₂: constante de carbamitación

KCl: cloruro de potasio

k_d: constante de disociación

kg: kilogramos

k_i: constante de reacción bimolecular

k_m: constante de Michaelis-Menten

LQM 919: etil-4-clorofenil carbamato

LQM 996: etil-4-bromofenil carbamato

M: moles
mg: miligramos
min: minutos
ml: mililitros
mm: milímetros
mM: milimolar
Na⁺: sodio
nAChR: receptor nicotínico de acetilcolinesterasa
nm: nanómetros
OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OF: organofosforados
PBS: buffer de fosfatos
pH: potencial de hidrogeniones
R. microplus: *Rhipicephalus microplus*
S: sustrato
SNC: sistema nervioso central
SNP: sistema nervioso periférico
Tris-HCl: Tris-hydroxymethyl aminometano-HCl
V_{max}: velocidad máxima
μl: microlitros

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el potencial neurotóxico de dos etil carbamatos, LQM 919 y LQM 996 con efecto sobre la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Los estudios se realizaron en dos fases. En la primer fase (*in vitro*), a partir de AChE de cerebro y fantasmas de eritrocitos se determinó la cinética de actividad, la cinética de inhibición de actividad y se calcularon los porcentajes de reducción de actividad. En la segunda fase (*in vivo*), las ratas (n=5) fueron tratadas con 2 mg/kg de propoxur o 50 mg/kg de LQM 919 y LQM 996. Se realizó un estudio electrofisiológico estimulando el nervio ciático de las ratas tratadas con los carbamatos a diferentes frecuencias para evaluar la amplitud, latencia, duración y área bajo la curva de los potenciales de acción muscular compuestos (cMAP), se determinó la actividad AChE de cerebro y fantasmas de eritrocitos, se realizó la cinética de inhibición y se determinaron los porcentajes de reducción de actividad. Los etil carbamatos y el propoxur disminuyeron la V_{max} sin afectar la k_m . Los valores de las constantes de inhibición (k_d) fueron menores que los del propoxur, mientras que k_i y k_2 fueron mayores ($p < 0.05$). La actividad de AChE disminuyó en un 80% con propoxur en los eritrocitos, mientras que con los etil carbamatos la reducción fue inferior al 20%. En el cerebro, la disminución fue del 60% con propoxur y también fue inferior al 20% con los etil carbamatos. El estudio electrofisiológico mostró que el LQM 996 aumenta significativamente la amplitud y duración de los potenciales de acción, mientras que el LQM 919 aumenta la latencia. Ambos etil carbamatos afectaron la transmisión neuromuscular de manera diferente, pero con un impacto menor que el propoxur. Además, se observaron cambios en la actividad muscular en las ratas tratadas con carbamatos. Los estudios de neurotoxicidad mostraron que los etil carbamatos son inhibidores débiles y de baja afinidad hacia la AChE en ratas.

ABSTRACT

In this work, the neurotoxic potential of two ethyl carbamates, LQM 919 and LQM 996, was evaluated with effect on the tick *Rhipicephalus microplus*. The studies were conducted in two phases. In the first phase (*in vitro*), activity kinetics, activity inhibition kinetics and activity reduction percentages were determined from brain AChE and erythrocyte phantoms. In the second phase (*in vivo*), rats (n=5) were treated with 2 mg/kg propoxur or 50 mg/kg LQM 919 and LQM 996. An electrophysiological study was performed by stimulating the sciatic nerve of carbamate-treated rats at different frequencies to assess amplitude, latency, duration and area under the curve of compound muscle action potentials (cMAPs), brain AChE activity and erythrocyte phantoms were determined, inhibition kinetics were performed and percentage reductions in activity were determined. Ethyl carbamates and propoxur decreased V_{max} without affecting k_m . The values of inhibition constants (k_d) were lower than those of propoxur, while k_i and k_2 were higher ($p < 0.05$). AChE activity decreased by 80% with propoxur in erythrocytes, whereas with ethyl carbamates the reduction was less than 20%. In the brain, the decrease was 60% with propoxur and less than 20% with ethyl carbamates. In the brain, the decrease was 60% with propoxur and was also less than 20% with the ethyl carbamates. The electrophysiological study showed that LQM 996 significantly increased the amplitude and duration of action potentials, while LQM 919 increased the latency. Both ethyl carbamates affected neuromuscular transmission differently, but with less impact than propoxur. In addition, changes in muscle activity were observed in carbamate-treated rats. Neurotoxicity studies showed that ethyl carbamates are weak and low affinity inhibitors of AChE in rats.

INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* constituye un desafío persistente en la industria ganadera debido a su capacidad como vector de enfermedades como anaplasmosis y babesiosis, además de ocasionar considerables pérdidas económicas mediante la disminución de la producción, daños en la piel del ganado y un aumento en los costos asociados con su control. La resistencia a los acaricidas convencionales ha agravado esta situación, restringiendo las opciones de control y afectando extensas áreas ganaderas, especialmente en regiones tropicales y subtropicales (Prado-Ochoa et al., 2013; Revuelta et al., 2016; Rodríguez-Vivas et al., 2006).

Investigaciones anteriores han evaluado los efectos de los carbamatos, como el etil-4-bromofenil-carbamato (LQM 919) y el etil-4-clorfenil-carbamato (LQM 996), sobre *R. microplus*. Estos compuestos han mostrado interferir significativamente con el ciclo biológico de la garrapata, reduciendo la oviposición y la viabilidad de los huevos en cepas susceptibles y en cepas resistentes a ixodicidas comerciales. Estudios morfológicos revelaron alteraciones en los órganos reproductores y huevos de garrapatas tratadas con estos carbamatos, sugiriendo su efecto diferenciado en la vitelogénesis y viabilidad celular (Escobar-Chavarría et al., 2021; Iturbe-Requena, Prado-Ochoa, Velázquez-Sánchez, et al., 2020; Prado-Ochoa et al., 2013, 2014).

El desarrollo de nuevos fármacos requiere de la evaluación completa de la toxicidad de estos compuestos. Estudios previos han evaluado principalmente la toxicidad aguda y subcrónica, genotoxicidad, citotoxicidad y ecotoxicidad (Iturbe-Requena et al., 2019b; Prado-Ochoa et al., 2016; Prado-Ochoa, Abrego-Reyes, et al., 2014). Sin embargo, la falta de estudios específicos sobre la neurotoxicidad de estos compuestos resalta la necesidad de una investigación más detallada sobre sus posibles efectos en el sistema nervioso.

MARCO TEÓRICO

Rhipicephalus microplus

Generalidades

Rhipicephalus microplus es la garrapata más importante del ganado bovino en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Pérez-González et al., 2014a). Su estudio es de gran importancia, ya que se considera uno de los vectores más importantes para la transmisión de enfermedades en el ganado bovino, tales como, anaplasmosis, babesiosis y espiroquetosis, además de ocasionar un gran impacto económico debido a la disminución de la producción lechera y ganancia de peso, daños a la piel, así como el aumento en el costo del tratamiento para el control de las infestaciones. Además, las interacciones de fauna silvestre y/o nociva con la ganadería, representan un riesgo significativo en la transmisión de enfermedades, generando complicaciones en los intentos de control de parásitos en los animales domésticos (Contreras et al., 2020).

El ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus* es de un solo hospedador (Figura 1). El ciclo se completa en aproximadamente cinco semanas si las condiciones de temperatura y humedad son favorables, y hasta varios meses en condiciones menos favorables. Las hembras pueden ovopositar entre 2,000 a 3,000 huevos que eclosionan en dos semanas a una humedad del 70%. Las larvas anidan en la punta de los pastos y se alimentan alrededor de cuatro días en el hospedador para luego mudar a ninfa aproximadamente 48 horas después. Las ninfas pueden desplazarse en el hospedador antes de adherirse y posteriormente, se alimentan durante una semana hasta que se convierten en garrapatas adultas, las cuales, se aparean en el hospedador. Las hembras tardan de 20 a 23 días en alimentarse hasta saciarse y luego se retiran para ovopositar. Este periodo de oviposición dura alrededor de 10 días (Nicholson et al., 2018).

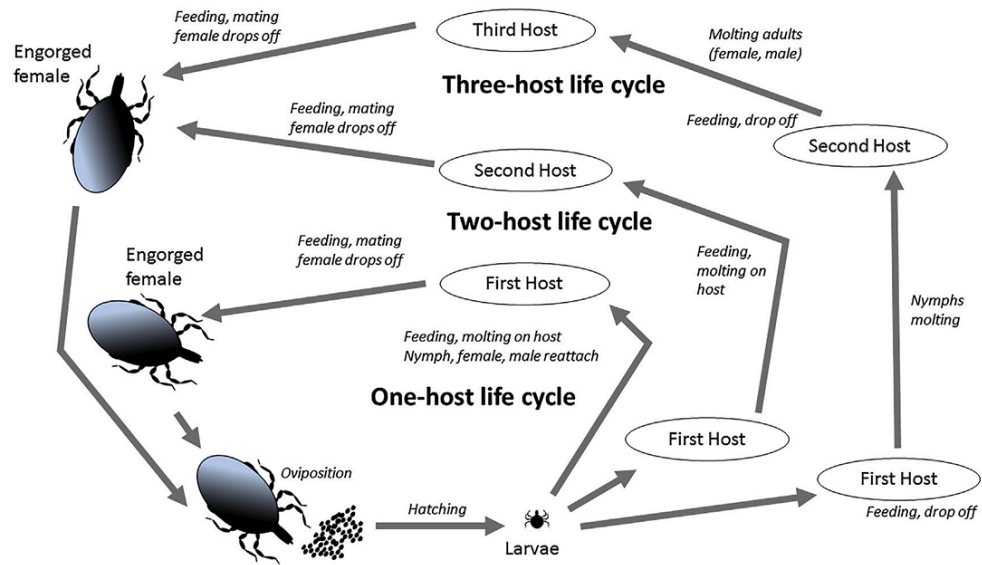


Figura 1. Ciclo de vida de *Rhipicephalus microplus*. En la parte inferior se muestran los estadios de larva, ninfa y adulto, que se adhieren y se desarrollan en un solo hospedador (Nicholson et al., 2018).

R. microplus debe tener una pluviosidad elevada, por lo que no puede encontrarse en zonas secas con una humedad baja. Esta garrapata está muy extendida en los climas más cálidos del mundo. En los trópicos, *R. microplus* se encuentra en el ganado durante todo el año. En las regiones subtropicales, tiene un ciclo estacional (Capinera, 2008).

Control

Existen diversos métodos de control para *R. microplus*. Estos métodos involucran agentes químicos y no químicos.

Dentro de los principales métodos de control no químico de *R. microplus* se encuentran, la selección de hospederos resistentes, introducción de depredadores naturales como algunas especies de aves y hormigas, rotación, descanso y quema de praderas, utilización de plantas forrajeras con capacidad de repeler, atrapar u obstaculizar a las garrapatas que buscan hospedero, así como microorganismos

entomopatógenos, como hongos, bacterias y/o nemátodos. Otros métodos involucran vacunas que contienen el antígeno Bm86 que es una glicoproteína aislada de *R. microplus* que se encuentra predominantemente en las células del intestino de la garrapata (Iván Rodríguez-Vivas et al., 2014). Sin embargo, su eficacia es limitada debido a polimorfismos en el gen codificador de cepas geográficamente distantes por lo que han llegado a tener un efecto nulo en algunos casos (Lagunes, 2023). Cabe mencionar que las producciones lecheras situadas en regiones áridas y semiáridas del mundo representan un sector pequeño en comparación con las zonas tropicales y subtropicales, por lo que la producción, en esos casos sigue requiriendo un control intensivo de las garrapatas con ixodicidas (Avendano-Reyes et al., 2021a).

El control químico de *R. microplus* en el ganado bovino, se basa en el control intensivo con ixodicidas, productos químicos sintéticos pertenecientes a diferentes clases, como piretroides, organofosforados, amidinas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazoles e inhibidores del crecimiento y la aplicación se da a través de diferentes métodos, como aspersión, inmersión, aretes en las orejas y collares ixodicidas, productos pour-on y/o aplicación por inyección (Moraes et al., 2023). La mayoría de los ixodicidas tienen un efecto residual que protege contra la infestación durante varios días después de la aplicación. Este periodo de protección puede variar según el producto químico que se utilice y puede verse afectado por la luz solar, el calor, las precipitaciones, el polvo y la longitud de la capa. Lo ideal es no asilar a los animales infestados, ya que es posible que todos los agentes patógenos transmitidos por las garrapatas se presenten simultáneamente en la misma región geográfica, lo que significa que un programa eficaz de control de las garrapatas deberá dirigirse a varias especies de parásitos al mismo tiempo (Avendano-Reyes et al., 2021b).

Resistencia de *R. microplus*

El uso indiscriminado de los acaricidas comerciales ha sido el factor determinante para la alta resistencia que existe en el mundo a los mismos (Contreras et al., 2020). Lo anterior, ha dado lugar a una reducción de la susceptibilidad de las garrapatas a estos compuestos y al consiguiente fracaso en el control de *R. microplus*.

La resistencia está definida como la selección de rasgo(s) hereditario(s) específico(s) en una población de garrapatas debido a la exposición de la población a un acaricida, lo que resulta en un aumento significativo en el porcentaje de la población que sobrevivirá después de la exposición a una dosis estándar del acaricida utilizado según lo recomendado (Dzemo et al., 2022). Lo anterior se traduce en una adaptación evolutiva consecuente a la presión de selección en la exposición excesiva a los ixodicidas que se comercializan en la actualidad.

Existen reportes en la literatura de poblaciones resistentes a casi todas las clases químicas disponibles en el mercado, incluyendo poblaciones multiresistentes. Sin embargo, la supervivencia de las garrapatas puede deberse no solo a la resistencia, sino también a fallos en la aplicación de acaricidas. Es necesario que se tomen en cuenta varios factores al momento de la aplicación de los acaricidas, incluyendo la elección del acaricida, la época del año y forma de aplicación. La aspersion con mochila de uso agrícola es uno de los principales sistemas de aplicación de acaricidas en ganado bovino, aunque también es necesaria la capacitación del personal que hace uso de esta herramienta, ya que errores de ergonomía, pueden aumentar la posibilidad de aplicación errónea del acaricida, reduciendo su eficacia y causando problemas a los trabajadores de las granjas (Moraes et al., 2023).

En México, el primer caso de resistencia a los organofosforados se detectó en garrapatas *R. microplus* de un rancho cerca de Tuxpan, en el estado de Veracruz, en 1983. Poco después, la resistencia a los organofosforados, se extendió por el

centro y el este de México. En 1986, se introdujeron en México los piretroides sintéticos para contrarrestar los problemas de resistencia que surgieron a los organofosforados. La resistencia a los piretroides se detectó por primera vez en 1993 y también se generalizó a lo largo del país. Como resultado, se ha desarrollado resistencia a ambas clases de ixodicidas en al menos 15 estados de México. El amitraz, de la familia de las amidinas, se introdujo en 1986, de igual manera que los piretroides, sin embargo tardó más en presentar reportes de resistencia debido a que su costo era muy elevado comparado con el de los piretroides. El primer caso de resistencia al amitraz se confirmó en 2001 en Tabasco, y su uso se extendió ampliamente en el trópico mexicano. (Rosado-Aguilar et al., 2008).

El 80% de los problemas de resistencia a los ixodicidas, se deben al mal manejo de los productos (SENASICA, 2020). Lo ideal es lograr realizar un control integral efectivo mediante la utilización de distintas herramientas y estrategias tales como técnicas moleculares, la distribución espacial de la garrapata y de las poblaciones resistentes, simulación de modelos, imágenes satelitales, vacunas, prácticas agronómicas (razas resistentes, rotación de potreros) y control biológico (hongos entomopatógenos, bacterias, depredadores, parasitoides, etc.). También utilizar los productos ixodicidas sólo cuando sea realmente necesario, seguir las indicaciones y/o recomendaciones del fabricante para cada producto, preferentemente con asesoramiento previo de un médico veterinario (Rodríguez-Vivas et al., 2011).

La disponibilidad futura de nuevos productos ixodicidas para ser utilizados contra los ectoparásitos y endoparásitos, no sólo se encuentra comprometida por el progresivo aumento de los casos de resistencia y los crecientes costos de investigación, desarrollo y validación, sino también una cierta falta de conocimiento y competencia para el descubrimiento de nuevas drogas ixodicidas (FAO 2003).

Etil-carbamatos

Generalidades

Los carbamatos son ésteres derivados de los ácidos N-metil o dimetilcarbámico, los cuales presentan propiedades oxido reductoras y son utilizados como insecticidas, nematocidas, herbicidas y fungicidas. Los carbamatos se caracterizan por ser productos liposolubles, de toxicidad variable tanto en humanos como animales (Blanco et al., 2013). No obstante, aún no se ha desarrollado ningún carbamato con actividad específica contra garrapatas (Pérez-González et al., 2014a).

El etil-4-bromofenil-carbamato (LQM 919) y el etil-4-clorfenil-carbamato (LQM 996), pertenecen a un grupo de nuevas moléculas diseñadas y sintetizadas en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM. Estos carbamatos presentan una molécula de benzimidazol como base estructural y se sintetizaron mediante la reacción de arilaminas y alquilaminas con hidruro de sodio y dietilcarbonato de benceno, seguida de purificación por cromatografía en columna. Los carbamatos se caracterizaron estructuralmente mediante interpretaciones de sus espectros, resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono-13 y espectrometría de masas (Angeles et al., 2000.)

Efectos en *R. microplus*

Los etil-carbamatos utilizados en este trabajo (LQM 919 y LQM 996), fueron previamente evaluados, demostrando que interfieren con el ciclo biológico de *R. microplus*, tanto en cepas susceptibles a ixodicidas comerciales como la Media Joya, así como en cepas resistentes como la cepa San Alfonso (resistente a organofosforados, piretroides y amidinas) y la cepa La Mora (resistente organofosforados y piretroides). La disminución en la oviposición y viabilidad de los huevos fue notable, mostrando una eficacia sustancial al observarse una falta de

eclosión de larvas en grupos tratados con concentraciones relativamente bajas en comparación con otros carbamatos estudiados (Prado-Ochoa et al., 2013).

En las garrapatas hembras repletas tratadas se observó menor desarrollo de los ovarios, degeneración de ovocitos y células del pedicelo, vacuolización del epitelio ovárico con picnosis y cariorexis celular y presencia de células apoptóticas. Los resultados anteriores comprobaron que el mecanismo de acción de estos carbamatos es diferente a la de otros carbamatos convencionales, lo que probablemente es la causa de su eficacia sobre cepas resistentes (Iturbe-Requena et al., 2019b; Prado-Ochoa et al., 2014). Resulta interesante observar que estos efectos parecen ser independientes de la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), lo que sugiere una vía de acción diferente a otros carbamatos y una baja afinidad hacia esta enzima (Pérez-González et al., 2014; Prado-Ochoa et al., 2013).

Antecedentes de toxicidad

Actualmente, la regulación de sustancias químicas que se usan como ixodicidas es de gran relevancia a nivel mundial. La Agencia Europea de Sustancias Químicas (ECHA), la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA), son las organizaciones más importantes responsables de establecer las directrices para la regulación de las sustancias químicas. Por esta razón, resulta de gran importancia, determinar el potencial tóxico a diferentes niveles de los etil-carbamatos desarrollados.

Estudios de toxicidad oral y dérmica aguda

La vía dérmica representa el mayor riesgo para el contacto humano con los productos ixodicidas. Además, los hábitos de acicalamiento de los bovinos podrían representar la ingesta de los productos de los baños garrapaticidas (Prado-Ochoa, Gutiérrez-Amezquita, et al., 2014). Los estudios de toxicidad en ratas revelaron que dosis elevadas administradas por vía oral causaron efectos tóxicos considerables,

principalmente en el hígado y el riñón. Sin embargo, la administración dérmica no generó mortalidad ni alteraciones notables en los órganos evaluados. Aunque se registraron incrementos en enzimas hepáticas y señales de daño oxidativo a dosis altas, estos efectos parecen ser menos severos en comparación con otros carbamatos disponibles comercialmente. A partir de este estudio, se pudo realizar la clasificación de los etil-carbamatos según el sistema global de armonización (GHS, por sus siglas en inglés), en el caso de la vía oral, como categoría 4 o de baja peligrosidad. En el caso de la vía dérmica, se consideraron de categoría 5 o de muy baja peligrosidad. (Prado-Ochoa, Abrego-Reyes, et al., 2014; Prado-Ochoa, Gutiérrez-Amezquita, et al., 2014).

Estudios de genotoxicidad

Las pruebas de genotoxicidad indicaron un potencial genotóxico, con un aumento notable en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos, sugiriendo posibles efectos mutagénicos o apoptóticos. Además, se observó una mayor inhibición del índice mitótico en linfocitos tratados con concentraciones más altas de carbamatos, lo que sugiere un efecto citotóxico. No obstante, tras la suspensión de la exposición, se evidenció que los estos efectos genotóxicos y citotóxicos regresaron a niveles basales, lo que muestra la naturaleza reversible de estos efectos adversos (Prado-Ochoa et al., 2016).

Estudios de ecotoxicidad

Se evaluó la toxicidad de los carbamatos en *Eisenia foetida* mediante la exposición a papel filtro impregnado con diferentes concentraciones. Se observó una respuesta dosis-dependiente de los carbamatos LQM 919, LQM 996 mostrando cambios morfológicos a concentraciones similares, así como licuefacción (muerte) y se registró pérdida de peso en las lombrices expuestas. Las lombrices que fueron expuestas a estos compuestos y sobrevivieron, una vez colocadas en un sustrato libre de estos compuestos, lograron seguir con su ciclo de vida normal. Se observó

además, una reducción de la actividad de AChE tanto *in vitro* como *in vivo* en lombrices expuestas a los carbamatos. Estos resultados muestran toxicidad de los carbamatos evaluados hacia *E. foetida*, tanto en términos de mortalidad como de impacto en la actividad enzimática de la AChE, lo que sugiere un riesgo potencial para los organismos del suelo expuestos a estos compuestos pero con valores de k_i (constante de reacción bimolecular) y k_d (constante de disociación) más bajos que los que se obtuvieron respecto al control positivo (propoxur), incluso a concentraciones más bajas que éste (Iturbe-Requena et al., 2019a).

Los estudios realizados en abejas no sugieren alteraciones conductuales significativas en aquellas que estuvieron expuestas a los carbamatos. En cuanto a toxicidad por contacto agudo, los etil-carbamatos fueron al menos 10 veces menos letales que el propoxur. Los etil-carbamatos redujeron la actividad de la AChE de *Apis mellifera* hasta un 30%. Los valores de k_i y k_d de ambos etil-carbamatos fueron menores que los de propoxur, lo que indicó que son inhibidores débiles y con baja afinidad hacia la AChE de *A. mellifera*. Con estos datos podemos considerarlos de bajo riesgo ecotóxico para *A. mellifera*. A pesar de reducir la actividad de la AChE, su mortalidad no parece estar relacionada con daños en el sistema nervioso, y se clasificaron como relativamente no tóxicos por vía oral y mucho menos letales que el propoxur por contacto (Iturbe-Requena, Prado-Ochoa, Muñoz-Guzmán, et al., 2020).

Neurotoxicidad

Definición

La neurotoxicidad se refiere al efecto directo o indirecto de sustancias químicas que alteran el sistema nervioso de humanos o animales (Spencer & Lein, 2014). Si un xenobiótico provoca algún cambio en los neurotransmisores del individuo, estos cambios no son resultado de un efecto neurotóxico, no obstante, si lo anterior presenta una correlación neurofisiológica, neuropatológica o neuroconductual,

podría denominarse neurotoxicidad (United States Environmental Protection Agency, 2023.). El cese de la neurotoxicidad causada por una sustancia suele estar relacionada con la interrupción de exposición a dicha sustancia y raramente progresa en ausencia de exposición continua, aunque igualmente puede haber un retraso significativo entre la exposición y la manifestación de los efectos neurotóxicos (Spencer & Lein, 2014).

Neurotoxicidad de carbamatos

Los plaguicidas tipo carbamatos derivados del ácido carbámico, son inhibidores de la acetilcolinesterasa produciendo carbamilación enzimática. (Perkins & Schlenk, 2000). Se sabe que sus efectos neurotóxicos se deben a la inhibición de la acetilcolinesterasa, una enzima clave en la comunicación nerviosa. Esta inhibición provoca la acumulación de acetilcolina en los receptores colinérgicos, generando una estimulación excesiva en todo el sistema nervioso (Córdoba et al., 2001). Si bien es cierto que los organofosforados y los carbamatos tienen un mecanismo de acción similar, la diferencia principal es que los carbamatos se unen a la acetilcolinesterasa de manera reversible y los organofosforados de manera irreversible, lo cual genera que la exposición incluso a pequeñas cantidades del tóxico puede ser fatal y la muerte generalmente es causada por insuficiencia respiratoria (Bonfilio, 2023).

Sistema nervioso periférico

Definición

Langley (1921) propuso originalmente el término "sistema nervioso autónomo" para describir la inervación de prácticamente todos los tejidos y órganos, excepto las fibras musculares estriadas (Mayer et al., 2000). Posteriormente, se utilizó un término más específico; El sistema nervioso periférico (SNP), que es una red

compleja que comprende a los nervios espinales y craneales que transmiten las señales eléctricas a través de prolongaciones, denominadas potenciales de acción, desde el sistema nervioso central (SNC) que corresponde a las neuronas eferentes o hacia el SNC (neuronas aferentes) (Cunningham, 2014).

Clasificación del sistema nervioso periférico

Funcionalmente, se puede clasificar anatómicamente a los nervios periféricos en dos grupos que difieren según sus componentes y sus trayectos: los nervios cerebroespinales y los nervios simpáticos. Los nervios cerebroespinales están constituidos por los nervios craneales (12 pares) y el tronco nervioso está compuesto por fibras conductoras y tejido conectivo de sostén. Cada fibra nerviosa o nervio periférico (Figura 2) está envuelta por el neurilema (capa formada por mielina), a su vez, está rodeado por un tipo de tejido conectivo muy fino llamado endoneuro. Las fibras nerviosas están reagrupadas en paquetes que reciben el nombre de fascículos, que están rodeados por el perineuro, que se rodea de la capa más externa de tejido conectivo grueso, el epineuro, que incluye tejido adiposo, vasos sanguíneos y linfáticos (Wavreille et al., 2011a).

Motoneuronas

Las motoneuronas o neuronas motoras (Figura 3) son los nervios periféricos que se encargan de transmitir la información requerida para que se de la contracción muscular a través de un impulso nervioso, lo cual es la suma de los potenciales de acción de los distintos axones estimulados dentro de un nervio periférico o potencial de acción muscular compuesto (cMAP) (Romero Díaz & Escamilla Chimal, 2009) Dicha información se interpreta por diversos parámetros como la amplitud (proporcional al número de axones reclutados) y a su frecuencia de repetición. Los nervios periféricos sólo tienen un papel de transmisión de los impulsos nerviosos y

es unidireccional ya que la estimulación se inicia en un extremo del axón y se propaga hasta el otro extremo.

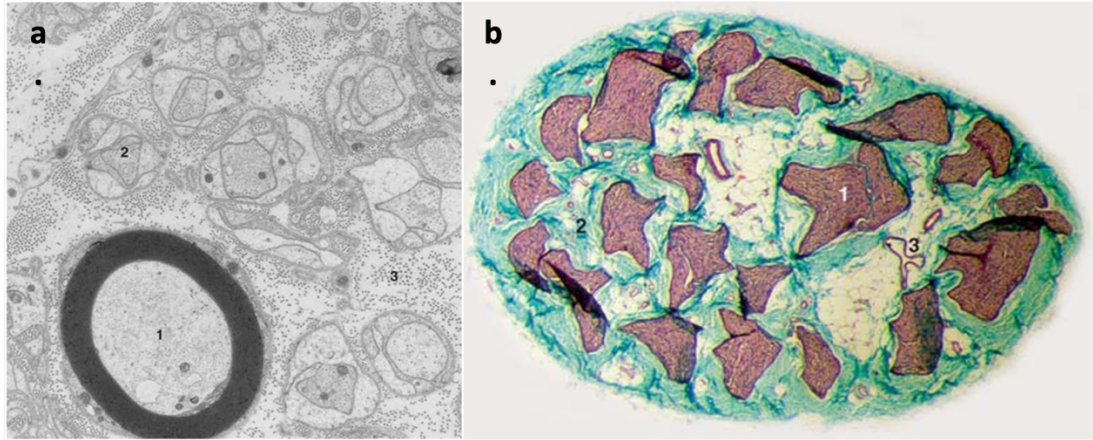


Figura 2. a. Corte histológico transversal de un nervio periférico (microscopía electrónica, aumento x2,000). 1. Fibra mielinizada; 2. Fibra no mielinizada; 3. Endoneuro. b. Corte histológico semifino transversal de un nervio periférico con tinción tricrómica de Masson. 1. fascículo; 2. endoneuro; 3. red vascular intrafascicular (Wavreille et al., 2011b).

La activación de las motoneuronas periféricas se produce en la médula espinal por las motoneuronas centrales e induce un potencial de acción que se propaga por el axón hacia la unión neuromuscular (Cunningham, 2014). La velocidad de transmisión de los potenciales de acción a lo largo de los axones está determinada por el diámetro del axón y la presencia de una vaina de mielina o neurilema ya que permite acelerar la velocidad de transmisión de los potenciales de acción (Michel et al., 2017).

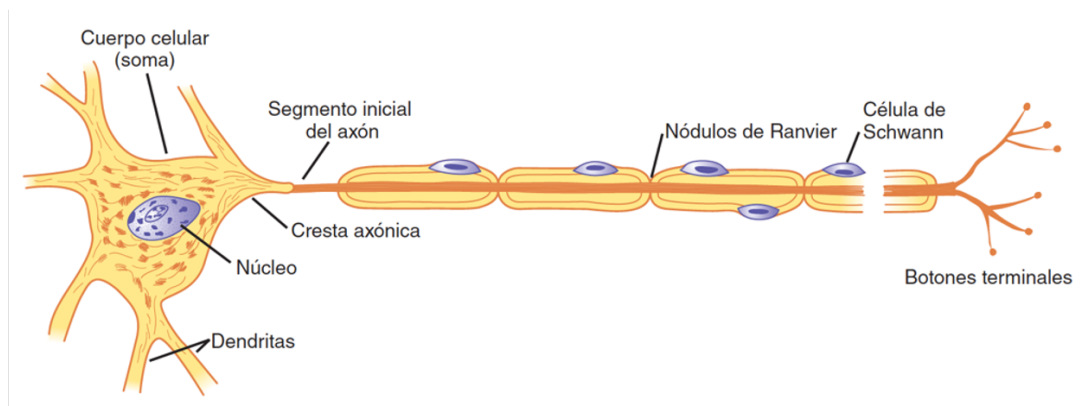


Figura 3. Neurona motora con axón mielinizado. Una neurona motora está formada por el cuerpo celular (soma) con un núcleo, varias prolongaciones llamadas dendritas y un largo axón fibroso que se origina en la cresta axónica. La primera parte del axón se llama segmento inicial. Las células de Schwann forman una vaina de mielina que rodea al axón, excepto en su parte final y en los nodulos de Ranvier. Los botones terminales se localizan en las terminaciones nerviosas (Ganong, 2012).

Unión neuromuscular

La sinápsis entre la fibra muscular con su terminación nerviosa correspondiente, o la unión íntima de estas dos membranas celulares, recibe el nombre de unión neuromuscular (Figura 4) o placa motora (Amadori, 2017). Esta sinapsis está formada por la terminal presináptica, la hendidura sináptica y la terminal postsináptica que se refiere a la membrana celular de las fibras musculares estriadas del músculo esquelético (García & Rosa, 2015).

Neurotransmisores

Acetilcolina

La acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor más abundante que existe en el organismo. Está compuesto de ácido acético y colina, por lo que su nombre deriva de la combinación de estos compuestos (Jacob, 2023). Langley y Dale postularon el concepto de neurotransmisor químico a principios del siglo XX, pero quien merece el mérito de haber establecido la transmisión química como núcleo de la teoría sináptica es Otto Loewi, quien en 1921 demostró mediante un experimento, la

existencia de un mediador químico al estimular la innervación autonómica del corazón de una rana. Estos resultados fueron convincentes y se aceptaron generalmente como prueba de que la ACh es el transmisor químico del vago en el corazón, el cual, fue el primer órgano en el que se demostró la transmisión química (Hallett, 1962). Podemos encontrar este neurotransmisor en los ganglios del sistema nervioso autónomo, uniones neuromusculares, en las sinapsis del sistema nervioso central y en órganos inervados con fibras autónomas (Jacob, 2023).

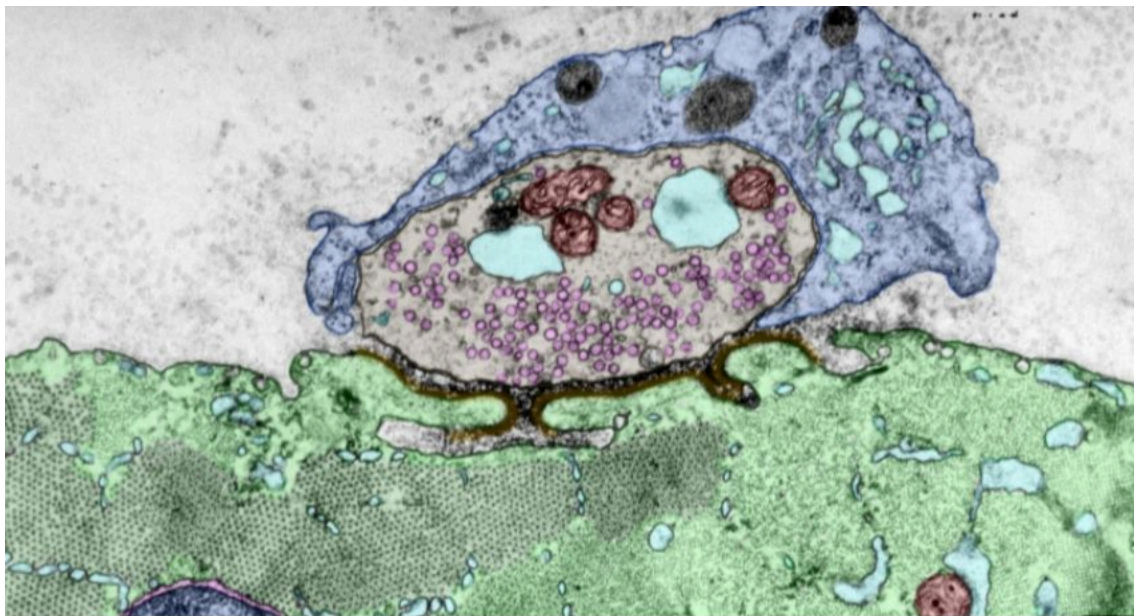


Figura 4. Microscopía electrónica de la unión neuromuscular con una célula muscular esquelética coloreada para denotar las estructuras que lo conforman. Se observa de al axón (canela): una de las ramas terminales del nervio inervador. Vesículas sinápticas (púrpura): agrupadas alrededor de regiones especializadas de la membrana presináptica. Célula muscular esquelética (verde): superficie de la célula muscular situada debajo del axón. Célula de Schwann (azul claro): cubre la rama terminal del axón. Neurotransmisor (amarillo): ACh de la célula muscular que se han localizado utilizando una neurotoxina que se une a ellos (alfa-bungarotoxina). Se observa una tinción densa en la membrana postsináptica y, en parte, en los pliegues de unión (T. Clark Brelje and Robert L. Sorenson 2005-2023© <https://histologyguide.com/EM-view/EM-339-neuromuscular-junction/06-photo-1.html>).

Receptor de acetilcolina

La ACh es el mediador químico responsable de la transmisión fisiológica del impulso nervioso y existen dos tipos de receptores para este neurotransmisor: el receptor muscarínico, receptor asociado a proteínas G, que corresponde a la

inervación de las fibras post-ganglionares parasimpáticas a los órganos efectores y de las fibras post-ganglionares simpáticas a las glándulas sudoríparas. Y el receptor nicotínico (que contiene canales iónicos), correspondiente a neuronas preganglionares y a las postganglionares en los sistemas parasimpáticos y simpáticos, así como los nervios motores al músculo esquelético (Flores Soto, 2005; Ganong, 2012).

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) son moléculas clave en la transmisión colinérgica de la placa neuromuscular, el hipotálamo, el hipocampo, así como otras partes del cerebro (Martin et al., 2020). Estos receptores, como su nombre lo dice, son receptores de tipo nicotínico que pertenecen a la superfamilia de canales iónicos, los cuales, son activados por ligandos, compuestos por heterooligómeros de cinco subunidades (Figura 5) con cuatro dominios transmembrana cada una (Figura 6). Este receptor tiene una estructura básica de pentámero, compuesto por cuatro cadenas polipeptídicas diferentes (2 α , 1 β , 1 δ y 1 ϵ) La acetilcolina se une a la subunidad α , cuyo dominio de unión al ligando presenta dos lugares de unión.

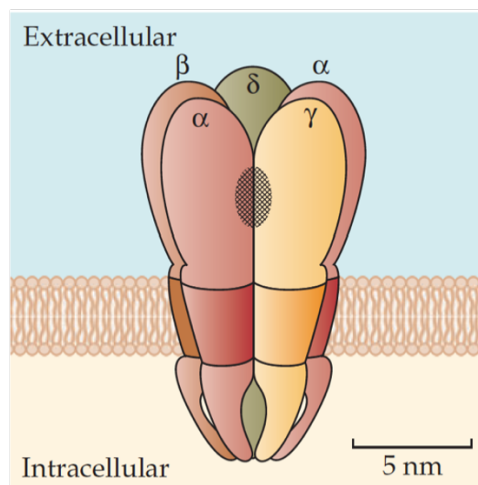


Figura 5. Receptor nicotínico de la ACh. El receptor está compuesto por 5 subunidades: 2 α , 1 β , 1 δ y 1 ϵ (Unwin, N. 2005. *J. Mol. Biol.* 346: 967-989).

Este dominio está expuesto a la superficie extracelular y está formado principalmente por la región N-terminal de las subunidades α . Los cuatro dominios transmembrana que contiene cada subunidad, M1-M4, se estructuran formando un poro, siendo responsable de su formación sobre todo la secuencia M2 (Morgado, 2002).

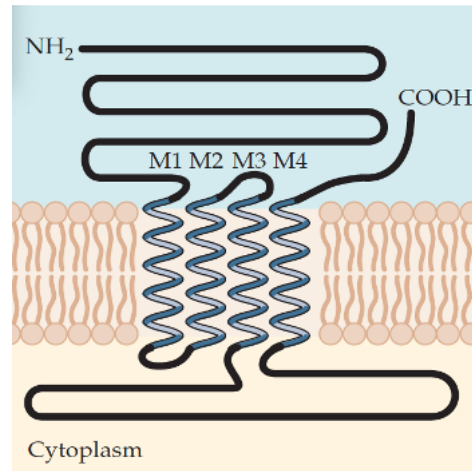


Figura 6. Modelo de la estructura de una subunidad del receptor de acetilcolina. Se presentan los dominios transmembrana M1-M4, cada una formando hélices y ambos con su región carboxilo y amino terminal que se encuentran el espacio extracelular. (Noda, M. et al 1982. Nature 299: 793-797).

Cada receptor está compuesto por cinco subunidades cuyo arreglo espacial delimita un poro acuoso central insertado en la membrana. Las subunidades de estos receptores son homólogas ya que poseen secuencias similares y la distribución de sus segmentos hidrofóbicos transmembranales es equivalente (Obis Ibáñez, 2014).

Las enzimas colinesterasas en los mamíferos son de dos tipos:

1. La butirilcolinesterasa (BuChE), colinesterasa plasmática o de tipo "s", está presente generalmente en forma soluble en casi todos los tejidos (principalmente hígado) y en el plasma, pero en poca concentración en el sistema nervioso central y periférico. Esta enzima cataliza la hidrólisis de ésteres de colina, incluyendo butirilcolina, succinilcolina y acetilcolina. La BuChE está estructural y

funcionalmente relacionada con la AChE ya que, la BuChE hidroliza acetilcolina, pero lo hace con menor eficacia que la AChE. Dicha enzima también es inhibida por los plaguicidas organofosforados y carbamatos, pero sin la manifestación de signos clínicos (López-Durán et al., 2018; Luna González & Valencia Plata, 2008)

2. La colinesterasa verdadera, acetilcolinesterasa, colinesterasa eritrocitaria, específica o de tipo “e”, se encuentra unida a las membranas de las neuronas, en las sinapsis colinérgicas (Figura 7) de la estructura neuromuscular del organismo y en los eritrocitos (Luna González & Valencia Plata, 2008).

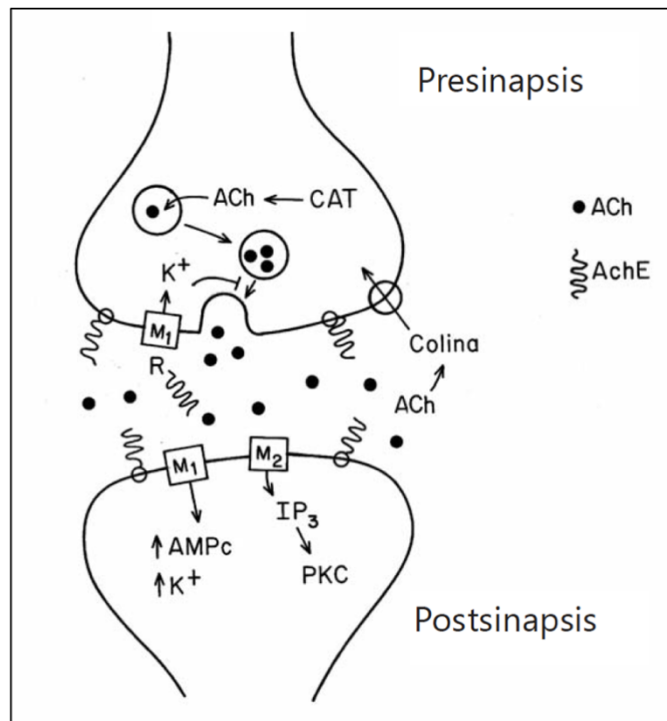


Figura 7. Esquema de una sinapsis colinérgica. En la terminal presináptica, se sintetiza la ACh mediante la acetilcolintransferasa (CAT) a partir de colina y acetil coenzima A. La AChE se acumula en las vesículas y es liberada al espacio sináptico. La ACh se une con receptores muscarínicos (M1 y M2) en la terminal postsináptica, traduciendo la señal a través de vías que involucran al adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y al inositol trifosfato (IP₃). La ACh se hidroliza por la acetilcolinesterasa (AChE) soluble o anclada a la membrana pre- y postsináptica. La colina se recaptura por un transportador de alta afinidad presente en la presinapsis (Sánchez-Chávez et al., 2008).

La inhibición de la AChE está vinculada directamente con el mecanismo de toxicidad de los plaguicidas organofosforados (OF) y carbamatos (CB) que bloquean la acción

de esta enzima resultando en la acumulación de acetilcolina endógena y sobreestimulación de los receptores colinérgicos responsables de los signos muscarínicos y nicotínicos que ocurren después de la intoxicación aguda ya mencionados anteriormente (Bernal-Hernández et al., 2018).

JUSTIFICACIÓN

Rhipicephalus microplus es considerada la garrapata más importante en las áreas tropicales y subtropicales de México y el mundo, y causa grandes pérdidas económicas a la ganadería. Se han desarrollado nuevas moléculas en la facultad de estudios superiores Cuautitlán, UNAM, entre ellas el LQM 919 y el LQM 996, que han demostrado tener un efecto a nivel reproductivo contra *R. microplus*.

Evaluar el riesgo neurotóxico potencial de los carbamatos LQM 919 y el LQM 996 es una parte fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos enfocados a la salud, producción y bienestar animal, ya que se requiere confirmar que su utilización no representa un riesgo para el personal que aplica los productos, para los animales en los que será utilizado y por lo tanto, para las personas que consuman alimentos de origen animal.

En estudios previos se ha evaluado la toxicidad aguda y subcrónica, genotoxicidad, así como ecotoxicidad producida por estos compuestos. Sin embargo, al ser compuestos etil carbamatos se considera que pueden tener efectos neurotóxicos como los que ya se conocen en otros productos carbamatos, por lo anterior, el objetivo de este estudio se centró en evaluar el potencial neurotóxico mediante estudios de cinética y cinética de inhibición de actividad de AChE, así como del análisis de parámetros electrofisiológicos de los potenciales evocados de diferente intensidad.

HIPÓTESIS

El etil-4-bromofenil-carbamato y el etil-4-clorofenil-carbamato, propuestos para el control de garrapatas son inhibidores débiles y de baja afinidad a la acetilcolinesterasa en ratas, son de bajo potencial neurotóxico y no ocasionarán alteraciones neurofisiológicas en la unión neuromuscular.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial neurotóxico y el efecto electrofisiológico del etil-4-bromofenil-carbamato y el etil-4-clorofenil carbamato en un modelo murino (ratas) mediante la determinación de la cinética de inhibición de la acetilcolinesterasa *in vitro*, *in vivo* y electromiografía.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar *in vitro*, la cinética de inhibición de la AChE de rata, producida por el LQM 919, LQM 996 y el propoxur.
- Determinar *in vivo*, la cinética de inhibición de la AChE de rata producida por el LQM 919, LQM 996 y el propoxur.
- Evaluar el efecto de la administración de los carbamatos LQM 919, LQM 996 y propoxur sobre algunos parámetros electrofisiológicos en un modelo murino (rata).

MATERIAL Y MÉTODOS

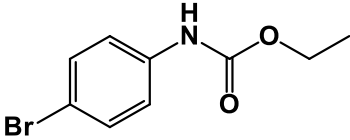
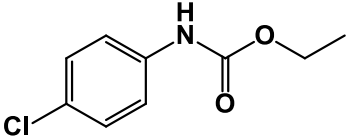
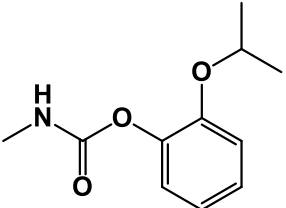
Lugar de estudio

Este estudio se realizó en el laboratorio 1 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, en el bioterio de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria y en el laboratorio de fisiología veterinaria de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Compuestos utilizados

Los compuestos evaluados se presentan en la Tabla 1. El etil-4-bromofenil-carbamato (LQM 919) el etil-4-clorfenil-carbamato (LQM 996), fueron diseñados y sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Estos carbamatos presentan una molécula de benzimidazol como base estructural fueron sintetizados mediante la reacción de arilaminas y alquilaminas con hidruro de sodio y dietilcarbonato de benceno, seguida de purificación por cromatografía en columna. Los carbamatos se caracterizaron estructuralmente mediante interpretaciones de sus espectros, resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono-13 y espectrometría de masas (Angeles et al., 2000.) El control positivo o propoxur (2-(1-methylethoxy) phenyl methyl carbamate, 99.6% puro) fue obtenido de laboratorio Sigma-Aldrich bajo el nombre comercial PESTANAL®.

Tabla 1. Compuestos evaluados. Nombre, fórmula química y peso molecular de los carbamatos LQM 919, LQM 996 y propoxur.

COMPUESTO	FÓRMULA QUÍMICA	PESO MOLECULAR (g/mol)
LQM 919		244
LQM 996		199.63
PROPOXUR		209.24

Animales

Se utilizaron 20 ratas Wistar macho clínicamente sanas de 8 semanas de edad con un peso entre 200 y 250 gramos. Las ratas se alojaron en cajas jumbo de polipropileno en grupos de 5 ratas. La temperatura ambiental se mantuvo en 22 ± 2 °C, la humedad relativa en el 30-70% y se mantuvo un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Las ratas fueron alimentadas con pellet de alimento comercial balanceado y agua *ad libitum*. El estudio fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado de Animales de Experimentación del Programa de Posgrado en Producción y Sanidad Animal, UNAM con clave de registro: CICUAE-FESC C 22_14.

Diseño experimental

El estudio se llevó a cabo en dos fases. La primera consistió en estudios *in vitro* (Figura 8), donde a partir de AChE de fantasmas de eritrocitos y cerebro de ratas,

se determinaron las constantes cinéticas de la AChE, se determinaron las constantes de la cinética de inhibición de AChE y los porcentajes de reducción de actividad de la enzima con diferentes concentraciones de los carbamatos.

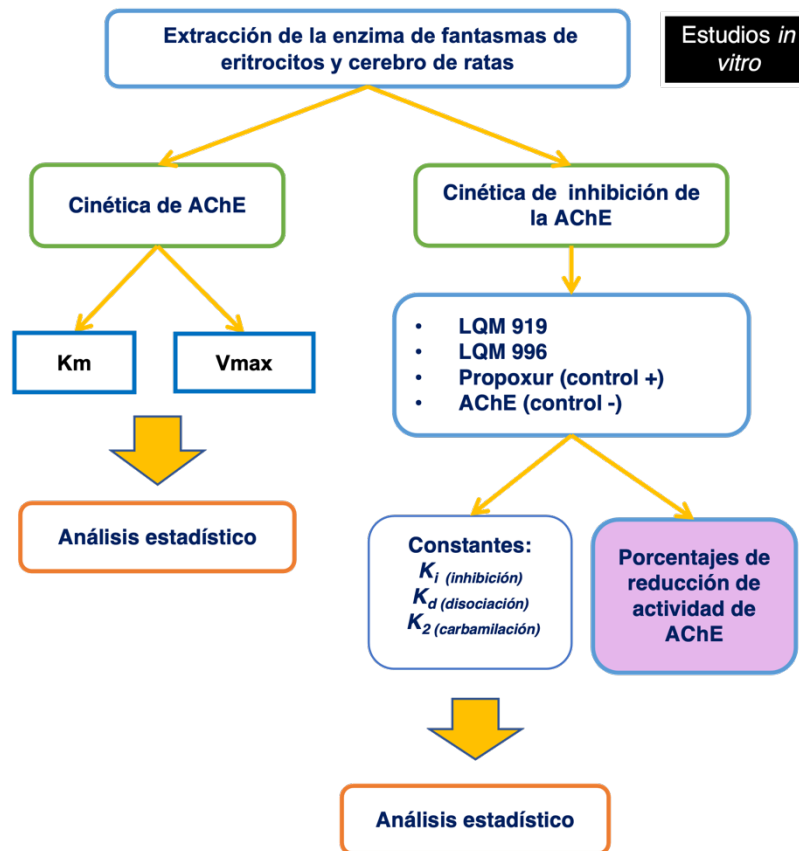


Figura 8. Diseño experimental de la primera fase (estudios *in vitro*).

La segunda fase consistió en estudios *in vivo* (Figura 9), donde se realizó un estudio electrofisiológico que, mediante estímulos de baja frecuencia, alta frecuencia y desvanecimiento tetánico se midió la latencia, amplitud, duración y área bajo la curva de los cMAP en ratas tratadas por vía oral con los carbamatos. Las muestras fueron procesadas para obtener AChE a partir de fantasmas de eritrocitos y cerebro para determinar la cinética de AChE y los porcentajes de reducción de actividad producidos por la administración oral de los carbamatos. Todos los resultados

obtenidos fueron analizados mediante un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de significancia del 95%.

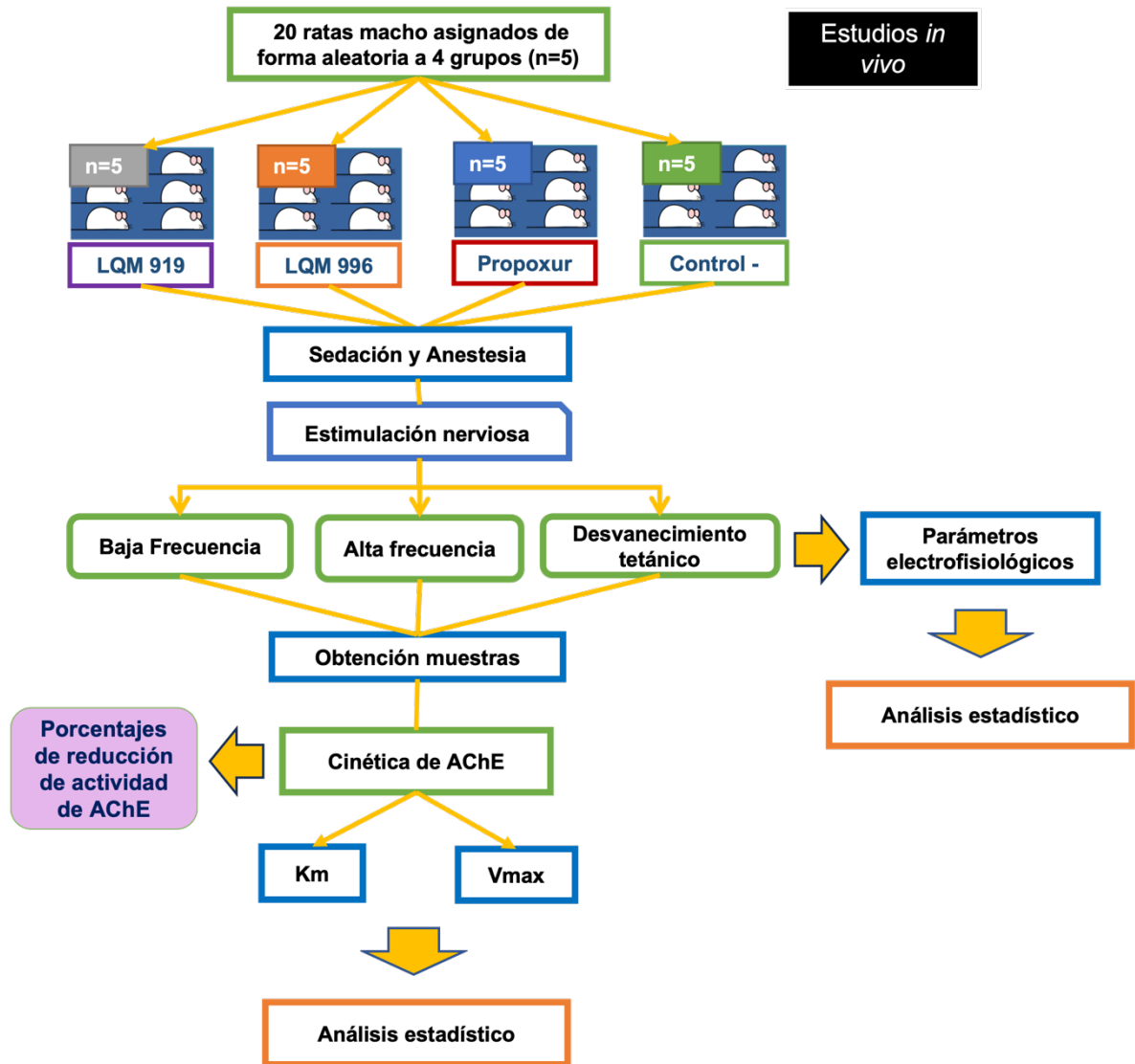


Figura 9. Diseño experimental de la segunda fase (estudios in vivo).

Metodología

Obtención de AChE

Acetilcolinesterasa de cerebro de rata. Para obtener la enzima acetilcolinesterasa de cerebro, las ratas fueron eutanasiadas por dislocación cervical. Se retiró el cerebro completo y fueron preservados dentro de un tubo con una solución que contenía 50 mM Tris (hydroxymethyl) aminometano-HCl (Tris-HCl), pH 7.4 y 300 mM Sacarosa y se refrigeró hasta el procesamiento de las muestras. En el laboratorio, cada cerebro fue colocado en una superficie refrigerada y se cortó para obtener la corteza y el hipotálamo. Los tejidos fueron colocados en un tubo de 1.5ml, resuspendidos cbp 1ml con la solución Tris-HCl-Sacarosa, y macerados en frío con un pistilo hasta obtener una solución homogénea, la cual fue centrifugada a 1,000 g por 10 min a 4°C para remover los núcleos como lo describe (Tsakirisa et al., 2000). Se separó el sobrenadante de cada muestra y éstas fueron congeladas a -20°C. La concentración de proteínas se determinó mediante el método (Bradford, 1976).

Acetilcolinesterasa de fantasmas de eritrocitos de rata. La sangre fue obtenida vía intracardiaca. Los eritrocitos fueron diluidos (1:20) en solución de KCl (0.07M, pH 7.4) durante 15 min y posteriormente se realizaron dos lavados de KCl a 2,500 rpm durante 15 min a 4°C para facilitar la hemólisis y retirar toda la hemoglobina posible de las muestras. Finalmente se lavaron tres veces más con dos volúmenes de PBS a 3,000 rpm durante 10 min a 4°C. El sedimento se sonicó (3 pulsos, 5 segundos, 50% amplitud) a intervalos de 30 segundos para obtener una matriz homogénea. Las proteínas totales se determinaron por el método de Bradford y se ajustó el contenido de proteínas a 1 µg/µL. Las alícuotas con fantasmas de eritrocitos se conservaron a -20°C hasta su utilización en los ensayos.

Cinética de AChE *in vitro*

La cinética de AChE se realizó por el método de (Ellman et al., 1961), modificado por (Prado-Ochoa et al., 2014). Se colocaron 20 μ l con 20 μ g del extracto de proteínas en 200 μ l con de solución amortiguadora de fosfato de sodio 50 mM a un pH de 7.5 contenido al sustrato de Yoduro de Acetiltiocolina (Sigma-Aldrich), en diluciones dobles (de 240×10^{-6} hasta 7.5×10^{-6} M) y 0.32 mM de reactivo de Ellman (DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)). Se realizaron siete lecturas de absorbancia a intervalos de 2 minutos en un lector de placas Ascent ELISA (Labsystems) a 405 nm y 30°C. Las constantes cinéticas k_m (constante de Michaelis-Menten) y V_{max} (velocidad máxima) se calcularon por regresión no lineal, utilizando algoritmos de mínimos cuadrados para ajustar la función de Michaelis-Menten con el software GraphPad Prism®. Como controles negativos se utilizaron, enzima sin sustrato y sustrato sin enzima. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Cinética de inhibición de AChE

Se preparó una solución stock de los carbamatos LQM 919 y LQM 996 (0.5 M en alcohol etílico absoluto), propoxur (50 mM en alcohol etílico absoluto). Se realizaron las diluciones correspondientes y se obtuvieron las siguientes concentraciones para los carbamatos LQM 919 y LQM 996: 12.5 mM, 6.25 mM, 3.12 mM, 1.56 mM, 0.78 mM, 0.39 mM y 0 mM (testigo de alcohol etílico absoluto y buffer de ensayo, el cual fue preparado con el reactivo de Ellman (Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)) 100 mM en PBS a un pH de 7.4 contenido al sustrato de Yoduro de Acetiltiocolina 4.8 mM (Sigma-Aldrich). Las concentraciones de propoxur fueron las siguientes: 250 mM, 50 mM, 25 mM, 5 mM, 2.5 mM, 0.5 mM y 0 mM (testigo de alcohol etílico absoluto y buffer de ensayo).

La cinética de inhibición de la AChE de los carbamatos se determinó con el método de (Ellman et al., 1961), modificado para su realización en microplaca, descrito anteriormente. Se colocaron 20 µl de la enzima y cinco concentraciones de cada uno de los carbamatos a evaluar (LQM 919, LQM 996). Como control negativo se utilizó la enzima sin inhibidor y como control positivo se utilizó propoxur. La cinética de inhibición se monitoreó a 30°C realizando las lecturas de absorbancia a 405 nm durante 12 minutos a intervalos de dos minutos. Se calcularon las siguientes constantes: constante de reacción bimolecular (k_i), constante de disociación (k_d) y constante de carbamitación (k_2). El método utilizado para determinar las constantes k_i , k_d y k_2 fue el descrito por (Chen et al., 2001; Pruett, 2002). El logaritmo natural del porcentaje de actividad residual de AChE con cada concentración de cada inhibidor evaluado fue graficado contra el tiempo. La constante de velocidad aparente (k) que es la pendiente de la línea, fue determinada por regresión lineal de los datos para cada concentración de inhibidor. Los valores para k_i , k_d y k_2 se determinaron por medio de gráficas doble recíprocas de las constantes de velocidad aparente ($1/k$) contra las concentraciones del inhibidor $\{1/[I](1-\alpha)\}$, donde $[I]$ = concentración de inhibidor y los valores de α fueron calculados de acuerdo a la ecuación $\{[S]/(k_m + [S])\}$.

Los porcentajes de reducción de la actividad de la AChE se calcularon mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de reducción de actividad de AChE} = 100 - \left(\frac{V_i}{V} \times 100 \right)$$

Donde:

V_i = Actividad de AChE para cada concentración de inhibidor. La pendiente de la velocidad de reacción se crea por un aumento de la absorbancia con el tiempo.

V = Actividad de la AChE sin el inhibidor. La pendiente de la velocidad de reacción se crea mediante un aumento de la absorbancia a lo largo del tiempo.

Inhibición de actividad de AChE *in vivo*

En la Tabla 2 se muestran los cuatro grupos de ratas (n=5) seleccionados aleatoriamente con su respectivo tratamiento y la dosis utilizada para cada carbamato.

Tabla 2. Grupos experimentales.

Grupo	Tratamiento	Dosis
A (Control negativo)	Aceite vegetal + 0.4% DMSO	-
B (Control positivo)	Aceite vegetal + propoxur disuelto en 0.4% DMSO	2 mg/kg
C	Aceite vegetal + LQM 919 disuelto en 0.4% DMSO	50 mg/kg
D	Aceite vegetal + LQM 996 disuelto en 0.4% DMSO	50 mg/kg

Se realizaron siete lecturas de absorbancia a intervalos de 2 minutos en un lector de placas Ascent ELISA (Labsystems) a 405 nm y 30°C. Las constantes cinéticas k_m y V_{max} se calcularon por regresión no lineal, utilizando algoritmos de mínimos cuadrados para ajustar la función de Michaelis-Menten con el software GraphPad Prism®. Como controles negativos se utilizaron, enzima sin sustrato y sustrato sin enzima. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Se obtuvieron los porcentajes de inhibición a partir de la cinética de AChE en ratas tratadas con los etil carbamatos y propoxur.

Estudio electrofisiológico

Los tratamientos (Tabla 2) fueron administrados vía oral mediante una sonda metálica con ayuda de una jeringa de 3 ml que contenía 1ml de aceite vegetal dos horas previas al ensayo electrofisiológico. Las ratas fueron sedadas con maleato de

acepromacina (Calmivet®, Vetoquinol) vía intramuscular a una dosis de 0.10 mg/kg de peso y anestesiadas con pentobarbital sódico (Pisabental®, LaPisa) vía intraperitoneal a una dosis de 0.15 mg/kg de peso. Se rasuró con una cuchilla de 0.2 mm (andis ultraedge®) uno de los miembros posteriores 2 cm antes de la región de la articulación coxofemoral hasta el metatarso a favor y en contra del sentido del crecimiento del pelo.

Se colocó a la rata en decúbito dorsal y se sujetaron los miembros a una tabla de disección con hilo cáñamo. Se colocó un campo de 3 x 3 cm, se incidió por la cara medial del miembro y se separó con una pinza kelly recta a los semitendinoso y semimembranoso en la región inguinal para exponer al nervio ciático, el cual fue envuelto en una vaina plástica junto con el electrodo. El tendón, en su inserción con el calcáneo fue sujetado con un hilo Gutterman® de 14 cm de longitud y posteriormente cortado de tal manera que el tendón estuviera sujetado por el hilo hacia el captor de fuerza.

Para medir las señales electrofisiológicas se utilizó un sistema de registro de la actividad fisiológica digital BIOPAC® (BSLBSC-M) al cual, se conectó el captor de fuerza al canal 1 (CH1) para registrar los cMAP, los electrodos de aguja para el registro del electromiograma en el canal 2 (CH2) y el estimulador de voltaje en el canal 3 (CH3). Se realizó una caracterización de estímulos para determinar la media aproximada de la cantidad de voltaje necesario para causar un potencial de acción. Durante el estudio se realizaron diez estímulos de baja frecuencia (1 a 3 Hz) con intervalos de cinco segundos cada uno. Después se realizaron diez estímulos de alta frecuencia (10 a 30 Hz) con intervalos de cinco segundos cada uno y finalmente se aplicó un estímulo continuo de desvanecimiento tetánico durante diez segundos a una frecuencia de 30 Hz.

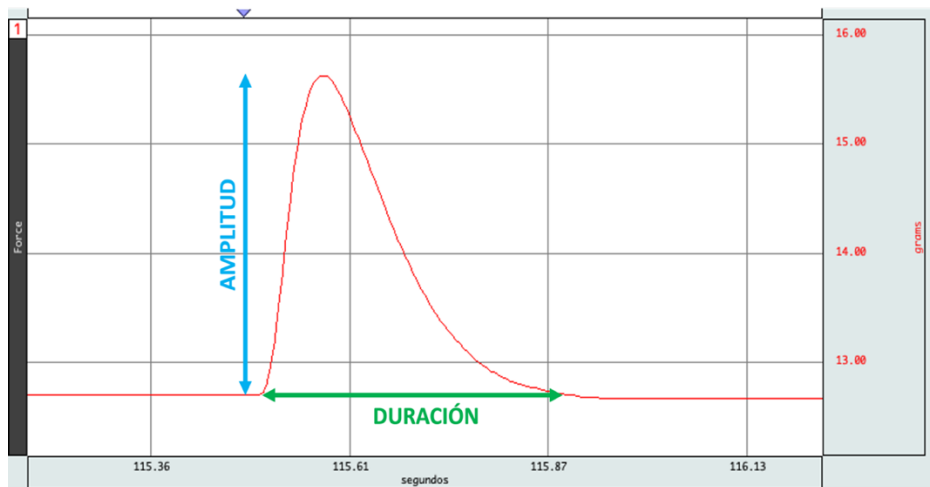


Figura 10. Representación de medición de parámetros electrofisiológicos de amplitud y duración en un potencial de acción muscular compuesto obtenido durante el ensayo electrofisiológico.

La amplitud fue determinada en el CH1 (gramos), midiendo pico a pico desde la línea de base hasta el pico positivo en unidades de fuerza (Figura 10). La duración se midió desde la desviación inicial hasta el cruce de la línea de base en segundos (Figura 10). Este parámetro fue determinado para los estímulos de baja frecuencia y estímulos de alta frecuencia ya que en el caso del desvanecimiento tetánico se realizó un estímulo continuo con duración de 10 segundos.

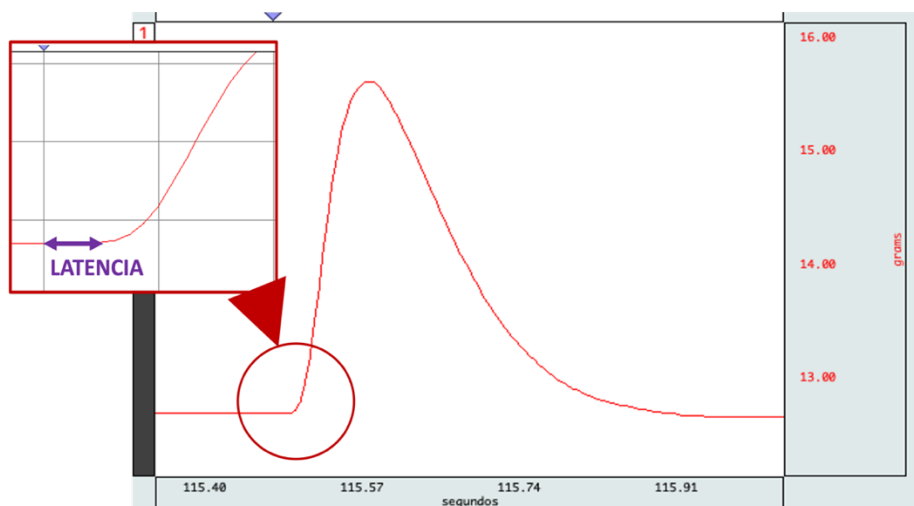


Figura 11. Representación de medición del parámetro electrofisiológico de latencia en un potencial de acción muscular compuesto obtenido durante el ensayo electrofisiológico.

La latencia se midió desde el momento en que se dio el estímulo hasta la primera desviación positiva en segundos (Figura 11). Se calculó el área total bajo la curva entre la forma de onda y la línea recta que se traza entre los puntos extremos, expresada en términos de unidades de amplitud (gramos) multiplicadas por segundos o unidades horizontales (Figura 12). Los parámetros anteriores fueron determinados para los estímulos de baja frecuencia, estímulos de alta frecuencia y desvanecimiento tetánico.

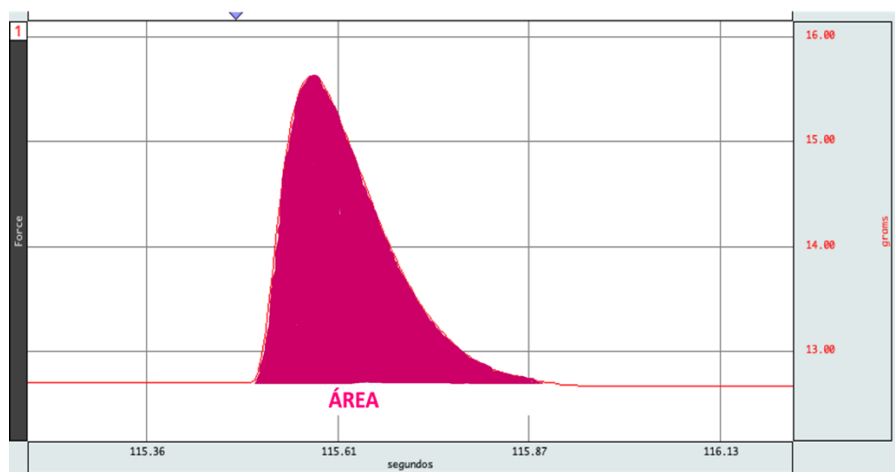


Figura 12. Representación de medición del parámetro electrofisiológico de área en un potencial de acción muscular compuesto obtenido durante el ensayo electrofisiológico.

A partir de los datos de amplitud (mV) durante el desvanecimiento tetánico se calcularon los porcentajes de decremento de amplitud (Figura 13) midiendo pico a pico desde la línea de base hasta el pico positivo o negativo del primer estímulo equivalente al 10%, así como el cuarto estímulo equivalente al 40%. Se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{1er estímulo} - \text{4to estímulo}}{\text{1er estímulo}} \times 100$$

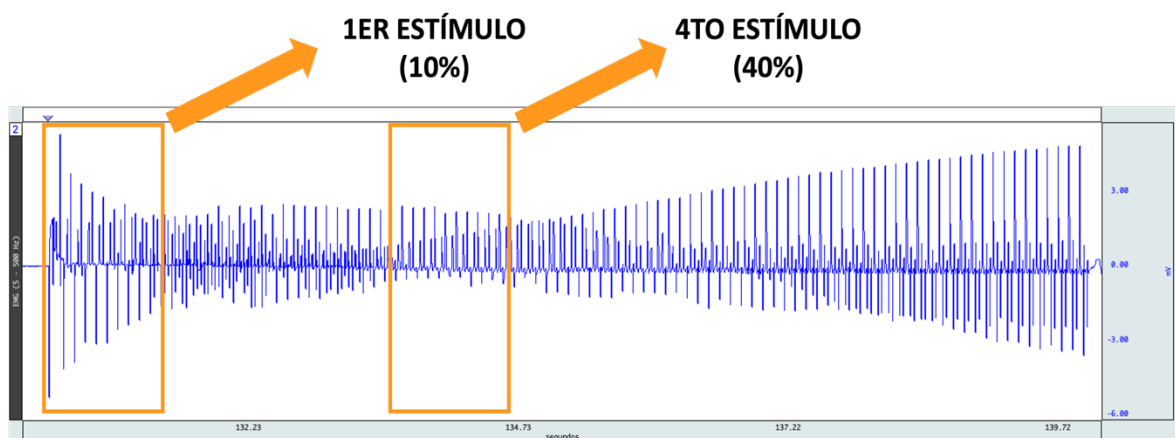


Figura 13. Representación de la obtención de los valores de amplitud de pico a pico correspondientes al primer estímulo (10% y cuarto estímulo (40%) durante el desvanecimiento tetánico para cálculo de porcentaje de decremento de la amplitud y expresada en milivolios.

Análisis estadístico

Los datos de las constantes cinéticas k_m y V_{max} , de las constantes de la cinética de inhibición, k_i , k_d y k_2 , así como los parámetros electrofisiológicos (amplitud, latencia, duración, área y porcentaje de decremento) se analizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las diferencias entre medias se establecieron por la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% utilizando el software GraphPad Prism®.

RESULTADOS

Cinética de AChE

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la cinética de AChE de la enzima obtenida de fantasmas de eritrocitos y cerebro de ratas, la cual se añadió a diferentes concentraciones de cada carbamato. En cerebro y fantasmas de eritrocitos, sólo el propoxur redujo significativamente la V_{max} ($p < 0.05$). Sin embargo, sólo en fantasmas de eritrocitos, el propoxur disminuyó la k_m respecto al grupo control y el LQM 919 disminuyó respecto al propoxur ($p < 0.05$).

Tabla 3. Constantes cinéticas de AChE in vitro. Se presentan los resultados de la cinética de actividad de AChE de la enzima obtenida de fantasmas de eritrocitos (FE) y cerebro (C) de las ratas Wistar. Los datos representan media de la V_{max} y k_m (\pm) el error estándar. Letras diferentes representan diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al grupo control negativo.

Tratamiento	Fuente enzima	V_{max}	k_m
Control negativo	FE	2.515E-3 + 4.07E-4	5.387E-06 + 5.473E-07
Control negativo	C	1.575E-2 + 1.062E-3	3.826E-05 + 1.911E-06

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la cinética de AChE de la enzima obtenida de fantasmas de eritrocitos y cerebro de las ratas tratadas con 2 mg/kg de propoxur o 50 mg/kg del LQM 919 y LQM 996. En cerebro se redujo significativamente la V_{max} en la enzima de las ratas tratadas con los tres tratamientos ($p < 0.05$). En fantasmas de eritrocitos, sólo el propoxur redujo la V_{max} ($p < 0.05$), mientras que los etil-carbamatos y el propoxur no presentaron ningún efecto sobre la k_m respecto al grupo control negativo ($p > 0.05$).

Tabla 4. Constantes cinéticas de AChE in vivo. Se presentan los resultados de la cinética de actividad de AChE de la enzima obtenida de fantasmas de eritrocitos (FE) y cerebro (C) de las ratas Wistar tratadas con etil carbamatos y propoxur a diferentes concentraciones. Los datos representan media de la V_{max} y k_m (\pm) el error estándar (EE). Letras diferentes representan diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al grupo control negativo.

Tratamiento	Dosis	Fuente enzima	V_{max}	k_m
Control negativo	—	FE	2.65E-03 \pm 3.61E-04 ^a	1.27E-05 \pm 7.90E-06 ^a
Propoxur	2 mg/kg	FE	1.13E-03 \pm 3.22E-04^b	4.33E-07 \pm 2.11E-08 ^a
LQM 919	50 mg/kg	FE	1.56E-03 \pm 2.03E-04 ^a	3.26E-06 \pm 8.11E-07 ^a
LQM 996	50 mg/kg	FE	1.99E-03 \pm 4.80E-04 ^a	1.49E-05 \pm 4.83E-06 ^a
Control negativo	—	C	1.62E-02 \pm 8.10E-04 ^a	4.15E-05 \pm 2.95E-06 ^a
Propoxur	2 mg/kg	C	1.13E-02 \pm 5.42E-04^b	7.39E-05 \pm 5.77E-06 ^a
LQM 919	50 mg/kg	C	1.23E-02 \pm 1.62E-03^c	4.70E-05 \pm 3.31E-06 ^a
LQM 996	50 mg/kg	C	1.00E-02 \pm 5.55E-04^d	4.15E-05 \pm 5.05E-06 ^a

Cinética de inhibición de AChE

En la Tabla 5 se presentan los resultados de las constantes de inhibición de AChE. Tanto en cerebro como en fantasmas de eritrocitos, el propoxur tuvo diferencia significativa en las tres constantes donde la constante k_i fue más alta respecto al LQM 919 y al LQM 996. La constante k_d fue más baja respecto al LQM 919 y LQM 996. La constante k_2 más alta respecto al LQM 919 y LQM 996 ($p < 0.05$).

Porcentajes de reducción de la actividad de AChE

La Figura 14 representa los porcentajes máximos de inhibición de la enzima AChE en fantasmas de eritrocitos y cerebro de ratas en ensayos *in vitro* e *in vivo*. En la enzima AChE de fantasmas de eritrocitos, el propoxur presentó un porcentaje de reducción de actividad de AChE del 78.35 ± 3.95 *in vitro* a una concentración de 0.25 mM y 57.62 ± 6.13 *in vivo* con dosis de 2 mg/kg. En los etil carbamatos LQM 919 y LQM 996, el porcentaje de reducción de actividad de AChE fue menor al 20% *in vitro* a una concentración de 1.25×10^{-2} M e *in vivo* con dosis de 50 mg/kg.

Tabla 5. Constantes cinéticas de inhibición de AChE. Se presentan los resultados de las constantes inhibición de actividad de AChE de la enzima obtenida de fantasmas de eritrocitos (FE) y cerebro (C) de las ratas Wistar Constante de inhibición (k_i), constante de disociación (k_d) y constante de carbamitación (k_2) (\pm) el error estándar. Letras diferentes representan diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$).

Tratamiento	Fuente enzima	k_i (M^{-1})	k_d (M)	k_2 (min^{-1})
Propoxur	FE	2755466 ± 848115^a	$1.34E-08 \pm 1.17E-09^a$	$3.49E-02 \pm 7.15E-03^a$
LQM 919	FE	7.14 ± 2.43^b	$7.37E-05 \pm 1.20E-05^b$	$1.56E-03 \pm 6.64E-04^b$
LQM 996	FE	6.21 ± 1.55^b	$7.61E-05 \pm 3.31E-06^b$	$3.77E-04 \pm 7.51E-05^b$
Propoxur	C	29001 ± 3174^a	$4.65E-07 \pm 3.45E-08^a$	$1.14E-02 \pm 9.35E-04^a$
LQM 919	C	4.45 ± 0.43^b	$1.79E-04 \pm 1.03E-05^b$	$7.73E-04 \pm 1.36E-04^b$
LQM 996	C	4.73 ± 0.50^b	$1.99E-04 \pm 2.34E-05^b$	$3.43E-04 \pm 6.77E-05^b$

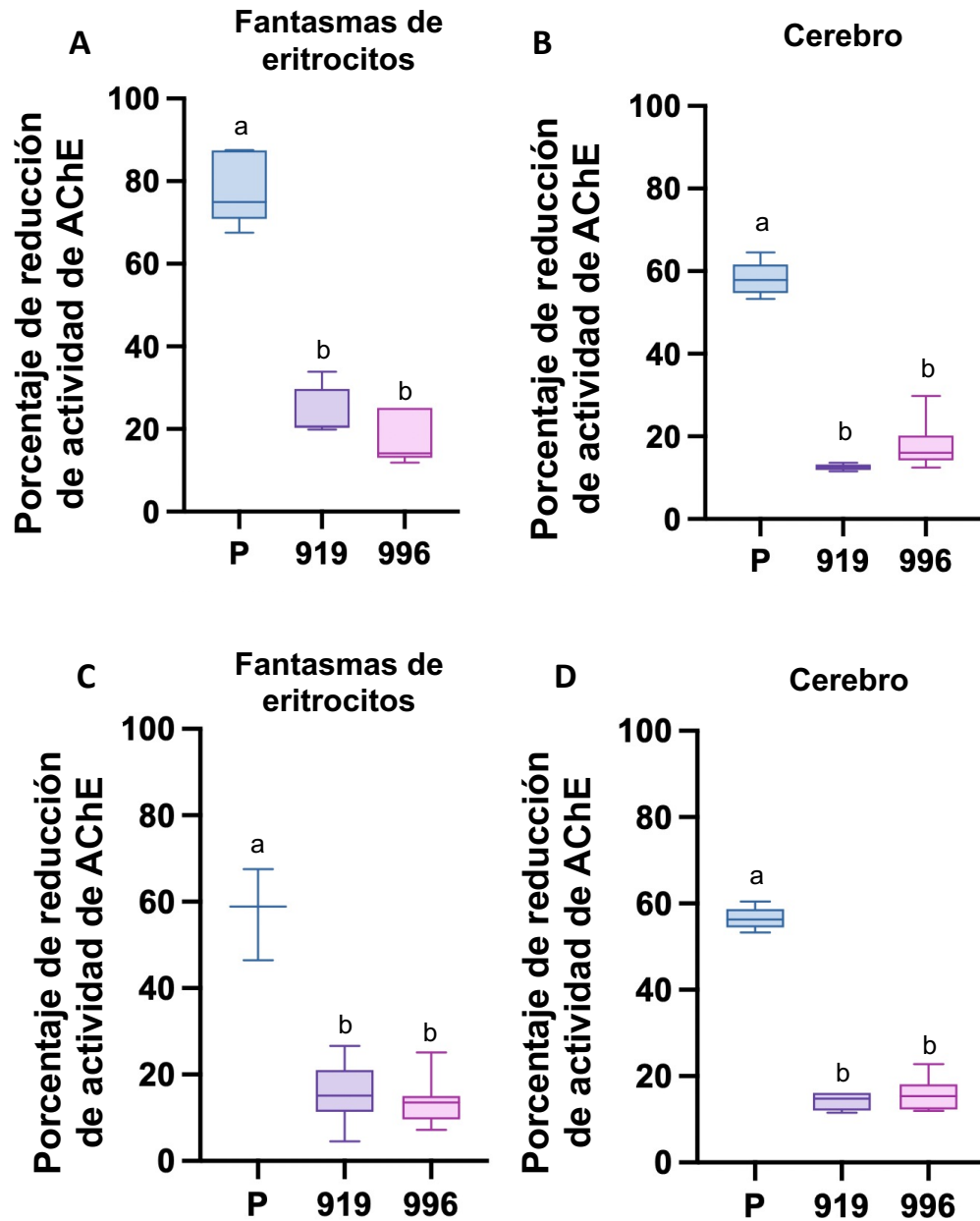


Figura 14. Porcentajes de inhibición de la actividad de la enzima AChE obtenidos mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* en fantomas de eritrocitos (A y C) y cerebro (B y D) de ratas. En estudios *in vitro* se utilizaron los etil carbamatos (919 y 996) a la concentración de 1.25×10^{-2} M y el propoxur (P) a la concentración de 0.25 mM. En estudio *in vivo*, las ratas fueron tratadas con 2 mg/kg de propoxur y 50 mg/kg de etil carbamatos. Letras diferentes representan diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$).

Los porcentajes de reducción de actividad de AChE *in vitro* a diferente concentración de inhibidor se presentan en la Figura 15, donde observamos que incluso a bajas concentraciones (0.05 mM), el propoxur inhibe notablemente la actividad de la enzima tanto en cerebro como en fantasmas de eritrocitos. Los etil carbamatos causaron una reducción máxima de la actividad de un 20% incluso a la concentración más alta (1.25E-02 M).

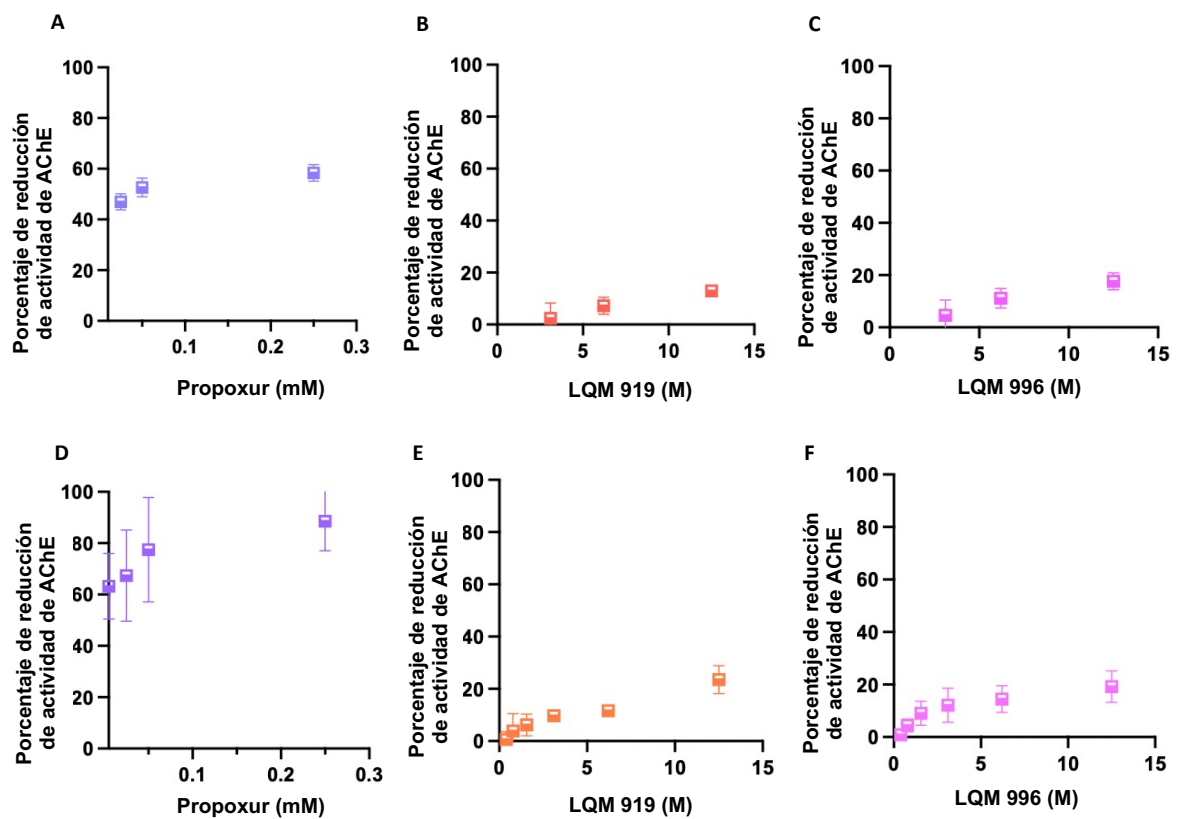


Figura 15. Porcentajes de reducción de actividad de AChE a diferente concentración de inhibidor. Se presentan los porcentajes de inhibición de AChE (\pm) el error estándar obtenida de cerebro (A, B y C) y fantasmas de eritrocitos (D, E y F) a diferentes concentraciones del inhibidor: Propoxur (0.25 mM, 0.05 mM, 0.025 mM, 0.005 mM, 0.0025 mM, 0.0005 mM, 0.0 mM), LQM 919 y LQM 996 (1.25E-02 M, 6.20E-03 M, 3.10E-03 M, 1.56E-03 M, 7.80E-04 M, 3.90E-04 M, 0.0 M).

Estudio electrofisiológico

En la Figura 16 se representan las medias de los voltajes obtenidos durante la caracterización de estímulos en donde se puede apreciar que el propoxur presentó un aumento significativo del voltaje requerido para provocar un potencial de acción utilizado en el estimulador respecto al resto de los grupos ($p < 0.05$).

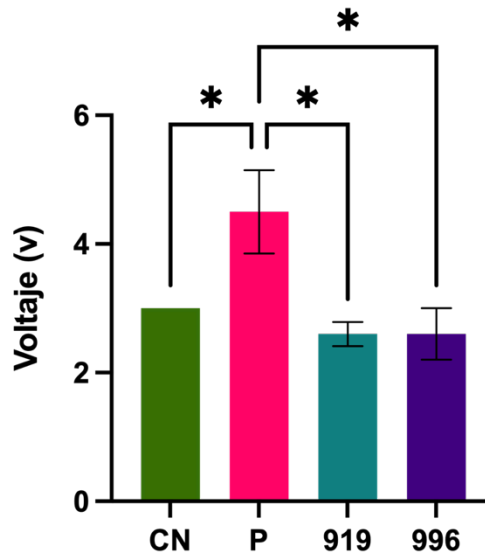


Figura 16. Voltaje empleado en el estimulador durante estudio electrofisiológico. Se representan las medias de los voltajes obtenidos mediante la caracterización de estímulos de ratas tratadas con carbamatos (\pm) el error estándar. CN: Control negativo, P: Propoxur, 919: LQM 919, 996: LQM 996. (*) representan diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$).

En la Figura 17 se muestra la representación de los cMAP de los diez estímulos de baja frecuencia y en la Figura 18 los cMAP de estímulos alta frecuencia en ratas del grupo control y ratas tratadas con etil carbamatos. En ellos se observa que en todos los casos hubo un reclutamiento de las fibras nerviosas apreciándose el aumento de amplitud para cada cMAP.

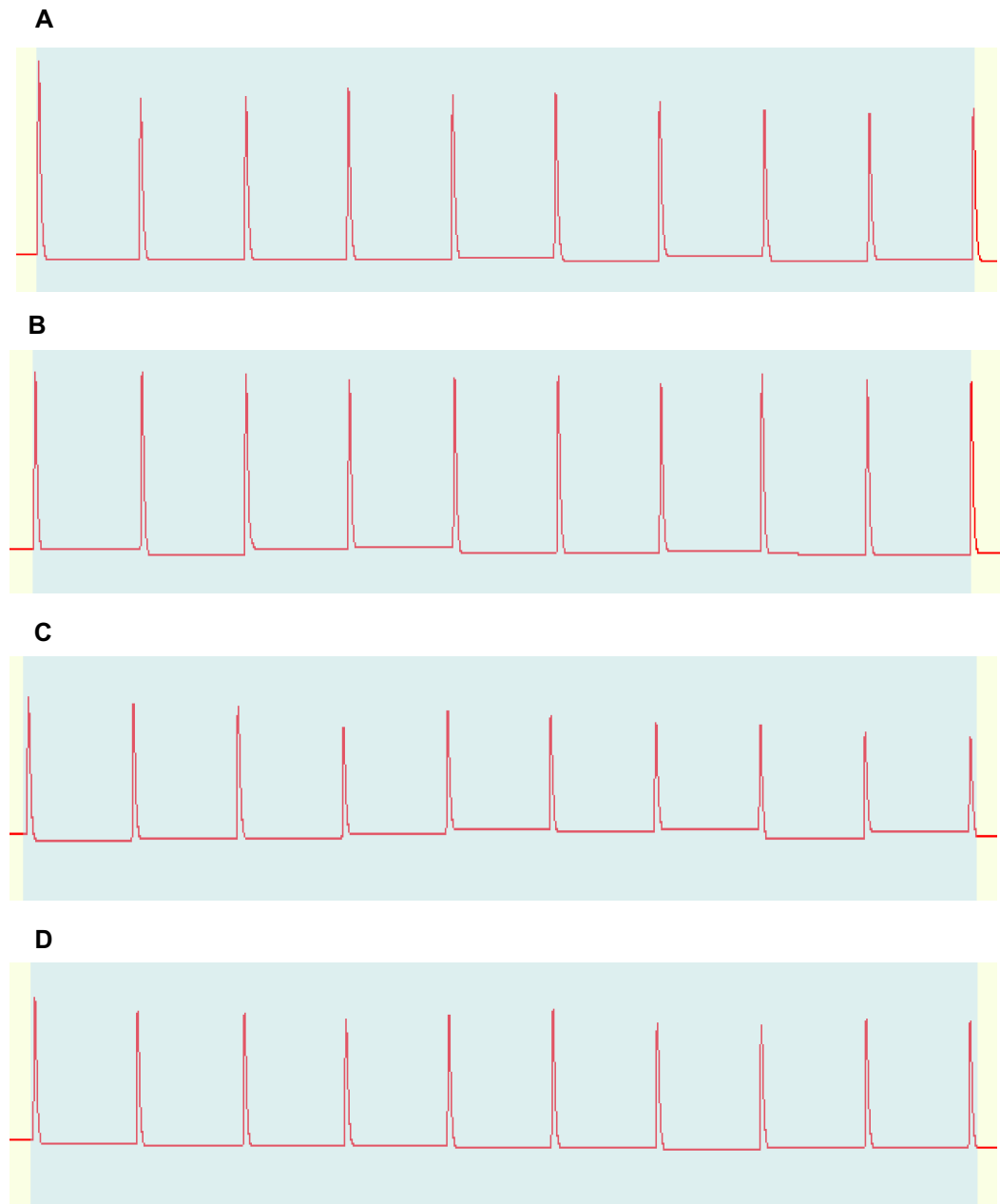


Figura 17. Potenciales de acción muscular compuesto (cMAP) de los diez estímulos de baja frecuencia. Se representan los cMAP en rata del grupo control negativo (A), ratas tratadas con propoxur (B) y etil carbamatos LQM 919 (C) y LQM 996 (D).

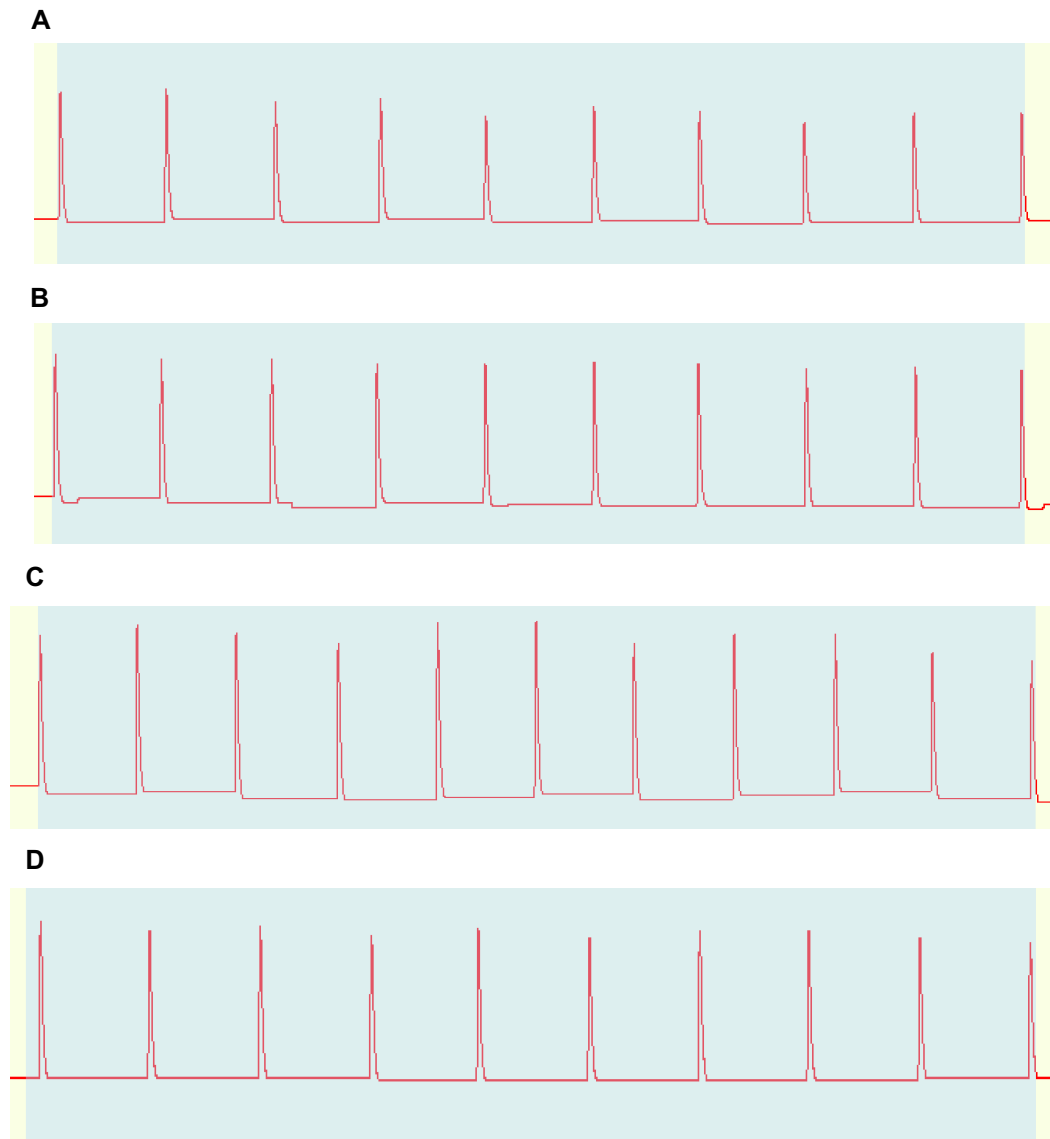


Figura 18. cMAP de los diez estímulos de alta frecuencia. Se representan los cMAP en rata del grupo control negativo (A), ratas tratadas con propoxur (B) y etil carbamatos LQM 919 (C) y LQM 996 (D).

En la Figura 19 se observa la representación de la suma de los cMAP obtenidos en el desvecimiento tetánico donde se observan aumentos y decrementos de amplitud.

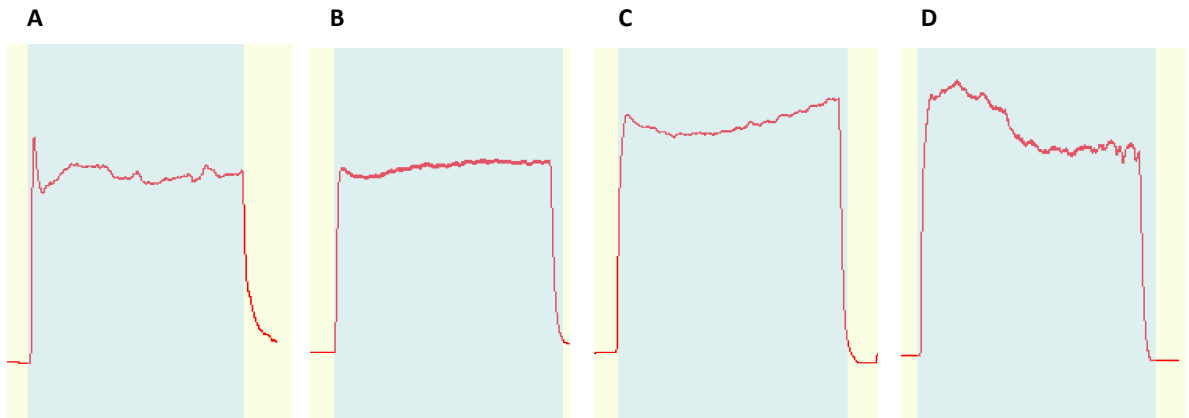


Figura 19. Amplitudes de desvanecimiento tetánico. Se representan los estímulos de desvanecimiento tetánico en rata del control negativo (A) ratas tratadas con propoxur (B) y etil carbamatos LQM 919 (C), LQM 996 (D) mostrando la amplitud del cMAP obtenido de un único estímulo sostenido de 10 segundos.

Los datos de amplitud se representan en la Figura 20, donde se aprecian que tanto en los estímulos de baja como de alta frecuencia, en ratas tratadas LQM 996, las amplitudes fueron mayores respecto al resto de los grupos ($p < 0.05$). Los datos de la duración se representan en la Figura 21, donde se puede apreciar que en ratas tratadas con LQM 996, la duración fue menor respecto al resto de los grupos y además el propoxur disminuyó la duración del cMAP respecto al grupo control en estímulos de baja y alta frecuencia ($p < 0.05$).

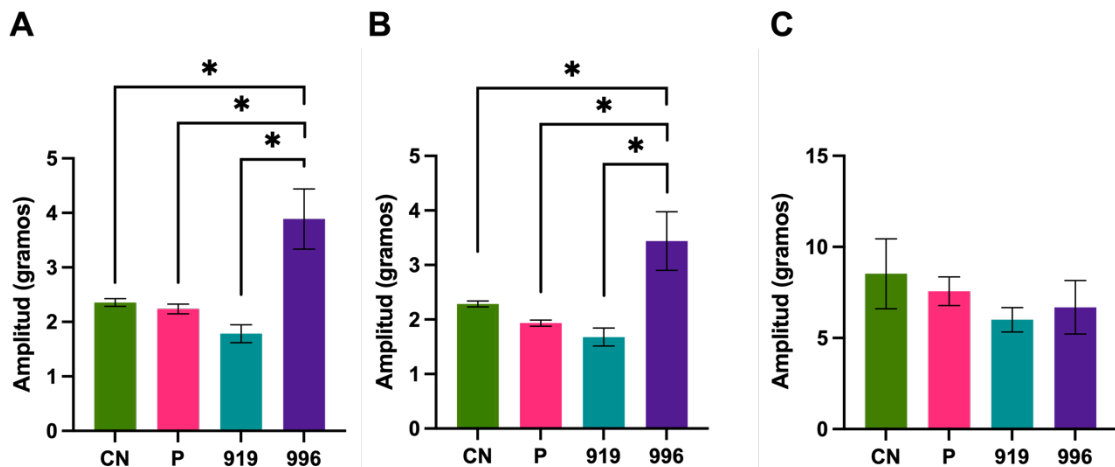


Figura 20. Amplitudes de los cMAP obtenidos en el estudio electrofisiológico en ratas expuestas a los carbamatos. Las barras representan las medias (\pm) el error estándar. Estímulos de baja frecuencia, B. Estímulos de alta frecuencia y C. Desvanecimiento tetánico.

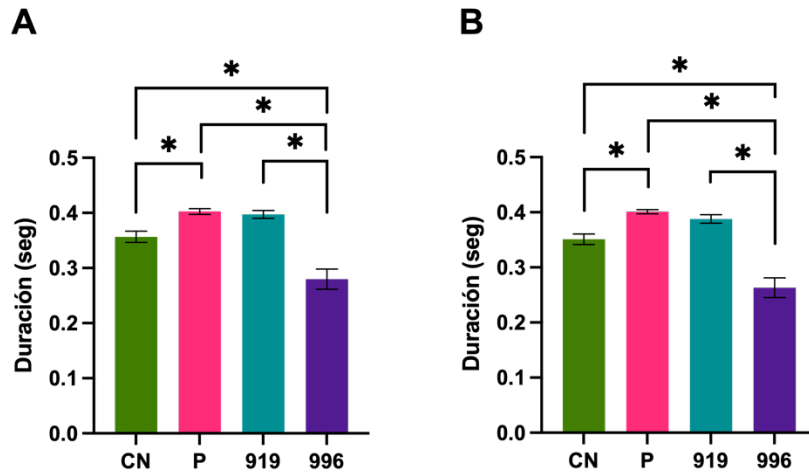


Figura 21. Duración de los cMAP obtenidos en el estudio electrofisiológico en ratas expuestas a los carbamatos. Las barras representan las medias (\pm) el error estándar. Estímulos de baja frecuencia, B. Estímulos de alta frecuencia y C. Desvanecimiento tetánico. CN: Control negativo, P: Propoxur, 919: LQM 919, 996: LQM 996. (*) representan diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$).

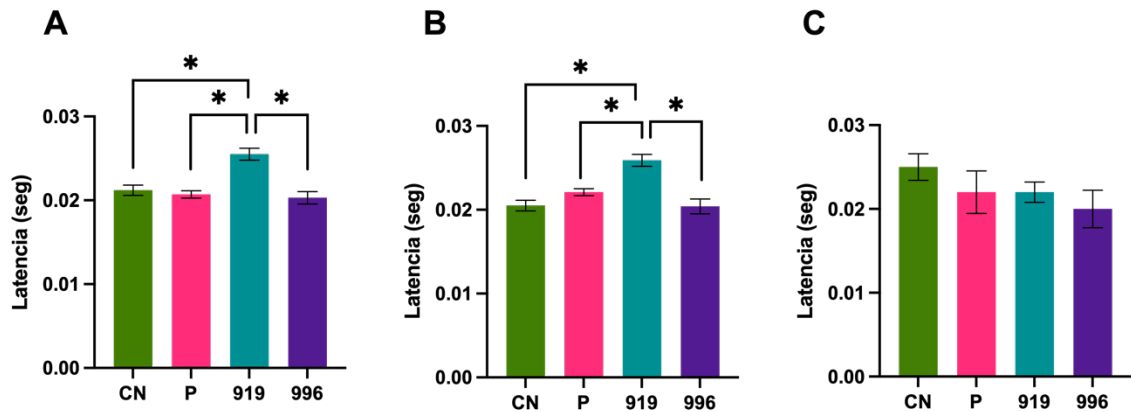


Figura 22. Latencia de los cMAP obtenidos en el estudio electrofisiológico en ratas expuestas a los carbamatos. Las barras representan las medias (\pm) el error estándar. Estímulos de baja frecuencia, B. Estímulos de alta frecuencia y C. Desvanecimiento tetánico. CN: Control negativo, P: Propoxur, 919: LQM 919, 996: LQM 996. (*) representan diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$).

Los datos de latencia se representan en la Figura 22 se observa que en ratas tratadas con LQM 919, las latencias obtenidas fueron mayores respecto al resto de los grupos en estímulos de baja y alta frecuencia ($p < 0.05$). El área bajo la curva se representa en la Figura 23. En ratas tratadas con LQM 996, las áreas fueron menores respecto al resto de los grupos en estímulos de baja como de alta frecuencia y además, sólo en estímulos de baja frecuencia, se observó diferencia

entre las áreas obtenidas del grupo tratado con propoxur respecto al grupo tratado con LQM 919 ($p < 0.05$).

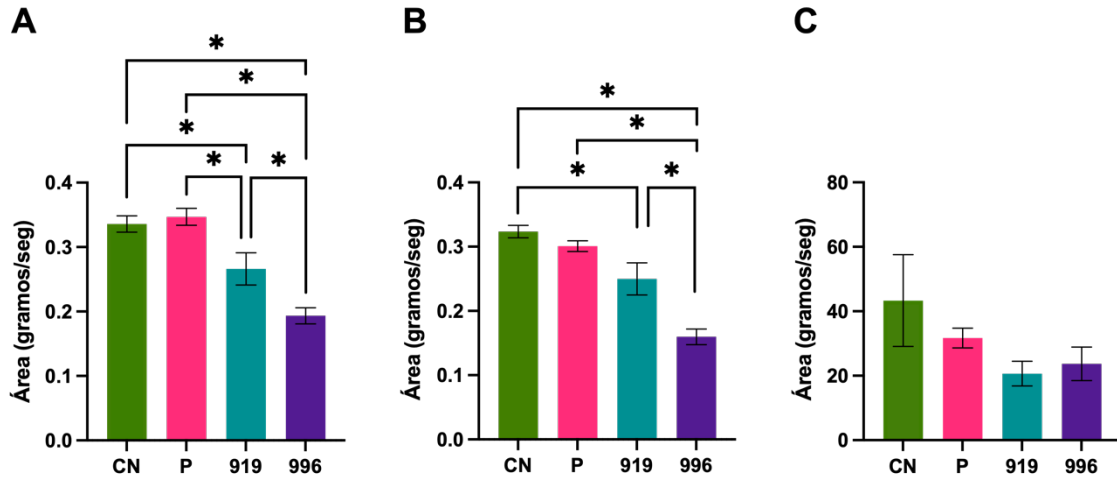


Figura 23. Área bajo la curva de los cMAP obtenidos en el estudio electrofisiológico en ratas expuestas a los carbamatos. Las barras representan las medias (\pm) el error estándar. Estímulos de baja frecuencia, B. Estímulos de alta frecuencia y C. Desvanecimiento tetánico. CN: Control negativo, P: Propoxur, 919: LQM 919, 996: LQM 996. (*) representan diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$).

El porcentaje de decremento de amplitud se representa en la Figura 24, en la cual, se puede observar disminución del porcentaje de amplitud de los grupos tratados respecto al grupo control pero no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

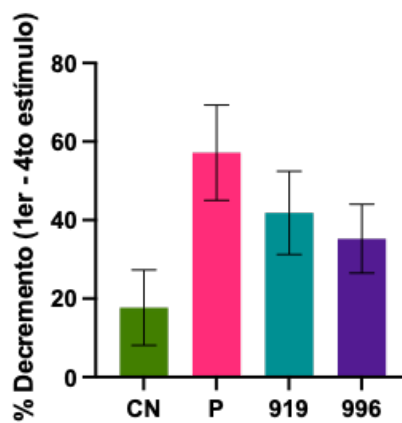


Figura 24. Porcentaje de decremento de amplitud del cMAP durante el desvanecimiento tetánico. Los porcentajes se representan como las medias (\pm) el error estándar. CN: Control negativo, P: Propoxur, 919: LQM 919, 996: LQM 996. No se presentó diferencia significativa entre grupos ($p > 0.05$).

En la Figura 25 se muestran la representación de las amplitudes obtenidas del electromiograma durante el desvanecimiento tetánico con los carbamatos LQM 919, LQM 996 y propoxur. Se observa un patrón de decremento en el grupo control y un patrón de decremento-incremento con variación de la amplitud en los grupos de ratas tratadas con propoxur y etil carbamatos.

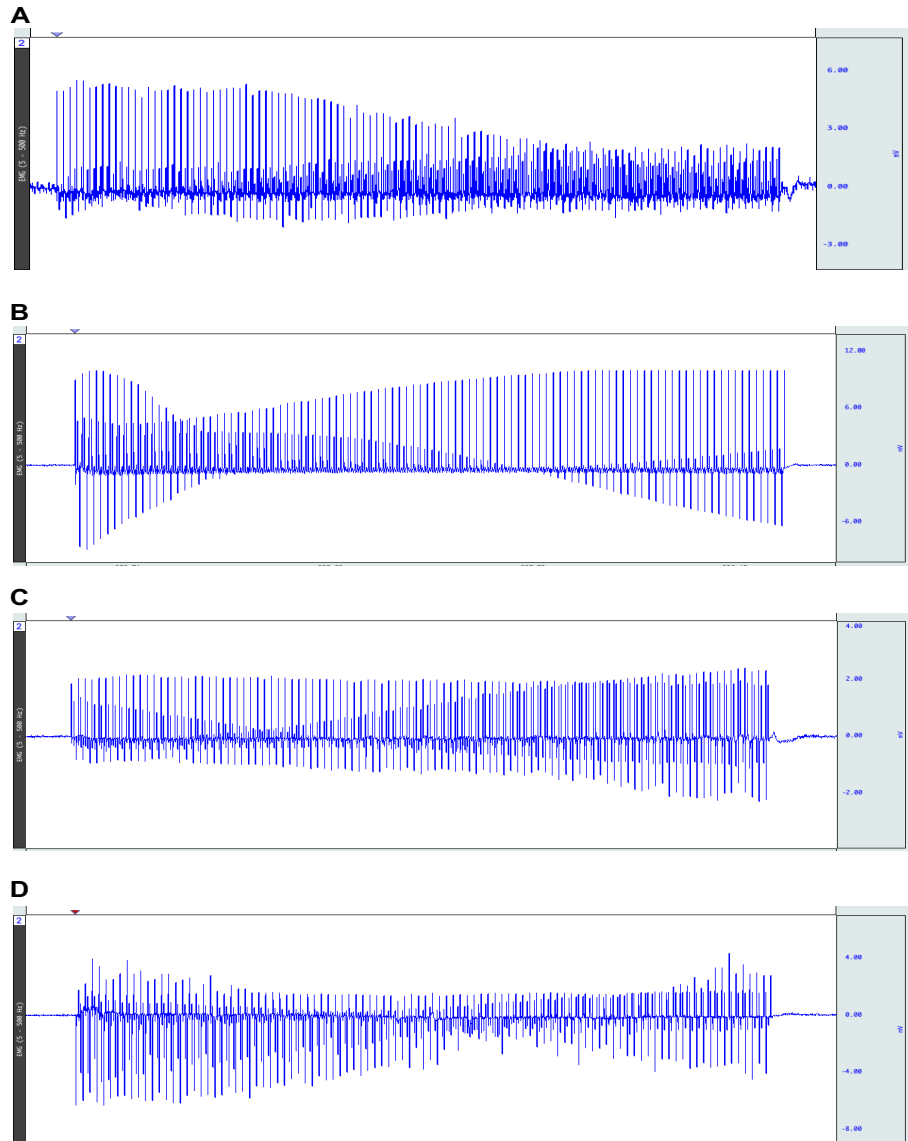


Figura 25. Representación del patrón decremento-incremento del electromiograma obtenido a través de estímulos de desvanecimiento tetánico en rata del grupo control (A), y ratas tratadas con propoxur (B), LQM 919 (C) y LQM 996 (D).

DISCUSIÓN

Una forma para determinar del potencial neurotóxico de un compuesto está basada en la inhibición de la reacción entre la enzima AChE y su sustrato mediante técnicas colorimétricas que aportan resultados cuantitativos (Badawy, 2020). Las enzimas colinesterasas de vertebrados son codificadas por dos genes distintos: la colinesterasa verdadera o acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7), y la colinesterasa plasmática o butirilcolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8). La AChE presenta actividad elevada específica en el cerebro y los tejidos nerviosos, así como en las membranas de los músculos y los eritrocitos. La BChE está presente en otros tejidos, como el hígado y después de ser sintetizada es secretada al plasma (Sánchez-Chávez et al., 2008). Por lo tanto, no hay relación alguna entre la distribución de ambas colinesterasas en los tejidos. En el presente trabajo, se utilizaron dos fuentes de enzima, la AChE de cerebro para evaluar la neurotoxicidad en SNC y AChE de fantasmas de eritrocitos para evaluar la neurotoxicidad a nivel de las uniones neuromusculares.

La inhibición de la actividad de AChE se ha tomado como un biomarcador sensible para evaluar los efectos neurotóxicos de los plaguicidas sobre organismos objetivo y no objetivo en diferentes ecosistemas (Yadav et al., 2017). Los compuestos organofosforados y carbamatos tienen como mecanismo de acción la inhibición de la AChE en el sistema nervioso, siendo esta inhibición competitiva y reversible en el caso de los carbamatos mientras que en los organofosforados es no competitiva e irreversible (Yolima Nitola et al., 2016); sin embargo algunos carbamatos como el carbofurano reducen significativamente la actividad de la AChE por un mecanismo de inhibición no competitivo ya que se reduce la velocidad máxima de reacción (V_{max}) sin modificar la afinidad de la enzima por su sustrato (k_m). Gupta *et al.* (2016.) sugieren que lo anterior se debe a que la AChE de cerebro de rata contiene al menos un residuo de serina en el sitio catalítico carbamilado por el carbofurano causando esta inhibición de tipo no competitiva. En el presente estudio, tanto el propoxur como

los etil carbamatos ocasionaron una disminución del valor de V_{max} ($p < 0.05$) y no hubo diferencias entre los valores de k_m ($p > 0.05$) en la enzima de cerebro de las ratas tatadas, sin embargo en la enzima extraída de fantasmas de eritrocitos sólo el propoxur produjo una reducción en la V_{max} ($p < 0.05$). Estos resultados sugieren que estos carbamatos pueden generar reacciones de inhibición de tipo irreversible sobre la AChE de cerebro como sucede en el caso del carbofurano (Keifer & Firestone, 2007), se requieren mayores estudios para esclarecer este efecto.

Un criterio para evaluar el poder inhibitorio de una sustancia química sobre la AChE es la determinación de la constante de reacción bimolecular (k_i); valores elevados de esta constante indican un mayor poder inhibitorio (Yi et al., 2006). De Souza et al., (2018) evaluaron los efectos de distintos carbamatos, entre ellos, el carbaril y el propoxur sobre la AChE de *Crassostrea rhizophorae* donde observaron que el carbaril presentaba un valor de k_i mayor que en el propoxur, lo cual indicó un mayor poder inhibitorio a concentraciones milimolares. Yi et al., (2006) también investigaron sobre la AChE de cerebro de *Carassius auratus* y encontraron que la k_i del carbofurano fue mayor que los otros tres carbamatos probados mostrando que el potencial inhibitorio de AChE en cerebro, el carbofuran fue el carbamato con mayor poder inhibitorio. En este estudio, los valores de k_i de los carbamatos LQM 919 y LQM 996 fueron significativamente menores que los del propoxur ($p < 0.05$), lo que indicó un menor poder inhibitorio de estos carbamatos sobre la AChE de fantasmas de eritrocitos y cerebro de ratas.

Los carbamatos que reaccionan con la AChE forman un complejo reversible en la ahora enzima carbamilada. La constante de carbamilación (k_2) refleja la tasa de formación del complejo enzima-inhibidor (Iturbe-Requena, Prado-Ochoa, Muñoz-Guzmán, et al., 2020). Se ha reportado que la velocidad de carbamilación del propoxur es menor que otros carbamatos como el carbofuran (Yi et al., 2006). En este estudio, se observó que los valores de k_2 fueron significativamente superiores para el propoxur en comparación con los etil carbamatos LQM 919 y LQM 996,

demostrando que la tasa de formación o carbamilación de este complejo es mayor en el propoxur.

La constante de disociación (k_d) indica la afinidad del inhibidor por la AChE y es inversamente proporcional a la k_i , valores más pequeños de k_d resultan en una mayor afinidad por la AChE (Patil et al., 2019). En este estudio, también se observó que los etil carbamatos presentaron una k_d más alta ($p < 0.05$) respecto al propoxur, lo que indicó que la afinidad del propoxur por la AChE de rata es mayor que la de los etil carbamatos. En estudios previos se determinó la cinética de inhibición de LQM 919, LQM 996 y propoxur en AChE de *R. microplus*, *E. foetida* y *A. mellifera* donde se encontraron resultados similares en relación a las constantes k_i , k_d y k_2 (Iturbe-Requena et al., 2019a; Iturbe-Requena, Prado-Ochoa, Muñoz-Guzmán, et al., 2020; Pérez-González et al., 2014b).

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima crucial en el sistema nervioso, responsable de la degradación del neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis. En mamíferos, se ha identificado que esta enzima presenta tres variantes, generadas a partir de modificaciones postraduccionales de un mismo gen, y que se expresan bajo ciertas condiciones fisiológicas (Sánchez-Chávez et al., 2008) y esto podría provocar pequeñas variaciones de susceptibilidad a los pesticidas entre las diferentes especies de mamíferos. Ruppert et al. (1983) estudiaron cambios de comportamiento y actividad de ACh de ratas en cerebro y fantasmas de eritrocitos. Tanto el carbaril como el propoxur produjeron una inhibición rápida y de corta duración de la ACh ya que dentro de los 15 minutos posteriores a la inyección intraperitoneal, se encontró la máxima inhibición de la enzima, correspondiente a la máxima disminución de la actividad motora. La actividad de ACh cerebral se redujo en un 42% con carbaril (16 mg/kg) y en un 53% con propoxur (2 mg/kg). La actividad de la ACh en fantasmas de eritrocitos se redujo en un 46% de con ambos carbamatos.

Estudios previos en *R. microplus* demostraron que los etil-carbamatos reducen la actividad de AChE en menos del 40%, mientras que el propoxur la inhibe en un 99%. En estudios de ecotoxicidad, se observó que los etil-carbamatos redujeron la actividad de la AChE de *Apis mellifera* hasta en un 30%, siendo estos carbamatos al menos 10 veces menos letales que el propoxur. Sin embargo, en *Eisenia foetida*, la actividad de la AChE se redujo en un 100% tanto con los etil carbamatos como con el propoxur (Iturbe-Requena et al., 2019b; Iturbe-Requena, Prado-Ochoa, Muñoz-Guzmán, et al., 2020; Prado-Ochoa et al., 2014). En estudios como el de (De Vita et al., 2016), se encontró que el carbaril y otros nuevos carbamatos pueden reducir hasta en un 90% de la actividad de AChE de anguila eléctrica a concentraciones milimolares.

Las diferencias observadas en relación a la reducción de actividad de la AChE que producen los LQM 919 y LQM 996 entre las especies previamente reportadas subrayaron la importancia de determinar la reducción de actividad de AChE en mamíferos. Por lo anterior, en el presente estudio se determinaron los porcentajes de reducción de la actividad de AChE de ratas tanto *in vitro* como en ratas tratadas por vía oral con los etil carbamatos o el propoxur. El propoxur, tanto en los estudios *in vitro* (0.25 mM) como en las ratas tratadas (2 mg/kg) inhibió hasta en un 80% la actividad de la AChE mientras que, el LQM 919 y el LQM 996 tanto *in vitro* (6.25 M) como en ratas tratadas (50 mg/kg) produjeron un porcentaje de reducción de actividad de AChE menor al 20%.

Lo anterior indicó una menor susceptibilidad de las ratas a sufrir efectos neurotóxicos por la exposición al LQM 919 o LQM 996 que al propoxur y también una menor susceptibilidad comparado con las otras especies reportadas. Sin embargo, se remarca la importancia de estudiar la reducción de actividad de AChE en diferentes especies debido a la variación que se presenta.

Un biomarcador importante de la neurotoxicidad ocasionada por la administración de un compuesto es la evaluación de los efectos producidos a nivel de la placa

neuromuscular. Los estudios electrofisiológicos son una técnica esencial para cuantificar la función nerviosa periférica debido a su fiabilidad, reproducibilidad y objetividad. Los estudios de conducción nerviosa miden la función nerviosa periférica directamente sin sesgo subjetivo y sin contaminación por las vías del sistema nervioso central (Bril et al., 1998).

Al utilizar estímulos de baja frecuencia, la contracción muscular se puede caracterizar por una baja capacidad de generación de fuerza y una alta resistencia a la fatiga. Cuando se requiere mayor fuerza y contracciones más rápidas, las unidades motoras reclutadas son fatigables (Guzmán-Muñoz & Guillermo Méndez-Rebolledo, 2018). Por anterior en el presente estudio, los estímulos se realizaron a diferentes frecuencias (1-3 y 10-30 Hz).

En el presente estudio, se analizaron los parámetros fisiológicos de amplitud, duración, el área bajo la curva y latencia del cMAP en ratas tratadas con 2 mg/kg de propoxur o 50 mg/kg de LQM 919 o LQM 996. Una contracción muscular máxima genera el reclutamiento de casi el 100% de la cantidad de unidades motoras para activar al músculo. Esto indica que la amplitud es equivalente al porcentaje de activación del músculo. En este estudio se utilizaron estímulos supramáximos capaces de activar un potencial de acción mediante una caracterización de estímulos. Es por lo anterior que a diferentes frecuencias, el valor de la amplitud no debe atribuirse de inmediato a los cambios en el reclutamiento de las unidades motoras ya que la amplitud de la señal también se puede ver influida por el potencial de cada fibra muscular, la sincronización de las descargas y la fatiga. El parámetro de duración indica el tiempo comprendido desde el inicio de la activación muscular hasta que vuelve a su estado de reposo, por lo que el valor del área bajo la curva está estrechamente relacionado con la amplitud y la duración. Por lo tanto amplitudes más altas con duración prolongada darían como resultado un aumento del área bajo la curva del potencial de acción muscular compuesto (cMAP) y la latencia se refiere al tiempo que tarda el músculo en activarse al recibir una señal en SNC (Moritani et al., 2004).

Se realizó una caracterización de estímulos para determinar el voltaje necesario para producir un potencial de acción. La administración de propoxur demandó un voltaje significativamente mayor en el estimulador en comparación con el grupo control y los grupos tratados con LQM 919 y LQM 996 ($p < 0.05$). Los pesticidas organofosforados y carbamatos interactúan directamente con los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), causando su supresión y además afectan a estos receptores independientemente de la inhibición de la AChE (Chang et al., 1988; Smulders et al., 2003). Los efectos sobre los nAChR neuronales contribuyen al aumento de toxicidad de algunos carbamatos y estos efectos pueden provocar cambios a largo plazo en el sistema nervioso. Por lo anterior y de acuerdo a los resultados de este estudio, se infiere que debido a que el propoxur es un inhibidor potente y de alta afinidad a la AChE, fue necesario aumentar el voltaje para producir un potencial de acción, lo que a su vez incrementó la liberación de neurotransmisor por estimulación cuantal de la ACh, generando un bloqueo más marcado en comparación con el grupo control y los grupos tratados con LQM 919 y LQM 996.

En los parámetros analizados se observaron aumentos significativos en la amplitud de los cMAPs en el grupo tratado con LQM 996 respecto al resto de los grupos ($p < 0.05$). Estudios similares, como el de Corbel et al. (2019), demostraron que la aplicación de DEET (N,N-diethyl-meta-toluamide), un repelente de insectos con acción sobre la AChE, produjo un aumento de la amplitud en los potenciales de acción, un efecto que fue más pronunciado con concentraciones más altas. Este fenómeno se ha observado previamente con anticolinesterásicos como los carbamatos, reflejando cambios en la actividad de la transmisión sináptica. Este grupo de investigadores también demostró que el DEET prolongaba unas tres veces la constante de tiempo de decaimiento de los potenciales sinápticos (duración del potencial de acción) en las regiones de la placa terminal de la fibra muscular. En el presente estudio se observó una diferencia significativa de la duración en el grupo tratado con propoxur respecto al grupo control ($p < 0.05$). Este hallazgo concuerda con otros estudios sobre inhibidores de la AChE, que permiten que la ACh persista

en la hendidura sináptica y active repetidamente los receptores nicotínicos de ACh de la placa terminal (Colovic et al., 2013; Flores Soto, 2005; Smulders et al., 2003).

Aunque la amplitud sólo fue significativamente mayor en el grupo tratado con LQM 996 debido a la facilitación de la ACh, este grupo mostró un decremento significativo en la duración en comparación con los demás grupos ($p < 0.05$), lo que podría indicar una mayor capacidad de contrarrestar el efecto por una menor afectación del daño a nivel de la membrana plasmática de la fibra muscular.

Las ratas tratadas con LQM 919 presentaron un aumento significativo en la latencia respecto al resto de los grupos ($p < 0.05$), lo que podría estar relacionado con lo mencionado anteriormente. Este retardo podría explicar la tendencia a la disminución de la amplitud, aunque no significativa del LQM 919 respecto a los otros grupos ($p > 0.05$) observada en ese parámetro. Además, se ha descrito que el aumento de la concentración de calcio (Ca^{+2}) resulta en un aumento de la liberación de neurotransmisor, lo que genera un aumento de la amplitud, aumento de la duración y disminución de la latencia (Moreno et al., 2005).

En las ratas tratadas con etil carbamatos LQM 919 y LQM 996 se observó una disminución del área bajo la curva de los potenciales de acción respecto al grupo control ($p < 0.05$), siendo más notable en el grupo tratado con LQM 996, indicando una alteración en la transmisión nerviosa bajo los efectos de estos compuestos. Estas diferencias en los parámetros electrofisiológicos sugieren que, aunque ambos etil-carbamatos afectan la función neuromuscular, el LQM 996 tiene un impacto más pronunciado en la amplitud y duración de los estímulos, mientras que el LQM 919 afecta más la latencia.

(Duez et al., 2010) durante su estudio observaron que la amplitud y el área bajo la curva se ven afectados debido al aumento de actividad eléctrica generada por hipertrofia en pacientes que entrenaban en comparación con los que no entrenaban, mostrando un incremento significativo tanto de la amplitud como del área bajo la

curva en comparación con los no entrenados ($p < 0.05$). Este aumento de la actividad eléctrica y la reducción de las amplitudes del potencial de acción podría indicar una pérdida en el número de unidades motoras, una disminución de fibras musculares activadas o un cambio en la excitabilidad de las fibras musculares, siendo este último el comparativo respecto a los resultados obtenidos por la inhibición de la AChE. Sin embargo, nuestros resultados mostraron una disminución del área bajo la curva ($p < 0.05$) en los etil carbamatos respecto a los demás grupos, lo que podría significar que, aunque existe alteración en otros parámetros, la actividad eléctrica o el flujo de electrones circulantes durante el potencial de acción no se ven afectados, especialmente en los estímulos de baja frecuencia en comparación con los de alta frecuencia. La disminución de la duración podría explicarse por la entrada masiva de sodio (Na^+), llevando la membrana de vuelta a su potencial de equilibrio a través de la hiperpolarización inducida por la entrada de potasio (K^+), que debe alcanzar su potencial de equilibrio para contrarrestar los efectos del Na^+ (Nicholls et al., 2012). Estos efectos podrían influenciar la duración y el área bajo la curva, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio.

Durante el desvanecimiento tetánico, no se observaron diferencias significativas en los parámetros electrofisiológicos de amplitud, latencia y área bajo la curva tanto con estímulos de baja frecuencia y como de alta frecuencia ($p > 0.05$) sin embargo se presentó un patrón claro de decremento-incremento (Figura 25), este patrón es de gran interés para explicar los procesos de transmisión neuromuscular (Bhatt et al., 2007). Los patrones decremento-incremento de las ratas tratadas con propoxur o con los etil-carbamatos mostraron una tendencia al aumento del porcentaje de decremento. Este patrón podría explicarse debido a la inhibición inicial de la enzima AChE, que, con estímulos de alta frecuencia, lleva a una acumulación exacerbada de ACh en la hendidura sináptica. Sin embargo, dado que la inhibición de los carbamatos es principalmente reversible, la acción inhibitoria sobre la AChE puede disminuir con el aumento en la liberación de ACh. Según (Lorenzoni et al., 2010), el síndrome intermedio (IMS) se caracteriza por una disfunción sináptica de la

transmisión neuromuscular. Se cree que el síndrome intermedio es el resultado de un exceso persistente de acetilcolina (ACh) debido a la inhibición de la AChE. La velocidad de conducción nerviosa no se ve afectada pero la estimulación nerviosa única evoca un cMAP repetitivo. El patrón de decremento-incremento se produce inicialmente en respuesta a la estimulación de alta frecuencia (20 Hz y 30 Hz) y se puede observar como inicialmente con la estimulación de alta frecuencia cambia a una combinación de incremento decreciente y desvanecimiento repetitivo. Este patrón se observó a las dos horas de la administración de los etil-carbamatos o el propoxur, se requieren mayores estudios para determinar si el IMS puede ser ocasionado por la administración de estos carbamatos.

Durante el análisis de los parámetros de este trabajo, en el grupo control negativo, la acumulación de ACh ante estímulos repetitivos de alta frecuencia no puede ser hidrolizada eficientemente por la AChE, lo que, junto con otros mecanismos como el agotamiento de las reservas de Ca^{2+} y la disminución de ATP, genera fatiga muscular. Al administrar inhibidores de la AChE, se bloquea temporalmente la degradación de ACh, resultando en una acumulación prolongada de esta en la hendidura sináptica. Esto lleva a una recuperación temporal de la función muscular, pero con contracciones repetidas, eventualmente se podría generar fatiga muscular (Guzmán-Muñoz & Guillermo Méndez-Rebolledo, 2018).

Los resultados de los estudios electrofisiológicos, combinados con los estudios previos sugieren que la administración de carbamatos y otros inhibidores de la AChE tiene efectos complejos sobre la transmisión neuromuscular, incluyendo patrones de decremento-incremento que reflejan cambios en la acumulación de ACh y la actividad de la AChE.

CONCLUSIONES

Durante este estudio, tanto el propoxur como los etil carbamatos disminuyeron significativamente la V_{max} sin afectar a la k_m , indicando que los etil carbamatos presentan capacidad de generar reacciones de inhibición irreversible, aunque menos potentes que el propoxur.

Los resultados obtenidos de las constantes de inhibición de actividad *in vitro* e *in vivo* sugieren que el propoxur es un inhibidor más potente y con mayor afinidad hacia la AChE que los etil carbamatos LQM 919 y LQM 996, los cuales fueron clasificados como inhibidores débiles y de baja afinidad.

El estudio electrofisiológico mostró que el LQM 996 aumenta significativamente la amplitud y duración de los potenciales de acción, mientras que el LQM 919 aumenta la latencia. Ambos etil carbamatos afectaron la transmisión neuromuscular de manera diferente pero con un impacto menor comparado con el propoxur. Además, se observaron patrones de decremento e incremento en la actividad muscular en las ratas tratadas con carbamatos, lo que sugiere una posible acumulación de acetilcolina en la hendidura sináptica. Estos hallazgos muestran la variabilidad de efectos de los inhibidores de la AChE en la función neuromuscular y destacan la importancia de evaluar múltiples parámetros electrofisiológicos para comprender completamente su impacto.

Con lo anterior, se concluye que los etil carbamatos LQM 919 y LQM 996, propuestos para el control de garrapatas, presentan un bajo potencial neurotóxico en ratas. Dado que son inhibidores débiles y de baja afinidad a la AChE, se considera que su administración no representan un riesgo significativo para el sistema nervioso central ni para las uniones neuromusculares de ratas tratadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Amadori, A. (2017). Fisiología de la unión neuromuscular. *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas*, 9(1), 25–45.
<https://www.arsmedica.cl/index.php/MED/article/view/972>
- 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. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 504(1–3), 141–170. [https://doi.org/10.1016/S0166-1280\(00\)00361-4](https://doi.org/10.1016/S0166-1280(00)00361-4)
- Avendano-Reyes, L., Macias-Cruz, U., & Correa-Calderón, A. (2021a). Parasites, external: Tick infestations. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Third Edition*, 1(1992), 444–450. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818766-1.00068-4>
- Avendano-Reyes, L., Macias-Cruz, U., & Correa-Calderón, A. (2021b). Parasites, external: Tick infestations. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Third Edition*, 1(1992), 444–450. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818766-1.00068-4>
- Badawy, S. M. (2020). Validation and kinetic of enzymatic method for the detection of organophosphate insecticides based on cholinesterase inhibition. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 30(2), 134–138.
<https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1669248>
- Bernal-Hernández, Y. Y., Aguilera-Márquez, D., Grajeda-Cota, P., Toledo-Ibarra, G. A., Moreno-Godínez, M. E., Perera-Ríos, J. H., Urióstegui-Acosta, M. O., Rojas-García, A. E., Medina-Díaz, I. M., Barrón-Vivanco, B. S., & González-Arias, C. A. (2018). Actividad acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BUCHE) en poblaciones mexicanas: Estudio piloto. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 34, 25–32.
<https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.ESP02.02>
- Bhatt, S. B., Kohl, J., Amann, A., & Nigrovic, V. (2007). The relationship between twitch depression and twitch fade during neuromuscular block produced by

- vecuronium: correlation with the release of acetylcholine. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 4(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-4-24>
- Bonfilio, B. M. (2023). Carbamate poisoning as a cause of cholinergic syndrome and differences in the treatment of organophosphate poisoning. *Medicina Interna de Mexico*, 39(4), 692–695. <https://doi.org/10.24245/mim.v39i4.6882>
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Bril, V., Ellison, R., Ngo, M., Bergstrom, B., Raynard, D., & Gin, H. (1998). Electrophysiological monitoring in clinical trials. *Muscle & Nerve*, 21(11), 1368–1373. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(199811\)21:11<1368::AID-MUS2>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(199811)21:11<1368::AID-MUS2>3.0.CO;2-7)
- Castro, B. L. . M. M. E. ; (2013). *Respuestas a la aplicación de carbamatos en dos aislados rizobianos provenientes de mucuchíes, estado Mérida, Venezuela*. 25(2), 117–128. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612013000200005
- Chang, C. C., Chen, S. M., & Hong, S. J. (1988). Reversals of the neostigmine-induced tetanic fade and endplate potential run-down with respect to the autoregulation of transmitter release. *British Journal of Pharmacology*, 95(4), 1255–1261. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1988.tb11762.x>
- Chen, Z., Newcomb, R., Forbes, E., McKenzie, J., & Batterham, P. (2001). The acetylcholinesterase gene and organophosphorus resistance in the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(8), 805–816. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00186-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00186-7)
- Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159x11311030006>
- Córdoba, D., Cadavid, I., & Ramos, J. (2001). Inhibidores de colinesterasas. En D.

- Córdoba (Ed.), *Toxicología* (4ta edición, pp. 127-141). Manual Moderno.
- Contreras, M., San José, C., Estrada-Peña, A., Talavera, V., Rayas, E., Isabel León, C., Luis Núñez, J., García Fernández de Mera, I., & de la Fuente, J. (2020). Control of tick infestations in wild roe deer (*Capreolus capreolus*) vaccinated with the Q38 Subolesin/Akirin chimera. *Vaccine*, 38(41), 6450–6454. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.07.062>
- Cunningham, J. G. (2014). *Cunningham fisiología veterinaria* (B. G. Klein (ed.); 5th ed.). Elsevier.
- de Souza, P. R., de Souza, K. S., de Assis, C. R. D., de Araújo, M. C., Silva, K. C. C., de Fátima Xavier da Silva, J., Ferreira, A. C. M., da Silva, V. L., Adam, M. L., de Carvalho, L. B., & de Souza Bezerra, R. (2018). Acetylcholinesterase of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: A highly thermostable enzyme with promising features for estuarine biomonitoring. *Aquatic Toxicology*, 197(January), 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.008>
- De Vita, D., Pandolfi, F., Ornano, L., Feroci, M., Chiarotto, I., Sileno, I., Pepi, F., Costi, R., Di Santo, R., & Scipione, L. (2016). New N,N-dimethylcarbamate inhibitors of acetylcholinesterase: design synthesis and biological evaluation. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(September), 106–113. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1220377>
- Duez, L., Qerama, E., Fuglsang-Frederiksen, A., Bangsbo, J., & Jensen, T. S. (2010). Electrophysiological characteristics of motor units and muscle fibers in trained and untrained young male subjects. *Muscle and Nerve*, 42(2), 177–183. <https://doi.org/10.1002/mus.21641>
- Dzemo, W. D., Thekiso, O., & Vudriko, P. (2022). Development of acaricide resistance in tick populations of cattle: A systematic review and meta-analysis. *Heliyon*, 8(1), e08718. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08718>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

- Escobar-Chavarría, O., Cossío-Bayúgar, R., Ramírez-Noguera, P., Prado-Ochoa, M. G., Velázquez-Sánchez, A. M., Muñoz-Guzmán, M. A., Angeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2021). In vivo and in vitro apoptosis induced by new acaricidal ethyl-carbamates in *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *12*(1), 101603. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2020.101603>
- Flores Soto, S. T. (2005). Estructura y función de los receptores nicotínicos. *Rev Mex Neuroci*, *6*(4), 315–326.
- Ganong. (2012). *Ganong's Review of Medical Physiology* (H. L. Barrett, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., Brooks (ed.); 24th ed.). McGraw-Hill Education.
- García, A. L., & Rosa, J. P. C. de la. (2015). Miastenia gravis y trastornos relacionados con la unión neuromuscular. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, *11*(75), 4504–4510. <https://doi.org/10.1016/j.med.2015.03.002>
- Gupta, V. K., Pathak, A., Siddiqi, N. J., & Sharma, B. (2016). Carbofuran Modulating Functions of Acetylcholinesterase from Rat Brain In Vitro . *Advances in Biology*, *2016*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/3760967>
- Guzmán-Muñoz, E., & Guillermo Méndez-Rebolledo. (2018). Electromiografía en las Ciencias de la Rehabilitación. *Salud Uninorte*, *34*(3), 753–765. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81759607022>
- Hallett, D. H. (1962). Otto Loewi, 1873-1961. *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society*, *8*, 67–89. <https://doi.org/10.1098/rsbm.1962.0006>
- Iturbe-Requena, S. L., Prado-Ochoa, M. G., Muñoz-Guzmán, M. A., Carrillo-Miranda, L., Velázquez-Sánchez, A. M., Ángeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2020). Acute oral and contact toxicity of new ethyl-carbamates on the mortality and acetylcholinesterase activity of honey bee (*Apis mellifera*). *Chemosphere*, *242*, 125293. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125293>
- Iturbe-Requena, S. L., Prado-Ochoa, M. G., Muñoz-Guzmán, M. A., Velázquez-Sánchez, A. M., Ángeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2019a). *Toxic effects of new ethyl-carbamates on the morphology, mortality and acetylcholinesterase*

- activity of Eisenia foetida*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.094>
- Iturbe-Requena, S. L., Prado-Ochoa, M. G., Muñoz-Guzmán, M. A., Velázquez-Sánchez, A. M., Ángeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2019b). Toxic effects of new ethyl-carbamates on the morphology, mortality and acetylcholinesterase activity of *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *176*, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.094>
- Iturbe-Requena, S. L., Prado-Ochoa, M. G., Velázquez-Sánchez, A. M., García-Hernández, F., Cossío-Bayúgar, R., Muñoz-Guzmán, M. A., Ángeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2020). Oogenesis and embryogenesis inhibition induced by two new ethyl-carbamates in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *11*(2), 101326. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2019.101326>
- Iván Rodríguez-Vivas, R., Rosado-Aguilar, A., Ojeda-Chi, M. M., Carlos Pérez-Cogollo, L., Trinidad-Martínez, I., & Bolio-González, M. E. (2014). *Integrated control of ticks in bovine livestock* (Vol. 1, Issue 3). www.ujat.mx/era
- Jacob, L. (2023). Acetylcholine. En Salem Press Encyclopedia of Science. <https://salempress.com/science>
- Keifer, M. C., & Firestone, J. (2007). Neurotoxicity of pesticides. *Journal of Agromedicine*, *12*(1), 17–25. https://doi.org/10.1300/J096v12n01_03
- López-Durán, R. M., Valencia-Quintana, R., Sánchez-Alarcón, J., Pérez-Aguilar, B., Salinas-Arreortua, N., Serrano, H., García-Suárez, M. D., Muñoz-Nava, H., Hernández-Hernández, Á., Vidal-Moreno, C., & Gómez-Olivares, J. L. (2018). La estructura y función de las colinesterasas: Blanco de los plaguicidas. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, *34*, 69–80. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.ESP02.06>
- Lorenzoni, P. J., Gasparetto, J., Kay, C. S. K., Scola, R. H., & Werneck, L. C. (2010). An electrophysiological study of the intermediate syndrome of organophosphate poisoning. *Journal of Clinical Neuroscience*, *17*(9), 1217–1219. <https://doi.org/10.1016/J.JOCN.2009.11.016>
- Luna González, C. R., & Valencia Plata, E. (2008). *Actividad de acetilcolinesterasa*

como método de diagnóstico en intoxicaciones accidentales por compuestos organofosforados.

<http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02029a&AN=tes.TES01000636748&lang=es&site=eds-live>

- Martin, A. R., Brown, D. A., Diamond, M. E., Cattaneo, A., De-Miguel, F. F., & Nicholls, J. (2020). *From Neuron to Brain* (6th ed.). Oxford University Press USA.
- Mayer, E. A., Saper, C. B., Janig, W., & Habler, H.-J. (2000). Specificity in the organization of the autonomic nervous system: a basis for precise neural regulation of homeostatic and protective body functions. In *Progress in Brain Research* (Vol. 122).
- Michel, F., Tatu, L., Cosson, A., & Nollet, S. (2017). Práctica clínica y electroneuromiográfica de las lesiones nerviosas periféricas de los miembros inferiores. *EMC - Podología*, 19(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S1762-827X\(16\)82632-2](https://doi.org/10.1016/S1762-827X(16)82632-2)
- Moraes, N., Nicaretta, J. E., Rodrigues, D. de C., Gonzaga, B. C. F., Barrozo, M. M., Vale, F. L., Pereira e Sousa, L. J., Coutinho, A. L., Gomes, G. W., Teixeira, W. F. P., Lopes, W. D. Z., & Monteiro, C. (2023). Comparison of the efficacy of different methods to apply acaricides for control of *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 14(4). <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102190>
- Morgado Valle, C. (2002). Estructura-Función de un motivo en el dominio citoplasmático del receptor nicotínico de acetilcolina (Tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad académica de los ciclos profesional y posgrado del colegio de ciencias y humanidades.
- Moreno, H., Moreno, H., Moreno, C., & Moreno, C. (2005). Transmisión sináptica - canales de calcio y liberación de neurotransmisores. *Neurology*, 3(1), 47–61.
- Moritani, T., Stegeman, D., & Merletti, R. (2004). Basic Physiology and Biophysics of EMG Signal Generation. In *Electromyography* (pp. 1–25). Wiley. <https://doi.org/10.1002/0471678384.ch1>

- Nicholls, J. G., Martin, A. R., Fuchs, P. A., Brown, D. A., Diamond, M. E., & Weisblat, D. A. (2012). From neuron to brain, 5th ed. In *From neuron to brain, 5th ed.*
- Nicholson, W. L., Sonenshine, D. E., Noden, B. H., & Brown, R. N. (2018). Ticks (ixodida). In *Medical and Veterinary Entomology* (pp. 603–672). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00027-3>
- Obis Ibáñez, T. (2014). La Proteína quinasa C épsilon en la unión neuromuscular de mamífero adulto: localización, regulación mediante actividad sináptica y acoplamiento a la liberación de acetilcolina tesi doctoral. *Universitat Rovira i Virgili.*, xii, 211. <http://ccuc.cbuc.cat/record=b6307453~S23%2Acat>
- Patil, D. N., Patil, S. A., Sistla, S., & Jadhav, J. P. (2019). Comparative biophysical characterization: A screening tool for acetylcholinesterase inhibitors. *PLoS ONE*, 14(5), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215291>
- Pérez-González, I. E., Prado-Ochoa, M. G., Muñozmuñuñoz-Guzmán, M. A., Vázquez-Valadez, V. H., Velázquez-Sánchez, A. M., Avila-Suárez, B. L., Cuenca-Verde, C., Angeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2014a). Effect of new ethyl and methyl carbamates on Rhipicephalus microplus larvae and adult ticks resistant to conventional ixodicides. *Veterinary Parasitology*, 199, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.042>
- Pérez-González, I. E., Prado-Ochoa, M. G., Muñozmuñuñoz-Guzmán, M. A., Vázquez-Valadez, V. H., Velázquez-Sánchez, A. M., Avila-Suárez, B. L., Cuenca-Verde, C., Angeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2014b). Effect of new ethyl and methyl carbamates on Rhipicephalus microplus larvae and adult ticks resistant to conventional ixodicides. *Veterinary Parasitology*, 199, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.042>
- Perkins, E. J., & Schlenk, D. (2000). In vivo acetylcholinesterase inhibition, metabolism, and toxicokinetics of aldicarb in channel catfish: Role of biotransformation in acute toxicity. *Toxicological Sciences*, 53(2), 308–315. <https://doi.org/10.1093/toxsci/53.2.308>
- Prado-Ochoa, M G, Muñozmuñuñoz-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.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.026>
- Prado-Ochoa, M G, Ramírez-Noguera, P., Díaz-Torres, R., Garrido-Fariña, G. I., Fariña, F., Vázquez-Valadez, V. H., Velázquez-Sánchez, A. M., Muñozmuñoz-Guzmán, M. A., Angeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2014). The action of two ethylcarbamates on acetylcholinesterase and reproductive organs of *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, *199*, 215–224.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.028>
- Prado-Ochoa, María Guadalupe, Abrego-Reyes, V. H., Velázquez-Sánchez, A. M., Muñoz-Guzmán, M. A., Ramírez-Noguera, P., Angeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2014). Subchronic toxicity study in rats of two new ethyl-carbamates with ixodocidal activity. *BioMed Research International*, *2014*.
<https://doi.org/10.1155/2014/467105>
- Prado-Ochoa, María Guadalupe, Gutiérrez-Amezquita, R. A., Abrego-Reyes, V. H., Velázquez-Sánchez, A. M., Muñoz-Guzmán, M. A., Ramírez-Noguera, P., Angeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2014). Assessment of acute oral and dermal toxicity of 2 ethyl-carbamates with activity against *Rhipicephalus microplus* in rats. *BioMed Research International*, *2014*(Lqm 919).
<https://doi.org/10.1155/2014/956456>
- Prado-Ochoa, María Guadalupe, Muñoz-Guzmán, M. A., Vázquez-Valadez, V. H., Velázquez-Sánchez, A. M., Salazar, A. M., Ramírez-Noguera, P., Angeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2016). Genotoxicity and cytotoxicity assessment of new ethyl-carbamates with ixodocidal activity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *807*, 8–14.
<https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2016.06.008>
- Pruett, J. H. (2002). Comparative Inhibition Kinetics for Acetylcholinesterases Extracted from Organophosphate Resistant and Susceptible Strains of

- Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology*, 95(6), 1239–1244. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.6.1239>
- Revuelta, J. A. O., Revuelta, J. A. O., Pública, V. Y. C. E. S., Rodríguez, I., Vivas, R., Rosado-Aguilar, A., Ojeda-Chi, M. M., Pérez-Cogollo, L. C., Trinidad-Martínez, I., Bolio-González, M. E., Echeverry, D. N. P., & Osorio, L. A. R. (2016). Integrated control of ticks in bovine livestock. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 17(3), 81–95.
http://hdl.handle.net/20.500.12324/33979,10.21930/rcta.vol17_num1_art:463,
<http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/view/463%0Awww.ujat.mx/era%0Ahttps://www.minsalud.gov.co/Documentos>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Alonso-Díaz, M. A., Rodríguez-Arevalo, F., Fragoso-Sanchez, H., Santamaria, V. M., & Rosario-Cruz, R. (2006). Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 136(3–4), 335–342.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.069>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Trees, A. J., Rosado-Aguilar, J. A., Villegas-Perez, S. L., & Hodgkinson, J. E. (2011). Evolution of acaricide resistance: Phenotypic and genotypic changes in field populations of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in response to pyrethroid selection pressure. *International Journal for Parasitology*, 41(8), 895–903. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.012>
- Romero Díaz, V. J., & Escamilla Chimal, E. G. (2009). *Análisis morfológico del efecto tóxico del fruto de la Karwinskia humboldtiana en el sistema nervioso central y periférico de ratas*.
<http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cab02029a&AN=tes.TES01000652646&lang=es&site=eds-live>
- Rosado-Aguilar, J. A., Rodríguez-Vivas, R. I., García-Vázquez, Z., Fragoso-Sanchez, H., Ortiz-Najera, A., & Rosario-Cruz, R. (2008). Development of amitraz resistance in field populations of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) undergoing typical amitraz exposure in the Mexican tropics. *Veterinary*

- Parasitology*, 152(3–4), 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.026>
- Ruppert, P. H., Cook, L. L., Dean, K. F., & Reiter, L. W. (1983). Acute behavioral toxicity of carbaryl and propoxur in adults rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 18(4), 579–584. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(83\)90284-8](https://doi.org/10.1016/0091-3057(83)90284-8)
- Sánchez-Chávez, G., Salceda, R., & rsalceda@ifc.unam.mx. (2008). *Enzimas Polifuncionales: El Caso de la Acetilcolinesterasa*. <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02032a&AN=per.PER01000364125&lang=es&site=eds-live>
- Smulders, C. J. G. M., Bueters, T. J. H., Van Kleef, R. G. D. M., & Vijverberg, H. P. M. (2003). Selective effects of carbamate pesticides on rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors and rat brain acetylcholinesterase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 193(2), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.07.011>
- Spencer, P. S., & Lein, P. J. (2014). Neurotoxicity. In *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* (pp. 489–500). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00169-X>
- Tsakirisa, S., Angelogiannia, P., Behrakisa, P., & Schulpisb, K. H. (2000). Protective Effect of L-Cysteine and Glutathione on Rat Brain Na⁺,K⁺-ATPase Inhibition Induced by Free Radicals. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 55(3–4), 271–277. <https://doi.org/10.1515/znc-2000-3-421>
- Wavreille, G., Baroncini, M., & Fontaine, C. (2011a). *Anatomía, histología y fisiología del nervio periférico*.
- Yadav, J., Singh, D., Yadav, J., & Kumar, D. (2017). Organophosphates and carbamates as inhibitors of acetylcholinesterase in *Eisenia fetida*. *Pollution Research*, 36(2), 277–281.
- Yi, M. Q., Liu, H. X., Shi, X. Y., Liang, P., & Gao, X. W. (2006). Inhibitory effects of four carbamate insecticides on acetylcholinesterase of male and female *Carassius auratus* in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 143(1), 113–116.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.12.008>

Yolima Nitola, L., Ricardo Muñoz, D., Javier Patiño, O., & Angélica Prieto, J. (2016). Phytochemical characterization and evaluation of the inhibitory activity of piper pesaresanum C. DC leaves against acetylcholinesterase. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(4), 1–10.