

INTRODUCCION

Para el mejoramiento de la salud bucodental, la ciencia ha estado siempre en constante investigación en la búsqueda de productos innovadores, que mejoren las propiedades de sus antecesores.

Debido al acelerado crecimiento y desarrollo urbano tecnológico, la sociedad busca cada vez más un producto que satisfaga todas sus necesidades curativas y preventivas, evitando así el uso de muchos medicamentos para aliviar sus distintas afecciones bucales.

Es por esta razón que los investigadores invierten tanto tiempo para encontrar un producto que sintetice la mayor cantidad de propiedades que mejoren la salud oral.

A raíz de esta necesidad, es que actualmente se investiga el nuevo producto MaxHeal® , que promete poseer excelentes propiedades convirtiéndose en el agente ideal para la prevención y el tratamiento de afecciones de las encías, del periodonto y de la mucosa oral.

Los estudios sobre este producto están en su clímax, en este momento se pretende corroborar su eficacia, así como también sus posibles efectos colaterales.

En el ámbito de la cavidad oral se han realizado observaciones no controladas que muestran resultados bastante satisfactorios, lo que ha motivado a exacerbar las investigaciones de MaxHeal®.

El enorme beneficio que podría derivar un producto de esta naturaleza en controlar el problema de las patologías destructivas en odontología, y mantener la cavidad oral libre de ellas, justifica plenamente el llevar a cabo el estudio propuesto, ya que es necesario antes de tomar en cuenta sus excelentes propiedades, analizar si existen niveles de toxicidad en su administración.

CAPITULO I

PROBLEMA Y PROPOSITO

A. El problema y su importancia

1. ASPECTOS SITUACIONALES

a. Reseña Histórica

Para la obtención de un nuevo producto, la labor comienza con la búsqueda de los posibles principios activos en la naturaleza o en las llamadas bibliotecas de moléculas. También es factible el diseño virtual del fármaco en el ordenador.

En cualquier caso, durante todo ese proceso pueden ocurrir muchos “accidentes” y hasta a veces al buscar otros propósitos descubrir algún nuevo medicamento o componente activo, como ocurrió en este caso.

El presente invento está relacionado directamente con la antigua producción de componentes químicos desconocidos formados por altas reacciones exotérmicas.

La química clásica sugiere que por medio de la combinación de algunos concentrados específicos, el resultado sería desfavorable; sin embargo, al realizar una de esas combinaciones en el presente invento se descubrió una reacción sorpresivamente estable.

La reacción es ligeramente exotérmica y al final, permanece una solución acuosa. Las soluciones resultantes son estables.

Estos nuevos componentes químicos pueden luego disminuir su pH o aumentarlo a cualquier nivel deseado en la escala de pH, por medio de la adición de algunos componentes. Una propiedad sorpresiva y única es la tolerancia a cambios de pH sin la formación de sales y manteniendo su estabilidad.

Es teorizado que el agua, y su modificación de las reacciones químicas, es responsable de muchas de las propiedades disponibles en los nuevos compuestos.

Para todos aquellos diestros en el arte les será fácilmente aparente que las reacciones químicas descritas anteriormente pueden resultar en muchos nuevos, diferentes, y estables compuestos químicos. (*USPatent.,1994*)

MaxHeal®, es un medicamento revolucionario que obtiene su primer registro sanitario en Costa Rica gracias al esfuerzo de científicos costarricenses. Se compone de una sustancia estabilizadora capaz de absorber ácidos o bases sin cambiar de pH, en la cual se suspenden pequeñas dosis de aloe vera y ácido salicílico. (cuadro 3)

Dicha sustancia produce una microestimulación en la aplicación del medicamento que junto a sus principios activos magnifica el efecto terapéutico.

La constitución de MaxHeal® es enteramente fisiológica. Se compone a base de elementos de sodio, potasio, fósforo, azufre y nitrógeno.

NOMBRE DEL PRODUCTO	COMPONENTES	PORCENTAJE
MAXHEAL	Acido salicílico	1,27
	Aloe vera	0,32
	Fosfazenos	98,41
TOTAL		100,00

cuadro 3

Sus indicaciones son para los usos comunes de cicatrización: cortaduras, raspones, quemaduras y picaduras de insectos. Su uso es altamente efectivo tanto en lesiones simples como en casos de mayor complicación.

b. De la empresa

MED Química es una empresa que nace de un convenio de colaboración entre científicos estadounidenses y costarricenses. Su objetivo principal es el de dar a conocer las notables propiedades de MaxHeal®, mediante la investigación científica y clínica, como además de promover su producción, comercialización y exportación.

1. ANTECEDENTES

En 1992, durante ensayos que se hicieron en los Estados Unidos de Norteamérica para detectar moléculas electroactivas derivadas de sodio, potasio, fósforo, nitrógeno, y azufre, con capacidad redox y con la posibilidad de adherirse a superficies que participen en el intercambio de electrones. La reacción se inicia con fuertes ácidos y álcalis que se calientan a temperaturas encima de los 100

grados centígrados. Una explosión de un reactor de laboratorio sobre uno de los investigadores hizo pensar que sufriría lesiones irreversibles. La sorpresa fue que no sufrió lesiones importantes, más que lo referente a la lesión térmica que no superó el segundo grado. Cuando el producto de la reacción se enfrió fue usado en aplacar las lesiones con muy buenos resultados. Desde entonces se inició la búsqueda incesante de las propiedades curativas del producto.

a. Antecedentes Internacionales

Es en la Universidad de Goteborg (Suecia), donde se incluyen 165 referencias bibliográficas sobre la angiogénesis y el tema de las medidas tendientes a controlar o estimular el proceso de cicatrización con MaxHeal®.

Se comprueba la baja toxicidad del MaxHeal® para artemia salina, mediante un estudio realizado en Puerto Rico donde se informa de una dosis muy alta para la DL50.

En Honduras los investigadores están estudiando la forma de cómo desarrollar los ensayos en mutagenesis y oncogenesis.

b. Antecedentes Nacionales

En el año de 1995, se realizan los primeros esfuerzos de registro y divulgación en Costa Rica y el 12 de octubre del mismo año se logra el registro en nuestro país. El producto se comercializa en el mercado como coadyuvante de la cicatrización.

Mediante observaciones no controladas ha sido posible constatar que el poder reparativo de MaxHeal® en soluciones de continuidad de la mucosa oral, es el mismo y hasta superior al que se ha constatado en piel. Estas propiedades cicatrizantes, fueron reconocidas en un estudio experimental conducido en cerdos entre los meses de diciembre de 1998 a setiembre de 1999.

En la Escuela de Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma, se realizó un estudio preclínico de cicatrización de heridas causadas en cerdos, fue presentado en el Congreso de Veterinarios, durante la semana del 8 de noviembre de 1999, se demostró que los casos tratados con MaxHeal® tuvieron regeneración completa de epitelio en 4 de 7 sujetos; 4 veces más que los controles, los cuales presentaron regeneración completa de epitelio en 1 de 7 sujetos.

El Dr. Ronald Meléndez Arce de la Universidad Nacional Autónoma realizó un estudio en endometrio de cerdos que demuestra la posibilidad del producto de incrementar la inmunidad local de la mucosa tratándola por irrigación con MaxHeal®.

Se teoriza en vista de los resultados, que al tener MaxHeal® una acción tópica sobre los agentes patógenos, produce su amortiguamiento y una inducción inmunizadora local al mismo tiempo. Estos resultados han sido preliminarmente calificados sin precedentes, por expertos del campo veterinario.

Bajo observaciones no controladas se induce a pensar que MaxHeal® tiene atributos que le dan gran valor en mejorar respuestas inmunitarias patológicas. Queda por demostrar la hipótesis inmunitaria, en ulteriores estudios.

En afecciones periodontales, la aplicación de MaxHeal® hecha por odontólogos, muestra una disminución del grado de movilidad dentaria, y en dos casos, regresión de una periodontitis necrotizante aguda en un período de 14 a 16 semanas. En un par de casos después de tres meses mejora la situación comparativa ósea alveolar, al evaluarla mediante estudio radiológico. Se requieren de estudios controlados para constatar estas observaciones preliminares.

Un paciente con una ulceración del piso de la boca, empleado del Hospital México, tiene excelente evolución. Las aftas evolucionan satisfactoriamente con el medicamento.

Se ha comprobado en casos aislados el sanado de úlceras varicosas de pacientes que las padecían desde hace cinco a diez años. Como también pruebas en pacientes asmáticos con excelentes resultados.

El producto se ha estudiado en personas que usan prótesis dentales y que se lastiman las estructuras blandas al llevarlas puestas. Con el uso de MaxHeal® aumenta la "tolerancia" a llevar la prótesis y desaparecen los signos inflamatorios. Ha sido posible observar por lo menos en una decena de casos, que las lesiones producidas por las prótesis dentales, cicatrizan en un período de 3 a 4 días. Igualmente ocurre con los que llevan sujeciones ortodónticas.

En el año 1999, en la Universidad Latinoamericana de Ciencia y Tecnología se da inicio a varios estudios paralelos; entre ellos se pueden mencionar: el estudio titulado: "MaxHeal® como una nueva alternativa en el tratamiento quirúrgico periodontal" con el cual se pretende demostrar la reducción de bolsas periodontales y su rápida cicatrización; también el estudio llamado "Regeneración Ósea en Roedores al utilizar Maxheal®" en el cual se quiere observar la posible regeneración ósea al aplicar MaxHeal® luego de una osteotomía en ratas.

3. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

La innovación de nuevos y mejores productos siempre ha sido de interés, tanto para los científicos como para el público en general. Según antecedentes, MaxHeal® parece tener propiedades para diferentes tratamientos dentro del área de la salud bucodental, pero antes de que a un producto se le puedan atribuir méritos por sus excelentes propiedades es necesario verificar la seguridad para el empleo del mismo. De esta manera se plantea como problema de estudio:

¿ Cómo se puede detectar si existen niveles de toxicidad del producto MaxHeal® en estudio experimental con ratones, para la seguridad de su futuro empleo en tratamientos odontológicos?

4. JUSTIFICACIÓN

Este tema fue escogido ante la creciente necesidad de productos innovadores y efectivos en el área de la salud. Es importante la realización de este y otros estudios en un producto tan nuevo como lo es MaxHeal®, para que de este modo una vez con resultados, el odontólogo pueda valorar su real eficacia para el uso potencial en sus pacientes.

Al efectuar la valoración del producto, además de complementar el primer estudio sistemático en cavidad oral en seres humanos, llevado a cabo actualmente en ULACIT y así dar mayor validez a los resultados, también se podrían abrir nuevas oportunidades curativas en procesos regenerativos.

B. Propósito del estudio

1. OBJETIVOS

a. Objetivo general

Analizar macroscópica y microscópicamente la posible toxicidad del producto MaxHeal en hígado, riñón y pulmón de ratones, ayudando en su investigación para su futura utilización en tratamientos odontológicos.

b. Objetivos específicos

1. Interpretar los resultados de los hallazgos clínicos realizados en el Laboratorio de Ensayos Biológicos de la Universidad de Costa Rica para identificar signos de toxicidad durante el periodo de ensayo con ratones.

2. Describir los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones dosificados con MaxHeal® comparados con los de control para identificar posibles diferencias.

3. Mostrar posibles cambios en la histología pulmonar, renal y hepática de los ratones dosificados con MaxHeal® para identificar alteraciones al compararlos con los ratones de control.

CAPITULO II
MARCO TEORICO

A. Estudio de toxicidad subcrónica en MaxHeal

La gran cantidad de nuevos productos generados por centros de investigación constituye un gran problema para el uso inmediato de ellos por parte de los humanos, previamente son necesarios rigurosos exámenes de toxicidad que garanticen la seguridad del producto. Estos exámenes deben ser realizados para cualquier tipo de producto, sean medicamentos, cosméticos, u otros.

La sociedad actual es mucho más exigente en cuanto a la calidad de los productos. La propuesta de un producto innovador con impresionantes propiedades, requiere estudios en los que se pueda valorar su efectividad y seguridad, de manera que este producto pueda ser utilizado confiadamente en la cavidad oral y sea un recurso más al alcance del ser humano para el tratamiento odontológico.

El análisis de los posibles niveles de toxicidad y de los terapéuticos del producto Maxheal®, exige un estudio de casos y control donde se pueda documentar casos clínicos efectuados en animales de laboratorio, de tal forma que al administrarles dicho producto, se pueda deducir según la respuesta de los animales si se presenta toxicidad o no.

Dada la naturaleza del estudio, se justifica la utilización de animales de laboratorio como modelos del hombre, ya que existen razones morales y prácticas que impiden el empleo de voluntarios humanos para este tipo de investigación donde existe el riesgo de toxicidad.

En esta investigación se emplearán parámetros fisiológicos, patofisiológicos y conductuales para estudiar las respuestas del animal una vez administrado el compuesto, además de controlar los efectos farmacológicos y tóxicos, para medir la concentración y establecer la eficacia y seguridad del Maxheal®.

1. HISTORIA DE LA TOXICOLOGÍA

El desarrollo histórico de la toxicología comenzó con los primeros cavernícolas quienes reconocieron las plantas venenosas y usaron su extracto para la caza o para guerras.

Con el tiempo, los venenos se volvieron muy útiles y con mucha sofisticación. Algunas víctimas notables incluyen a Sócrates y Cleopatra .

Para el tiempo del Renacimiento y la Era de Ilustración, algunos conceptos fundamentales para la toxicología empezaron a tomar forma. También hay que considerar los estudios que realizaron Paracelsus y Orfila.

Paracelsus es muy recordado por su afirmación: “Todas las sustancias son tóxicas; no hay ninguna que no lo sea. La dosis indicada hace la diferencia entre un veneno y un remedio”; mediante sus estudios él descubrió lo que hoy se conoce como la relación dosis-respuesta.

Orfila, un médico español, es conocido como el fundador de la toxicología. Él demostró efectos tóxicos en órganos específicos al analizar materiales autopsiados de venenos y su relación con los daños en tejidos.

El siglo XX está marcado por un nivel avanzado de entendimiento con respecto a la toxicología, principalmente por el descubrimiento del ADN.

El nivel actual de conocimiento de los efectos tóxicos en órganos y células está siendo revelado a un nivel molecular. Está reconocido que aparentemente todos los efectos tóxicos son causados por cambios en las moléculas de células específicas y en bioquímicos.

2. TOXICIDAD SUBCRÓNICA

La Real Academia Española define tóxico como “cualquier sustancia venenosa para el organismo”, siendo así la toxicidad el resultado con carácter tóxico de dicha sustancia.

Existen varias técnicas de ensayos toxicológicos, cada una con criterios indispensables para evitar la utilización indebida de los animales de experimentación durante las prácticas de laboratorio.

En la valoración estimada de las propiedades tóxicas de una sustancia química, la determinación de la toxicidad subcrónica puede ser efectuada después de la obtención de los datos de toxicidad aguda a dosis simples o repetidas. Este tipo de estudio brinda información acerca de los riesgos potenciales para la salud, resultantes de una exposición de preferencia oral, de dosis repetidas de una sustancia en un período de tiempo limitado.

La toxicidad subcrónica brinda información adicional sobre órganos y sobre efectos acumulativos. Los datos aquí obtenidos suministran estimativas del nivel de exposición, que servirá de base para el establecimiento de un régimen de dosis para las investigaciones de toxicidad crónica u otros estudios, también da informaciones iniciales de seguridad relacionadas a exposiciones de la sustancia a prueba para el hombre.

La característica principal de un ensayo toxicológico subcrónico es que, en este tipo de ensayo, el tiempo en el cual la sustancia es administrada tiene que ser claramente definido, de acuerdo con el tiempo de exposición previsto en su utilización, y debe constar de información. Los resultados observados en exámenes anatomopatológicos deben estar directamente relacionados con la duración del ensayo para que, efectivamente, se auxilie los ensayos clínicos.

Por definición:

Toxicidad subcrónica es un efecto nocivo que se produce en el animal de experimentación resultante de la administración repetida y diaria de la sustancia administrada, considerando el aumento de sus concentraciones o de sus metabolitos sobre tejidos sensibles.

Existen diferentes estudios de toxicidad subcrónica: Sub-crónica Tipo I (20 administraciones), Sub-crónica Tipo II (25 administraciones), Sub-crónica Tipo III (30 administraciones), Sub-crónica Tipo IV (35 administraciones) y la Sub-crónica Tipo V (40 administraciones).

La dosis se expresa en gramos o miligramos de sustancia por probar por unidad de peso del animal en experimentación, también, en peso de la sustancia por unidad de medida del alimento o agua consumida por el animal.

La sustancia a prueba en este ensayo, es administrada a los animales experimentales preferiblemente con una ración de agua y es expresada en mg/ml de agua.

a. Objetivo de un estudio de toxicidad

Los propósitos de estos estudios son establecer las dosis y efectos de la administración única o repetida, la toxicidad y/o las respuestas farmacológica exageradas. (CCAC, 1998)

b. Principio metodológico

La sustancia probada es administrada diariamente, en diferentes dosis, por la vía escogida, durante el período de tiempo correspondiente al tipo de estudio seleccionado. Durante el período de administración de la sustancia, los efectos en los animales son diariamente observados, anotándose cualquier manifestación tóxica ocurrida en cada una de las dosis. Los animales que mueren durante la experiencia son autopsiados para determinar la causa de su muerte, y aquellos que sobreviven son sacrificados y autopsiados al final del ensayo, siendo sometidos a exámenes histopatológicos apropiados

c. Modo operativo

El volumen máximo que puede ser administrado de una sola vez, para cada dosis de sustancia a prueba, depende de la constitución y de la condición del animal de experimentación. Para los roedores, este volumen no debe exceder 1ml/100g (10ml/kg) de peso corporal, para el caso de soluciones acuosas, el volumen de 20ml/kg se divide en dos administraciones.

Para poder extrapolar los resultados obtenidos de un ratón NGP, debemos tener en cuenta que setenta kilos humanos representan un kilo de peso del ratón. (García,M.,2000)

Todos los animales deben ser expuestos al mismo nivel de dosis en cada uno de los grupos. Es necesario, que la sustancia a probar sea disuelta o suspendida en un vehículo adecuado.

d. Nivel de dosis

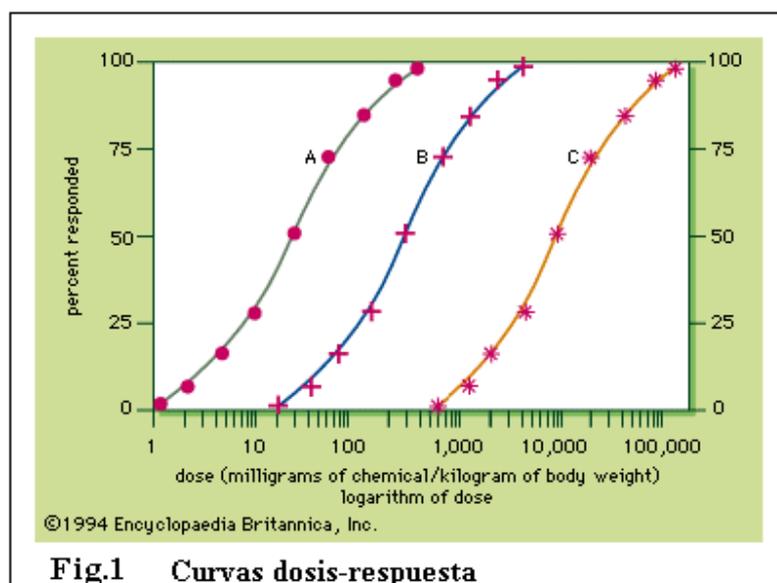
El término dosis se conoce como la cantidad de sustancia administrada durante un estudio. La dosis se expresa en gramos o miligramos de sustancia por unidad de peso del animal en experimentación.

La dosis es el factor más importante y crítico para determinar si una sustancia será un tóxico agudo o crónico.

Ya que la respuesta a un producto químico varía con la dosis, cualquier sustancia puede ser un veneno. Un medicamento puede producir respuestas que son terapéuticas (beneficioso) o tóxico (adverso), o aún mortales.

La relación dosis-respuesta es fundamental para el concepto de toxicidad. Esta correlaciona las exposiciones con el resultado de los efectos inducidos. Generalmente, cuánta más alta sea la dosis, la respuesta será más severa. La relación dosis-respuesta está basada en registros de observaciones en animales de laboratorio, humanos, o estudios celulares.

La relación dosis-respuesta normalmente se presenta como una curva sigmoide con resultados terapéuticos y mortales como los que se observan típicamente en las curvas A y C, respectivamente, en la figura 1.



Si el medicamento x tiene curvas dosis-respuesta A, B, y C, terapéuticas, tóxicas y letales, respectivamente, X es un medicamento seguro, ya que no hay traslape de las curvas.

Para algunos agentes medicinales, hay traslape de las curvas de dosis-respuesta terapéuticas y mortales, de modo que una dosis que causa una respuesta terapéutica en algunos individuos pueda matar a otros. Estos agentes, por lo tanto, no son tan seguros.

El nivel en el que se presenta toxicidad es conocido como de umbral de dosis.

e. Dosis letal 50 (dl50)

Los estudios para encontrar el rango de dosis son ampliamente usados en los programas de investigación farmacéutica toxicológica. Estos estudios también brindan una indicación de los órganos potencialmente afectados y de los efectos adversos inesperados.

El conflicto ocurre cuando los investigadores están preocupados por las tasas de supervivencia. Para que un estudio sea considerado negativo, se requiere que la supervivencia sea de por lo menos el 50%. (FDA). (CCAC.,1998)

Entonces podemos describir la dosis letal media, como aquella dosis mínima requerida para causar la muerte al 50% del grupo en estudio. Los valores DL50 son determinados en animales de experimentación.

Los estudios de DL50 fueron concebidos en 1927 para proporcionar una medida de la toxicidad de unos importantes componentes medicinales.

La DL50 proporciona un medio para calcular el peligro de la dosis tóxica de una sustancia dada, una base para futuras investigaciones de límites seguros y dosis tolerables para humanos.

Una medida cuantitativa de la seguridad relativa de medicamentos es el “índice terapéutico”, el cual se describe como la respuesta de la dosis que produce una respuesta letal en un 50 por ciento de los individuos tratados (DL50) dividido entre la dosis que produce una respuesta terapéutica en un 50 por ciento de los individuos (DT 50).Cuanto más grande sea el índice terapéutico, más seguro es el medicamento. Es por esta razón que es tan importante calcular los niveles de dosis tóxicos y terapéuticos, ya que hay que tener muy en cuenta el riesgo en la utilización de un medicamento, concepto que incluye la dosis de exposición.

Esto significa que entre menor sea el valor de la DL50, mayor será la toxicidad.

La diferencia existente entre las frecuencias de la exposición corresponde a la cantidad de tiempo que un producto químico se mantiene en el tejido del animal diana. Una sola exposición de un medicamento a cierta dosis puede ser suficiente para producir una concentración tóxica en un tejido, conduciendo al desarrollo de la toxicidad. Las exposiciones repetidas en la misma dosis entonces aumentarán la severidad de la lesión debido a la presencia de los niveles tóxicos del producto químico en el tejido del animal diana.

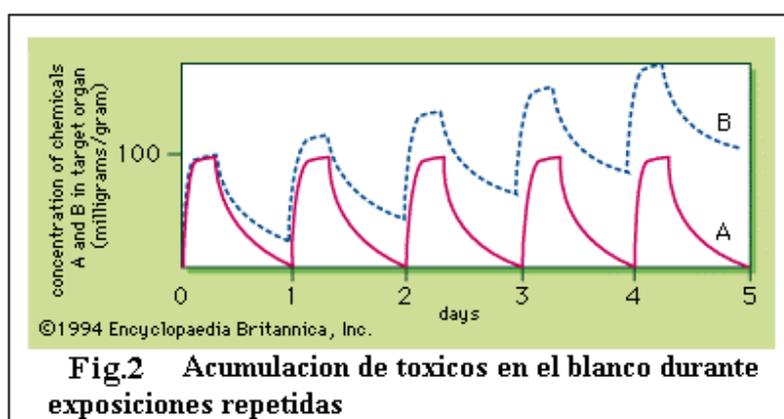
f. Acumulación del tóxico

La acumulación del tóxico es una de las razones por las cuales durante dosis repetidas se produce toxicidad, mientras que a una sola exposición pueda no producirse.

Algunos medicamentos se distribuyen en el cuerpo y solo afectan órganos específicos del animal. Otros, sin embargo, pueden dañar cualquier célula o tejido que contacten. Los órganos que son afectados pueden variar dependiendo de la dosis y la vía de exposición. La vía de administración más común es la vía oral (por sonda o mezclado en la dieta).

Como un caso hipotético se podría mencionar el descrito en la figura 2: una concentración de más de 100 miligramos por gramo en el tejido del blanco es requerido para que el medicamento "A" cause toxicidad, si este medicamento es administrado a una dosis en la que no se producen niveles tóxicos en el tejido y la eliminación del producto se completa a las 24 horas, exposiciones diarias repetidas con la misma dosis no causarán toxicidad. Por otro lado, sin embargo, está "B" un medicamento similar al anterior, pero con un tiempo de eliminación mayor a las 24 horas. Si la exposición del producto "B" es llevado a cabo con la

misma dosis que con el producto “A”, la concentración de “B” en el tejido del blanco no se eliminará a las 24 horas. Consecuentemente, las exposiciones diarias de “B” causarán que se acumule el tóxico, y así el pico de la concentración de “B” en el diagrama aumentará diariamente. Eventualmente, el umbral del tóxico será alcanzado y se empezarán a presentar daños. Por lo tanto, exposiciones repetidas de un producto pueden causar toxicidad a una dosis donde si fuera solo una exposición no produciría daño.



Hay varios tipos de células en el cuerpo y se pueden clasificar de varias maneras.

- Estructura básica (ej.células cuboidales)
- Tipo de tejido (ej.hepatocitos del hígado)
- Células germinales (ej.óvulos y espermatozoides)
- Células somáticas (ej.células no reproductivas)

Las células germinales son las que están envueltas en procesos reproductivos. La toxicidad en este tipo de células puede causar efectos en fetos en desarrollo (como malformaciones congénitas y abortos)

Las células somáticas son todas las células del cuerpo excepto las reproductivas. La toxicidad en estas células causa una variedad de efectos tóxicos al individuo expuesto (tales como dermatitis, cancer y muerte).

B.Consideraciones sobre animales experimentales

La utilización de animales de laboratorio como modelos del hombre es muy común, ya que con frecuencia existen razones éticas, prácticas y/o financieras que impiden el empleo de voluntarios humanos o de la especie animal diana para estos estudios. (*Martín,J.,2000*)

Los animales de laboratorio cumplen con la necesidad que se tiene de estos sistemas para la ejecución de muchos programas de salud. Su uso está reportado desde hace más de dos mil años.

Los modelos animales todavía ofrecen resultados más seguros que los computarizados u otros bioensayos.

En efecto, actualmente nadie duda que para realizar cualquier tipo de investigación biomédica se hace precisa la experimentación con animales. El ratón ha sido y sigue siendo una pieza fundamental en el diagnóstico. En esta especie es en la que más trabajos se han realizado.

En ocasiones, los animales se utilizan como modelos para el estudio de las respuestas biológicas. En este caso, el investigador emplea parámetros fisiológicos, patofisiológicos o conductuales para estudiar las respuestas del animal una vez administrados los compuestos o estímulos.

Este estudio es necesario para controlar los efectos farmacológicos y tóxicos de ciertos compuestos, para medir la concentración de los fármacos y para establecer la eficacia y seguridad de nuevos medicamentos.

El animal experimental debe ser lo suficientemente sensible como para permitir que su reacción se pueda percibir de forma específica y clara.

Cuando se realiza un experimento con el propósito de descubrir los efectos tóxicos de los compuestos administrados, es condición indispensable que las reacciones del animal experimental se puedan extrapolar a otras especies, incluido el hombre. La mayoría del conocimiento que poseemos sobre fisiología, endocrinología y bioquímica general procede de la experimentación animal. En teoría, este conocimiento se extrapola al hombre. Por lo tanto, en gran parte de los experimentos el animal actúa como sustituto del hombre y se le denomina modelo animal. Llegados a este punto, es importante definir el término "modelo animal de laboratorio". Una definición sería un individuo en el que se estudia la biología o conducta normativa o en el que se investiga un proceso patológico inducido o espontáneo y en el que un fenómeno se parece al menos en un aspecto a ese mismo fenómeno en el hombre o en otra especie animal.

Extrapolación: Cuando se selecciona un modelo animal para su empleo, es importante considerar el ámbito de generalización deseado de los resultados obtenidos. La base lógica para extrapolar los resultados a otras especies está basada en la homología. La homología se refiere a la similitud evolutiva de las

estructuras morfológicas y los procesos fisiológicos, existente entre las distintas especies animales pero también entre los animales y el hombre. A pesar, de hecho, de que han aparecido grandes divergencias durante la evolución, aún existen muchas similitudes entre las distintas especies animales y el hombre. Cuando nos embarcamos en el estudio de características específicas, es necesario seleccionar una especie o cepa que muestre una total conformidad en lo referente a dichas características fisiológicas o anatómicas específicas con la especie a la que se van a extrapolar los resultados. La extrapolación puede ser tanto cualitativa como cuantitativa. La cualitativa aborda procesos patofisiológicos de un animal y sus reacciones a ciertos estímulos que se extrapolan a otros animales o al hombre. La extrapolación cuantitativa se refiere a una valoración basada en pruebas con animales sobre cuál es la dosificación de un compuesto dado que sería beneficiosa o dañina para el hombre o animal diana. En este caso, influyen las diferencias cualitativas entre las distintas especies junto con las posibles diferencias cuantitativas de los procesos fisiológicos. La extrapolación de los animales al hombre siempre se debe realizar con reservas. Los resultados experimentales obtenidos en animales tienen que ser verificados en estudios con humanos. Por lo general, entonces, solo se sabrá a posteriori hasta qué punto estaba justificada la extrapolación de los animales al hombre.

Dada esta situación, lo único que se puede afirmar es que las pruebas realizadas con animales reducen los riesgos para el hombre.

La selección de modelos animales: La elección es determinada por la hipótesis o cuestión clave de la investigación. Una vez establecida esta, será posible determinar qué "sustrato clave" es necesario para proporcionar la respuesta deseada, es decir, un tipo concreto de célula, tejido, un órgano y la interacción entre órganos. Después se define el sustrato, y si este debe estar enfermo, en

crecimiento, adulto o viejo. Una vez establecido, es posible buscar las especies o cepas que están adecuadamente dotadas de las características requeridas.

Para seleccionar un modelo animal, se debe tomar en cuenta:

1. Definir la cuestión clave
2. Decidir sobre el sustrato clave.
3. Determinar en qué especies/cepas de animales se encuentra este sustrato clave.
4. Establecer que especies/cepas de animales que procesan el sustrato clave son más ventajosas desde un punto de vista teórico y qué procesos causan el mínimo malestar en los animales.
5. Establecer qué factores prácticos son decisivos, es decir, disponibilidad, alojamiento, cuidado, manejo, equipamiento, información publicada, conocimientos técnicos, gastos.
6. Seleccionar el modelo animal basándose en consideraciones científicas, prácticas y éticas. (*Martín,J.,2000*)

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO EN ESTUDIOS DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA

a. Escogencia de las especies

Aunque el protocolo para un estudio de toxicidad subcrónica sea la utilización de roedores, varias especies de mamíferos pueden ser utilizadas. Dentro

de los roedores, los ratones son los animales más indicados debido a sus características y para poder utilizar menor cantidad de sustancia. (Souza,A.,1994)

El ratón y la rata de laboratorio, ocupan cerca del 90% de los animales utilizados en experimentación, pruebas de laboratorio y enseñanza. Quizá en los ensayos toxicológicos sea donde se utilicen más ratones. (CCAC.,2000)

Distintas especies pueden tener diferentes respuestas a la exposición de una toxina. Cuando éstas diferencias ocurren, el toxicólogo y el patólogo toxicológico deben determinar cuál animal es el más predecible para la potencial respuesta en humanos. La mayor responsabilidad y contribución la da el patólogo.

b. Número y sexo de los animales en estudio

No menos de veinte roedores (10 hembras y 10 machos) deben ser utilizados para cada nivel de dosis. Dada la importancia de un estudio de toxicidad subcrónica, pueden ser utilizados cuarenta animales (veinte por sexo) por grupo. Las hembras deben ser monógamas y castas. Es necesario sacrificar los animales al terminarse el ensayo, es importante prever el número de animales para que, a la hora del sacrificio resten los suficientes para conducir el trabajo final.

Debe existir una estimativa del nivel de exposición para el hombre, así la dosis por utilizar en este ensayo deberá ser igual o superior a ella.

b.1 Cepa NGP

La NIH de Recursos Genéticos (NIHGR) es una de las más grandes colecciones de el pequeño animal de laboratorio. La clasificación del ratón utilizado en éste estudio fue obtenida de los expedientes de NIH.

- ***Razas por exogamia***

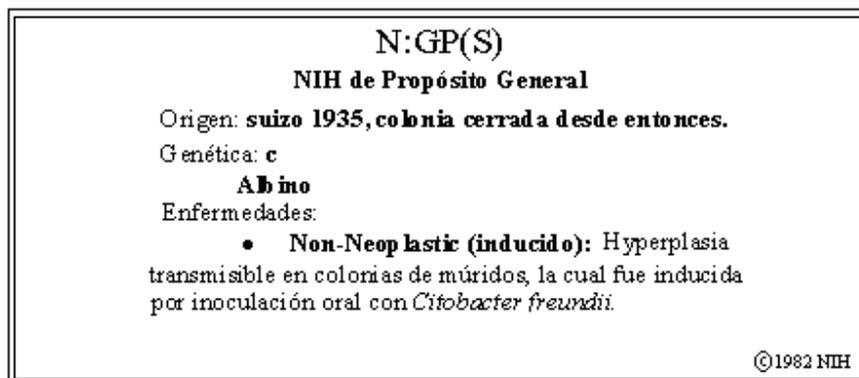
Los ratones utilizados en este estudio fueron razas obtenidas por exogamia.

El término exogamia quiere designar a las cepas producidas por mezcla de razas . Este tipo de manejo se designa para establecer una frecuencia de los genes y para minimizar la cantidad de innatos por generación. Cada pareja monógama escogida deben ser castos para ser los padres de la próxima generación. El funcionamiento de cada jaula de apareamiento es revisada semanalmente, y cuando se nota que ya no se espera progenie de alguna jaula en particular, ésta es remplazada por animales más jóvenes. Este método minimiza las probabilidades de que se den dos individuos con ancestros en común.

- ***Nomenclatura***

Cada una de las razas de los ratones lleva una letra de designación “N” que la identifica de NIHGR(National Institutes of Health Genetic Resource). De esta manera la designación precede a la identificación de la raza y está separada por dos puntos: N:GP, es decir, que esta cepa representa a ratones de Propósito General mantenidos en NIHGR (*NIH,1982*)

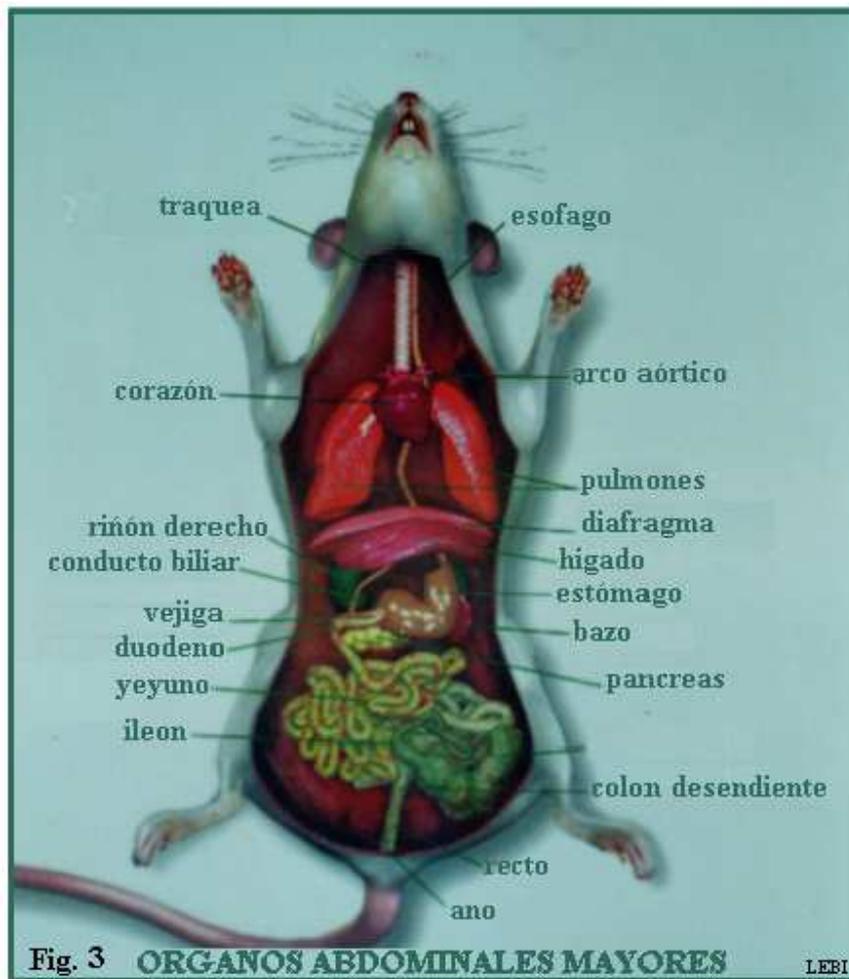
- **Especificaciones de la cepa en estudio**



2. ANATOMÍA DE LOS RATONES

La descripción de la anatomía del ratón en la sección está fundada a partir de las características básicas de los sistemas vitales principales. Se enfatizará en las descripciones de los órganos hígado, riñón y pulmón ya que éstos son los de principal importancia en el actual estudio de toxicidad.

a. Características externas



Las ventanas de la nariz se abren lateralmente y un surco vertical justo debajo de él forma una abertura en el labio superior, exponiendo los incisivos superiores.

Ambas patas delanteras y traseras tienen cinco dedos, aunque el primer dedo de las patas delanteras es solamente representada por una pequeña uña. (las glándulas sudoríporas están presentes en las patas.)

En el ratón hembra hay tres pares de pezones en el pecho y dos pares en la región inguino-abdominal.

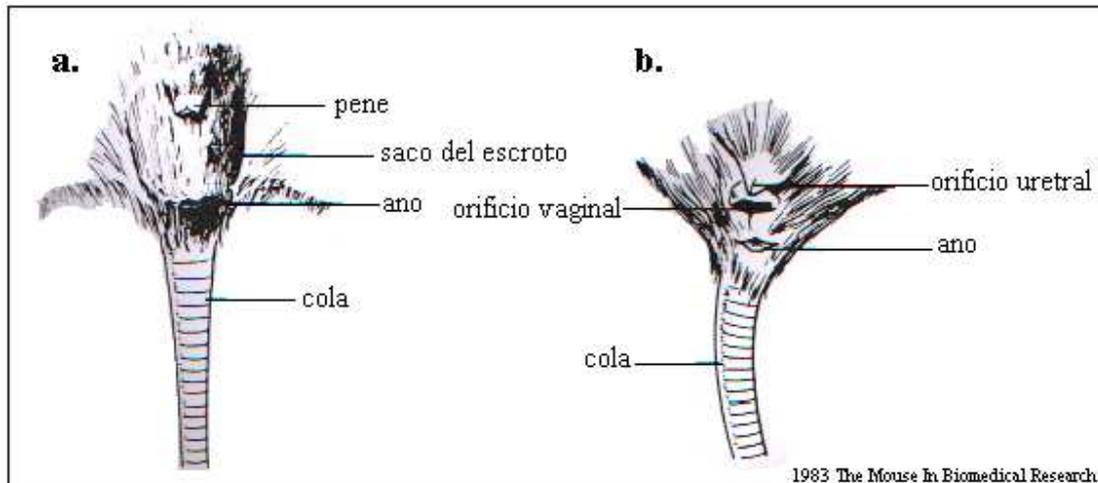


Fig.4 Genitales Externos de macho (a) y hembra (b).

b. Sistema nervioso

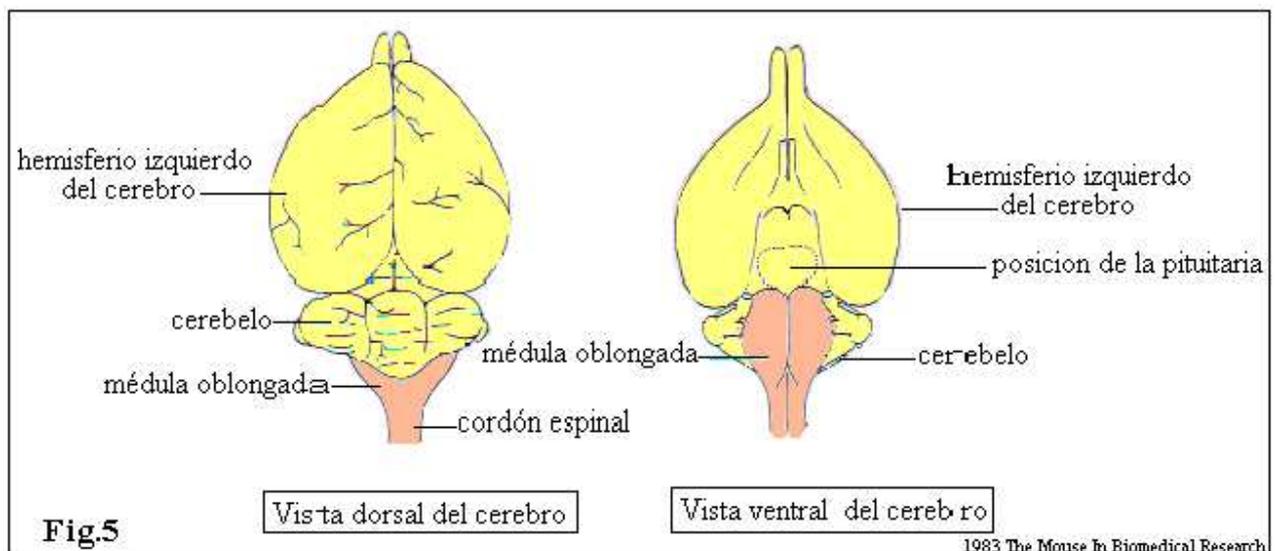


Fig.5

El cerebro del ratón, que tiene una estructura mamífera típica, está ilustrada en la figura 5. Los hemisferios cerebrales están separados

longitudinalmente por la fisura cerebral. El cerebelo consiste en un vermix mediano impar y los hemisferios que caracterizan a un patrón típico lobular mamífero. La médula oblongada es la porción más posterior del cerebro, reposando ventralmente al cerebelo y constrayéndose posteriormente hasta el cordón espinal.

c. Sistema Cardiovascular

c.1 Corazón

Como en otros mamíferos, el corazón descansa en la cavidad pericárdica dentro de la caja torácica y consiste de cuatro cámaras, los atrios de paredes delgadas y los ventrículos de paredes gruesas.

Las válvulas entre los atrios y los ventrículos a la salida de las arterias del corazón previenen que el flujo de sangre se devuelva. La válvula tricúspide se aloja entre el atrio y el ventrículo derecho. En el lado izquierdo, la bicúspide o válvula mitral se aloja entre el atrio y el ventrículo. Las válvulas semilunares protegen la salida de la arteria pulmonar y la aorta del lado derecho y los ventrículos izquierdos respectivamente. (similar al hombre)

La pared del corazón está formada por tres capas: la capa externa es el pericardio, la capa del medio, o miocardio, consiste en fibras musculares cardiacas, es delgada en los atrios y gruesa en los ventrículos, y la capa interna es el endocardio la cual divide las cavidades y forma las válvulas.

c.2 bazo

El bazo es un órgano elongado café-rojizo. Descansa en la cavidad abdominal contiguo a la mayor curvatura del estómago.

La edad, raza, sexo y estado de salud puede afectar el tamaño, forma y apariencia del bazo.

d. Sistema Respiratorio



El tracto respiratorio anterior consiste de las ventanas nasales, la cavidad nasal, y nasofaringe.

La sección intermedia del tracto respiratorio consiste de laringe, tráquea y bronquios.

Los pulmones forman la porción posterior del tracto respiratorio. En el lado izquierdo, el pulmón consiste de un único lóbulo, pero en el lado derecho el

pulmón está dividido en cuatro lóbulos, el superior, medial, e inferior, y la llingula ubicada en el medio. (Fig. 7)

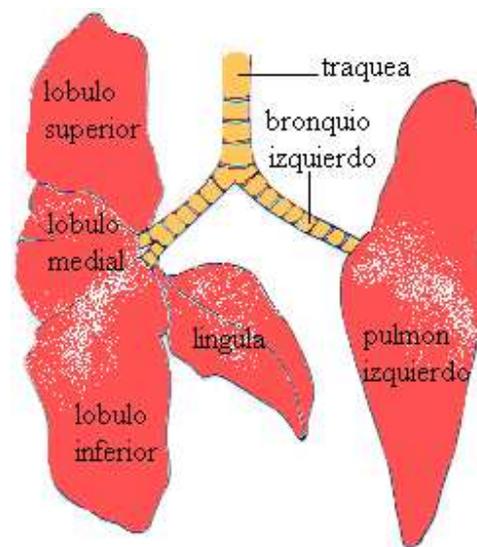


Fig.7 lobulos del pulmon

1983 The Mouse In Biomedical Research

e. Sistema Gastrointestinal

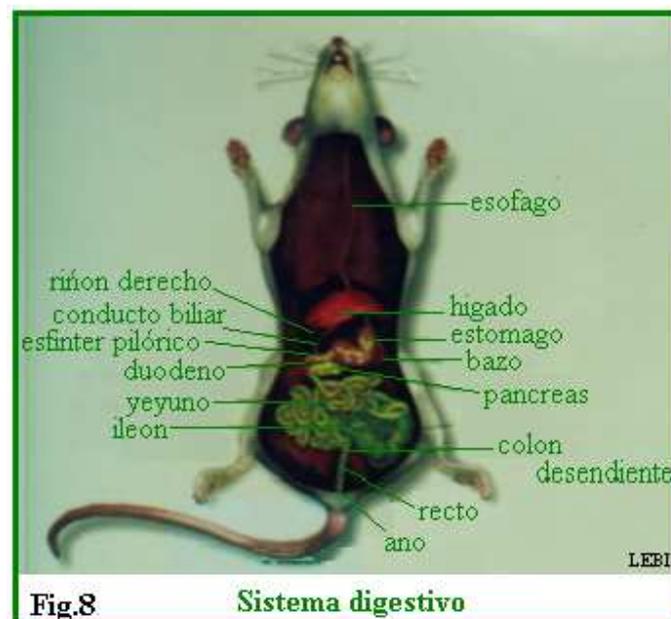


Fig.8 Sistema digestivo

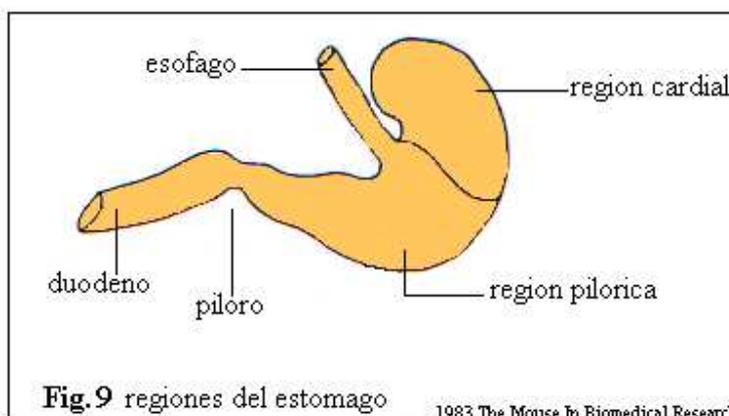
e.1 tracto gastrointestinal

La cavidad oral en el ratón está limitada por los labios, mejillas, y la epiglotis, con el paladar duro y blando formando el techo. El piso está formado por la lengua.

El canal alimentario consiste del esofago, estómago, intestino delgado e intestino grueso en el cual hay una porción ascendente, transversa, y descendente.

El intestino delgado, consiste en un tubo enroscado, y puede ser reconocido histológicamente pero no macroscopicamente como tres regiones separadas, el duodeno, yeyuno, e íleon. En los ratones el apéndice no está presente.

La división del estómago en región cardial y pilórica es claramente visible macroscopicamente (Fig 9). En observaciones microscópicas, las glándulas cardias, del fondo y pilóricas se observan en la región del cardias. Entre la unión del estómago y el intestino delgado está el esfínter pilórico, y esta previene el retorno de los contenidos del duodeno al estómago.



e.2. Páncreas

El páncreas, el cual funciona tanto como una glándula exocrina como endocrina, es una estructura rosada clara suspendida en el mesenterio entre el estómago, duodeno, y colon. Este tiene varios conductos excretores. Los islotes de Langerhans, que forman la porción endocrina del páncreas, se encuentran a lo largo de la glándula y están asociadas a conductos septales y vasos sanguíneos.

f. Hígado

La apariencia macroscópica del hígado es similar en todas las especies, excepto por la forma y tamaño de los lóbulos; histológicamente, el hígado tiene una arquitectura lobular que también es similar en todas las especies.

f.1. Anatomía gruesa del hígado

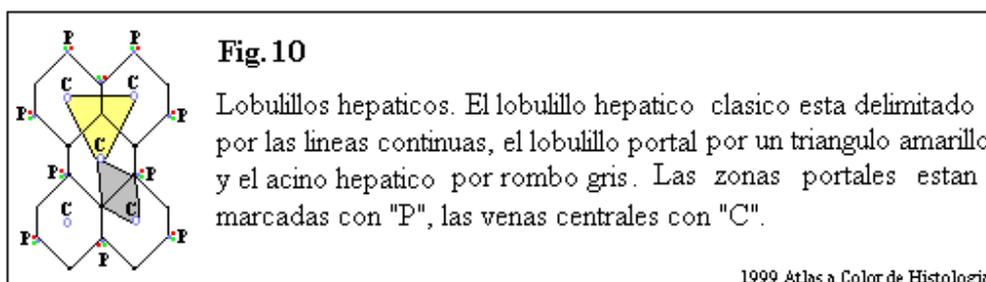
Es un gran órgano café-rojizo debido principalmente a su abundante riego sanguíneo. Está situado por debajo del diafragma en la parte superior del abdomen. El peso es normalmente el 3.5% del peso total del cuerpo del animal adulto. Está compuesto por cuatro lóbulos, el lóbulo medial el más grande que se divide en porciones izquierda y derecha, el lóbulo anterior y posterior.

f.2. Componentes celulares hepáticos

La célula que conforma el parénquima del hígado es el hepatocito, que representa aproximadamente el 60% de las células del hígado. Los hepatocitos son células poliédricas con un núcleo esférico y abundante citoplasma. Los hepatocitos se disponen en una serie de láminas perforadas que se ramifican y se anastomosan

para formar una especie de laberinto, entre las cuales están los espacios sinusoidales, cuya pared está constituida por el endotelio. Estas láminas se extienden de la periferia del lobulillo clásico a la vena central en forma radiada. Los espacios sinusoidales entre las láminas hepáticas están revestidos por células reticuloendoteliales que se encuentran en una malla de fibras reticulares finas. Por tanto, las células de un lobulillo hepático son células parénquimatosas. En el revestimiento de los sinusoides del hígado adulto hay dos tipos principales de células, las endoteliales y células de Kupffer (célula fagocitaria). Entre los hepatocitos y el endotelio se encuentra el espacio perisinusoidal de Disse.

Se ha resumido el lobulillo clásico o hepático, como un prisma poligonal, con una vena central y conductos portales periféricos en las esquinas. (Fig. 10)



El flujo sanguíneo va de la periferia a la vena central, pasando por los conductos sinusoidales. Por otra parte la secreción de la bilis va de las células hepáticas a los pequeños conductos biliares de la periferia.

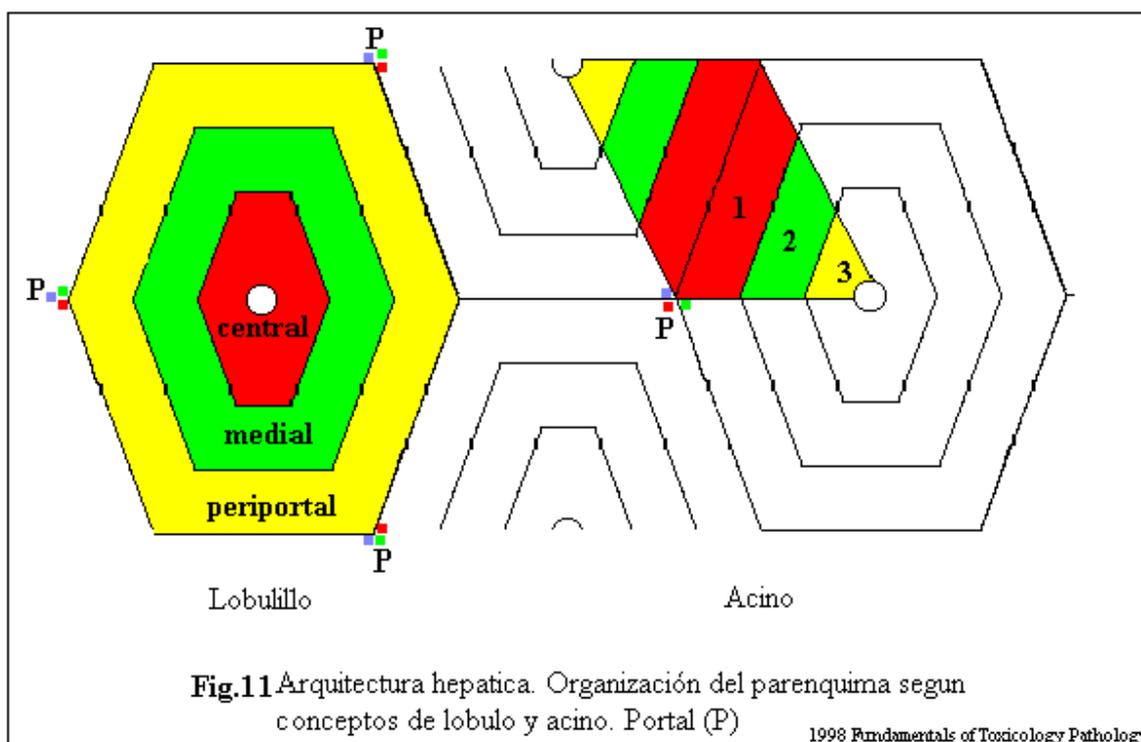
En el aspecto patológico, el daño hepático suele estar relacionado con el riego sanguíneo, y según este se puede reconocer una unidad estructural hepática más pequeña. Este es el acino hepático. Los vasos riegan y el conductillo biliar drena una zona que en el corte transversal tiene forma de rombo, con dos venas centrales en los ángulos agudos opuestos y las ramas procedentes del conducto

portal cursando transversalmente entre ellas. El acino hepático correlaciona de manera directa el riego sanguíneo y la actividad metabólica. (Irina, S.,1999).

Anatómicamente, los hepatocitos están distribuidos en tres indistintas áreas del lobulillo:

- periportal
- zona lobular medial
- lobular central

Funcionalmente, se considera que los hepatocitos residen en tres zonas metabólicas según el acino, la primera tiene gran proximidad vascular, suministro de sustancias y oxígeno; la segunda y tercera zona tienen poca proximidad al suministro vascular. (Fig.11)



La vida promedio de los hepatocitos se estima en 200 días en las ratas. Es raro observar mitosis en las células hepáticas del adulto, pero se pueden encontrar muchas imágenes mitóticas durante la reparación que sigue a una lesión.

Alrededor de las zonas portales, las células hepáticas se disponen en forma de una hoja de una célula de espesor que se aplica al tejido conectivo periportal, llamada lámina limitante. La lámina está formada por células algo más pequeñas que las células hepáticas del centro del lobulillo y es perforada por vasos sanguíneos (ramas de la arteria hepática y de la vena porta) y por ramas de los conductos biliares. (*Irina, S.,1999*)

f.3. Función del hígado

El hígado es esencial para el mantenimiento vital de los animales vertebrados. Tiene dos suministros de sangre, la arteria hepática y la vena porta. La arteria hepática provee el oxígeno, mientras que la vena porta libera sustancias absorbidas por el tracto gastrointestinal para la remoción y conversión metabólica de algunos compuestos.

Esta glándula tiene función exocrina -producción de bilis- y endocrina (elaboración de proteínas plasmáticas, glucosa) Además, produce colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y desintoxica y metaboliza medicamentos y materias extrañas digeridas.

g. Sistema urinario

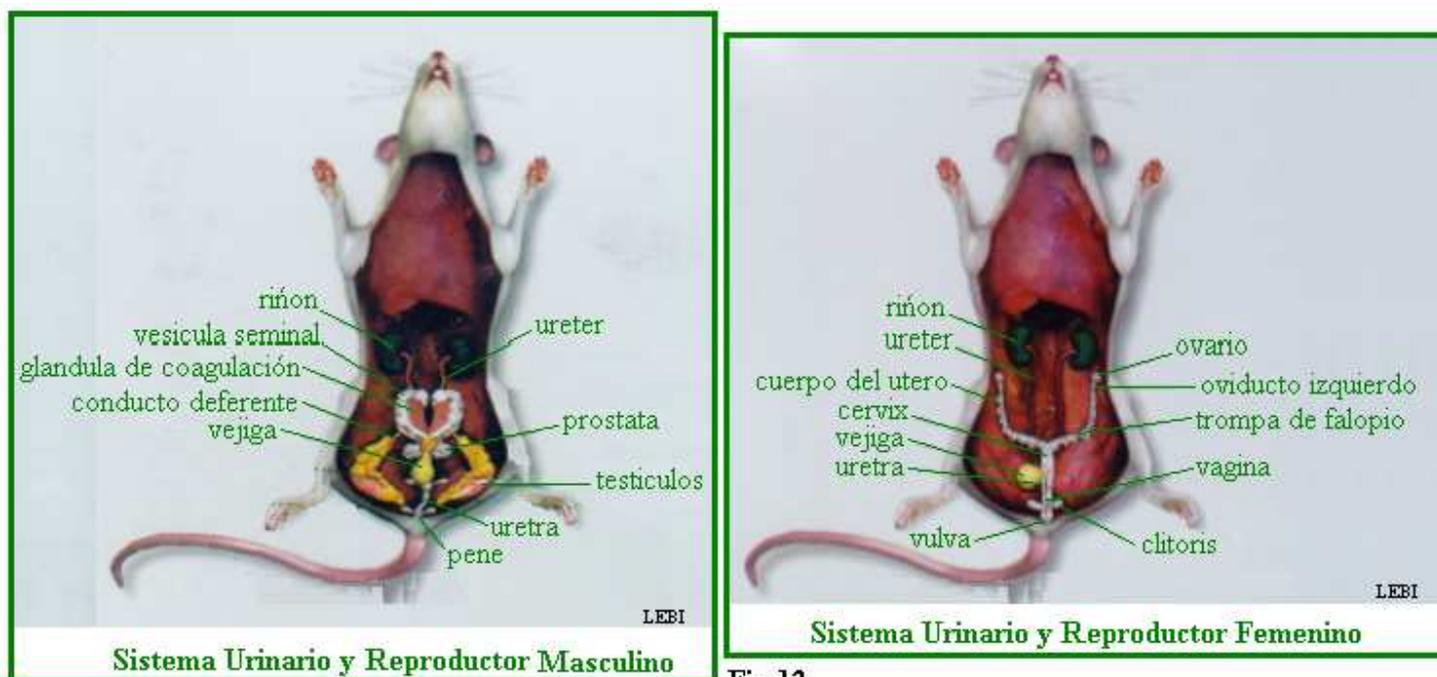
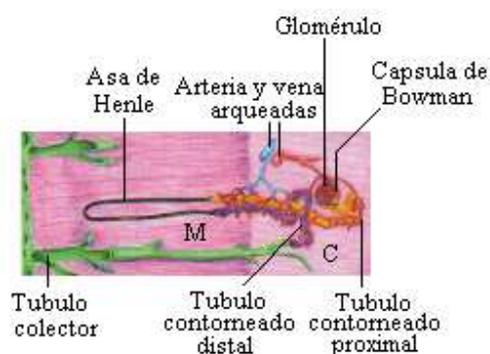


Fig.12

Para la descripción del aparato urinario se hará mención de la anatomía de la rata, ya que para los estudios de patología renal toxicológica es el modelo más utilizado.

Los riñones, ureteres, vejiga y uretra forman el sistema urinario. El par de riñones se recuestan contra la pared dorsal del abdomen y están apenas sostenidos



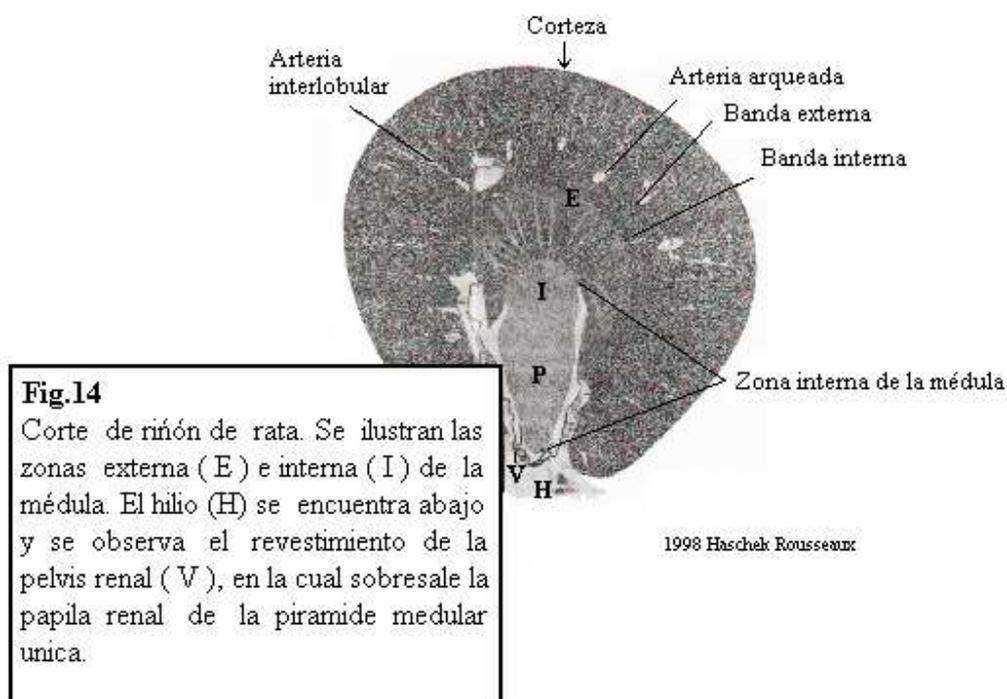
1999 Atlas a Color de Histología

Fig.13

Esquema de una nefrona aislada que muestra las partes que la forman y su riego sanguíneo. Corteza (C). Medula (M).

en posición por tejido adiposo; el riñón derecho está normalmente localizado hacia anterior que el izquierdo.

Los roedores tienen una arquitectura renal básica unipapilar, el tipo más simple de riñón mamífero. La unidad funcional del riñón, es la nefrona (fig 13). En la cara interna hay una depresión, llamada hilio; todos los vasos sanguíneos



que entran y salen del riñón , lo hacen por el hilio. La porción superior del uréter se expande para formar la pelvis renal. (fig. 14)

Un lobulillo renal es una unidad más pequeña que comprende un rayo medular, formado por túbulos colectores en su parte central, con varias arterias interlobulillares en su periferia, y está formado por las nefronas que desembocan en los túbulos colectores del centro.

h. Riñón

Cuando estos riñones en forma de frijol son seccionados en dos distintas capas, la corteza y la médula, son claramente visibles microscópicamente. (Cook, M., 1983)

En la médula hay dos zonas, interna y externa, la externa subdividida a su vez en una banda interna, más oscura y gruesa, y una banda externa, más clara y delgada. (fig. 15)

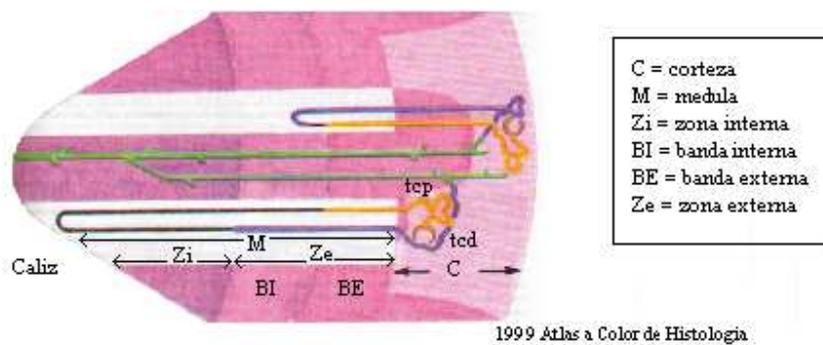


Fig. 15

Esquema que muestra las zonas del riñón con relación a los segmentos de las nefronas corticales externas (A) y yuxtaglomerulares (B).

h.1. Riego sanguíneo del riñón

Como los riñones limpian la sangre de los productos de desecho del metabolismo, tienen un abundante riego sanguíneo. La arteria renal penetra en el hilio, donde se divide en 6 a 10 arterias interlobulares. Las arterias interlobulillares surgen de las arqueadas, estas se dirigen hacia la superficie en dirección radial y se

localizan entre los lobulillos. Sus terminaciones periféricas alcanzan el lecho capilar que riega la cápsula renal. Las arterias interlobulillares emiten de 6 a 11 ramas colaterales, llamadas arteriolas aferentes.

La sangre pasa primero por los glomérulos, que son el lugar para la filtración del plasma sanguíneo. Las arteriolas eferentes salen de los glomérulos para regar la mayor parte de las otras porciones de las mismas nefronas. Las de las nefronas corticales tienen diámetro pequeño y se dividen para formar las redes capilares peritubulares que rodean y riegan sus propios túbulos uriníferos locales. Las arteriolas eferentes de las nefronas yuxtamedulares tienen diámetro mayor y se dirigen hacia la médula con el nombre de arteriolas rectas falsas.

Las venas se distribuyen paralelamente a la arteria principal y al sistema arqueado.

h.2. Anatomía microscópica del riñón

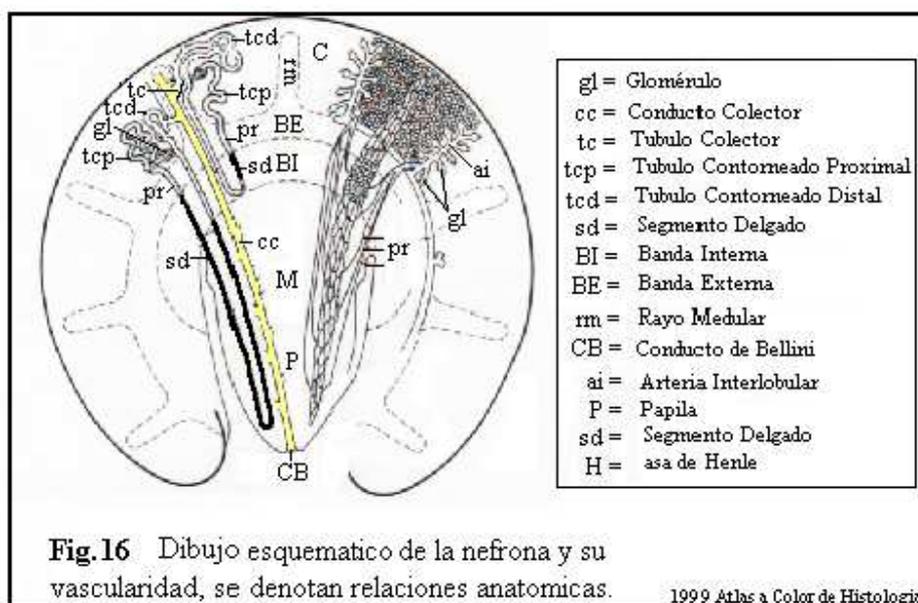
Es de importancia en patología toxicológica conocer la histología normal de la nefrona, y las siguientes subunidades funcionales: glomérulo, túbulo proximal, aparato yuxtaglomerular, segmento delgado, túbulo distal y mácula densa.

- *Nefrona*

Los cortes histológicos nos dan una idea clara de su forma. La primera parte de la nefrona, localizada en la corteza, es el corpúsculo renal. El extremo proximal de la nefrona se dilata para formar la cápsula de Bowman, que se ve invaginada por un penacho globular de capilares llamado glomérulo. Cada corpúsculo renal tiene un polo vascular por el que entran y salen las arteriolas aferente y eferente, y

un polo urinario, donde una hendidura de la cápsula de Bowman se continúa con la luz del siguiente segmento de la nefrona, el túbulo proximal.

La porción contorneada del túbulo proximal (túbulo contorneado proximal) y la porción contorneada del túbulo distal (túbulo contorneado distal) se encuentran adyacentes a su corpúsculo renal en la corteza. El resto de la nefrona



(porción recta del túbulo proximal y porción recta del túbulo distal) forman el asa de Henle. El asa tiene ramas ascendente y descendente paralelas entre sí, unidas por un segmento delgado en forma de U. (fig. 16)

Con base en la longitud del asa de Henle se reconocen dos tipos de nefronas. Las nefronas cortas (corticales), son aquellas cuyos corpúsculos renales están en la porción externa de la corteza. Tienen asas de Henle cortas y solo se extienden una corta distancia dentro de la zona externa de la médula. Las nefronas largas (yuxtamedulares), con corpúsculos renales en la región profunda de la corteza, tienen asas de Henle largas, y estas penetran profundamente en la zona interna de la médula. Las de tipo corto son más abundantes que las de tipo largo.

Las nefronas mediocorticales presentan características intermedias entre los dos tipos anteriores.

Las porciones terminales de las nefronas, los túbulos contorneados distales, se unen al sistema de conductos colectores. Un corto segmento de unión (túbulo colector arqueado) se dirige a un túbulo colector recto (que se encuentra en un rayo medular) que desemboca en un caliz menor. (*Selukova,I., 1999*)

- *Glomérulo*

El glomérulo representa la unidad de filtración de la sangre. La cápsula de Bowman, al ser invaginada por el penacho de capilares glomerulares, presenta una capa parietal de epitelio, que se continua con en epitelio viseral, en íntima relación con los capilares glomerulares, los podocitos (células de la cápsula de Bowman) son los que rodean a los capilares. Al entrar al corpúsculo renal, la arteriola aferente se divide en ramas, de las cuales se originan los capilares. La lámina basal se encuentra entre los podocitos y sus prolongaciones por fuera y el endotelio por dentro. Cerca de las arteriolas aferente y eferente hay espacios intercapilares en que las láminas basales no están revestidas de endotelio, estos espacios están ocupados por el mesangio, formado por células de mesangio, las cuales son de forma estrellada y hay células fagocitarias y contráctiles. La “barrera de filtración” del glomérulo consiste en el endotelio fenestrado, la lámina basal y las prolongaciones de los podocitos (pedicelos).

- *Túbulo proximal*

Cada uno comprende una porción contorneada (túbulo contorneado proximal o TCP) y una porción recta, que es la primera parte del asa de Henle. La mayoría de las subunidades estructurales en la corteza representan a los TCP.

- *Aparato yuxtaglomerular*

Las células yuxtaglomerulares (YG) se forman a partir de la arteriola aferente cuando esta se aproxima al glomérulo y progenitoras sufren cambios. Las células YG están en contacto estrecho con la íntima y la luz de la arteriola de un lado de ésta , en otro lado se relacionan íntimamente con las células de mácula densa del túbulo distal y por el otro con las células extraglomerulares del mesangio, formando en conjunto el aparato o complejo yuxtaglomerular.

(fig. 17)

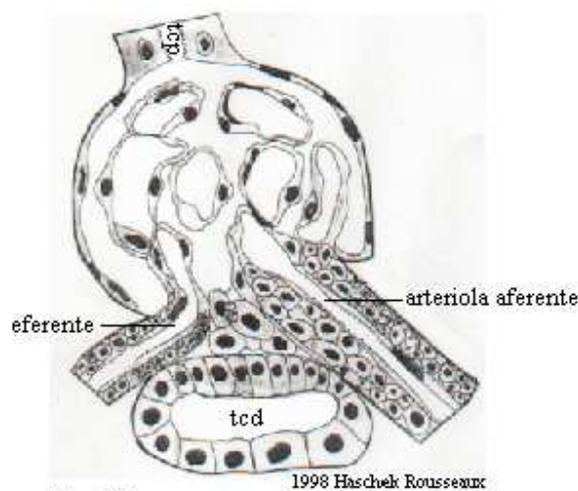


Fig.17
Dibujo del aparato yuxtaglomerular

- *Segmento delgado*

Las nefronas corticales tienen un segmento delgado corto que se continúa con la porción recta del túbulo proximal, y junto con ella forma la rama descendente del asa de Henle (ósea que en estas nefronas no hay rama delgada ascendente). En las nefronas largas el segmento delgado constituye la parte más profunda de la rama descendente.

- *Túbulo distal*

El túbulo distal es más corto que el proximal, y en él se describen tres porciones: una porción recta para formar la rama ascendente del asa de Henle, la mácula densa y la porción contorneada que sigue un trayecto corto y sinuoso en la corteza renal y termina cerca de un rayo medular continuándose con un conducto colector.

- *Mácula densa*

Es parte del complejo yuxtaglomerular, es la sección corta del túbulo distal. A partir de la mácula densa, la nefrona continúa como túbulo contorneado distal.

i. Pulmón

i.1. Características principales

En el nacimiento, el pulmón es inmaduro y no contiene alveolos ni conductos alveolares. En ratones recién nacidos, el intercambio gaseoso del pulmón ocurre en las paredes blandas de los canales y sáculos, en ductos y sacos alveolares. La estructura del pulmón permanece sin cambios entre el nacimiento y el día 4. Finalmente, una explosiva restructuración del parénquima ocurre entre los días 4 y 7.

Los pulmones yacen dentro de la cavidad torácica y están cubiertos con una membrana llamada pleura visceral, mientras que la pared torácica está cubierta por pleura parietal, formando así la cavidad pleural. Los vasos (arterias y venas

pulmonares, la arteria bronquial y vasos linfáticos) nervios y bronquios entran a los pulmones por el hilio.

El pulmón derecho tiene tres lóbulos (craneal, medio y caudal). Un cuarto lóbulo descansa en contacto con el diafragma y ápice del corazón. El pulmón izquierdo no se encuentra separado en lóbulos.

i.2. Estructura y biología celular

- *Tráquea, bronquios y bronquiolos:*

La tráquea en todos los mamíferos, se extiende caudalmente para formar las dos principales ramas o bronquios principales, cada una de las cuales entra a un lóbulo del pulmón. Algunas áreas del epitelio tienen células cuboidales, con núcleo que comprende de la mitad a tres cuartas partes de la célula. Las células parabasales son numerosas y sus núcleos son en su mayoría esféricos. Los estratos mucosos y submucosos son cada uno relativamente distintos. Las glándulas seromucosas son abundantes, pero son limitadas por la porción proximal de la tráquea.

La tráquea se continúa con la laringe, y está alineada por epitelio respiratorio pseudoestratificado. En el ratón, el epitelio consiste primariamente de células ciliadas y células serosas, células basales también están presentes.

Bronquio y bronquiolos son histológicamente similares a la tráquea. Las estructuras cartilaginosas decrecen con la disminución del diámetro del bronquio, así como también el epitelio se torna más liso.

Por otro lado, la sangre llega a los pulmones a través de dos sistemas separados: los vasos pulmonares y los vasos bronquiales. Los vasos linfáticos están confinados al intersticio extra alveolar, que es peribronquial, interlobular y el intersticio pleural.

Hay diferencias en las especies en cuanto a la proporción de células ciliadas y no ciliadas, el ratón tiene aproximadamente igual número de ellas.

i.3. Componentes celulares

La distribución y frecuencia de diez tipos de células morfológicamente distintas, se ha descrito en la superficie del epitelio de vías aéreas intrapulmonares del ratón.

Células esféricas están presentes en todas las vías aéreas, pero abarcan menos del 1% del total de células. Las células ciliadas aumentan en número progresivamente alrededor de la periferia. Las basales decrecen y poco a poco desaparecen de las pequeñas vías.

La mayoría de las células presentes son las epiteliales tipo I y tipo II, las pulmonares endoteliales, células intersticiales y los macrófagos.

Las células epiteliales tipo I son altamente diferenciadas que no se dividen, cubren aproximadamente 90-95% de la superficie alveolar. Su función principal es el mantenimiento de una barrera que previene el paso de fluidos y proteínas a través de la pared alveolar hacia los espacios aéreos.

En cuanto a las epiteliales tipo II, son células cuboidales que se localizan en las esquinas o nichos entre capilares. Sus funciones son de síntesis, almacenamiento y secreción de materiales en la superficie pulmonar.

Las células endoteliales pulmonares forman una barrera que previene la filtración de exceso de agua y macromoléculas hacia el intersticio pulmonar. Además, funciona como transporte de gases, agua y solutos, y procesa una amplia gama de sustancias como aminos, prostaglandinas, hormonas y drogas. El endotelio pulmonar es susceptible a lesiones causadas por muchos agentes tóxicos que pueden alterar sus actividades bioquímicas, afectar las funciones intercelulares o causar un severo daño llevando a la necrosis.

Los macrófagos se han identificado en tres lugares diferentes del pulmón: el intersticio, alveolos y lumen capilar. Estas células son la primera línea de defensa del pulmón, participan también en la inflamación y en respuestas inmunológicas.

i.4. Función

Las funciones primarias del sistema respiratorio son el intercambio de gases, olfato, y la protección contra agentes nocivos.

El mismo tejido de especialización que maximiza la ejecución de estas funciones también predispone a un daño tóxico.

Una variedad de mecanismos de defensa, tales como el aparato mucociliar y el sistema macrófago alveolar, pueden prevenir contacto del agente dañino con tejidos vulnerables. La localización y el tipo de lesión es el resultado de complejas interacciones entre el agente y el huésped. Los factores son las

características fisicoquímicas del agente, la severidad de la dosis, y la capacidad metabólica de los componentes celulares del huésped.

3. PERÍODO DE OBSERVACIÓN DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO EN ESTUDIOS DE TOXICIDAD SUBCRÓNICA

En la mayoría de los estudios toxicológicos el investigador está interesado en la (s) interacción (es) primarias o secundarias del compuesto con las células y tejidos corporales y no en los efectos terciarios (tales como deshidratación, anorexia, etcétera), los cuales pueden causar la muerte del animal. (CCAC.,1998)

Los animales experimentales deben ser cuidadosamente observados para analizar el carácter reversible o la persistencia de diferentes efectos tóxicos durante un período adicional a los días de haber finalizado la administración del período de tratamiento.

Un examen clínico minucioso debe ser hecho al menos una vez al día. Una observación diaria regular sirve para detectar y evitar posibles problemas como: canibalismo, animales moribundos, etc. Los animales moribundos deben ser sacrificados.

Las señales de toxicidad deben ser registradas a medida que se observan las fases, las cuales comprenden desde el momento de aparición de los primeros síntomas, su disminución y su duración. Las observaciones deben abarcar alteraciones de pelo, mucosas, ojos, sistema circulatorio y respiratorio, sistema nervioso central y periférico, actividad automotriz y manifestaciones del comportamiento en general.

Estos efectos adversos pueden ocurrir de muchas maneras, desde una muerte inmediata a pequeños cambios imperceptibles hasta meses o años después. Estos pueden ocurrir a varios niveles dentro de los cuales pueden ser un bioquímico específico, un tipo de célula, un órgano o a nivel de todo el cuerpo.

Generalmente, la toxicidad encontrada en animales de estudio ocurre con similar incidencia y severidad en humanos. Aunque se pueden presentar algunas diferencias, por esto es que los exámenes clínicos en humanos son necesarios para confirmar los resultados de los estudios de laboratorio.

4. AUTOPSIA

Todos los animales deben ser sometidos a una autopsia general. Los órganos y los tejidos deben ser conservados en un medio apropiado para el caso de un futuro examen histopatológico. Todos los órganos que presentan lesiones tóxicas deben ser examinados.

Un examen macroscópico cuidadoso de los pulmones de los animales perteneciente a cualquiera de los grupos de ensayo debe ser realizado, para evaluar el estado de salud de los animales.

Todas las alteraciones macro y microscópicas deben ser registradas. En caso de que no se detecten alteraciones macroscópicas, se hará un análisis microscópico de los órganos nobles como el corazón, riñones, pulmones e hígado. *(Souza,A.,1994)*

a. Descripción Macroscópica de la Autopsia

1. Se reciben los órganos
2. Se observan e identifican los órganos de interés
3. Se examinan los órganos de interés
4. Se describe cada órgano de interés
5. Se realizan los cortes más representativos de cada órgano

b. Descripción Microscópica de los Cortes Histológicos

La mayoría de las preparaciones histológicas corresponden a una delgadísima lámina de una pequeña porción de un órgano.

La histología microscópica solo proporciona imágenes bidimensionales de estructuras tridimensionales, por esta razón es difícil obtener una idea de la disposición espacial de los componentes hísticos.

La evaluación rutinaria microscópica utiliza fijación con formalina al 10%, empotramiento de parafina, y tinción con hematoxilina y eosina.

C. Interpretación de los resultados

La extrapolación de los resultados para seres humanos de estudios de efectos tóxicos producidos por la administración subcrónicamente de dosis repetidas de una sustancia a roedores, no es considerada como un valor absoluto ni tampoco indispensable la realización de ensayos de tolerancia en humanos. Por otro lado, los resultados de este tipo de ensayo sustentan información sobre la acción local de una sustancia.

D. Concepto de patología

La patología se ocupa de todas las alteraciones morbosas de lo natural, que producen dolor o padecimiento. Sus fuentes de estudio son el enfermo, el cadáver y el animal de prueba.

El estudio del cadáver corresponde a la Anatomía patológica, con la observación de las lesiones o alteraciones morfológicas que permiten confirmar postmortem las deducciones clínicas. Por último, el animal de prueba, base de la Fisiopatología experimental, permite reproducir los procesos morbosos en estrictas condiciones de vigilancia y contrastación.

La Clínica se ocupa individualmente de cada enfermo, como la Anatomía patológica estudia los cadáveres y la Patología experimental los animales de prueba o laboratorio.

1. CONCEPTO DE ENFERMEDAD

“Solamente los seres vivos son capaces de enfermar”. Si concebimos la enfermedad como una forma defectiva de la vida, alternativa a la forma efectiva lo sería la salud.

La enfermedad puede pasar de una a otra modalidad por gradaciones insensibles, apreciándose tan solo el contraste entre los casos extremos de cada serie.

La enfermedad es pues una alternativa a la salud, en la cual se produce una alteración cuantitativa de las condiciones vitales, que sobrepasa ciertos límites en más o en menos, produciendo un desorden en el curso típico de la vida en los individuos sanos.

La enfermedad se manifiesta por alteraciones vitales de dos tipos: las lesiones orgánicas morfológicas, ya sean anatómicas macroscópicas, tisulares microscópicas, celulares ultraestructurales o moleculares bioquímicas, y los disturbios o perturbaciones funcionales.

A su vez, cada lesión morfológica se acompaña de una perturbación funcional, cerrándose un círculo vicioso.

El tránsito del estado de salud al de enfermedad es un proceso continuo y medible, que representa la inicial alteración de unas funciones hasta entonces normales, para llegar a una nueva fisiología en condiciones alteradas, como consecuencia de la agresión causal sobre el organismo vivo.

E. Etiología esencial veterinaria

Serían circunstancias exposicionales exógenas, por ejemplo, la magnitud, o intensidad y número de incidencias morbígenas simultáneas. Los factores endógenos sería la resistencia del individuo frente a las causas.

Esta disposición para enfermar puede ser sistémica, local, circunscrita a un sistema, aparato, órgano o tejido determinado.

Las causas de enfermedad animal, se dividen primero en externas e internas, y después por su modo de acción.

1. CAUSAS EXTERNAS DE ENFERMEDAD

Las causas externas de enfermedad son todos los agentes conocidos que proceden del exterior.

a. Agentes Tóxicos

Son las sustancias que actúan nocivamente sobre el organismo por su composición química incompatible.

Los tóxicos exógenos penetran en el cuerpo animal por vía oral, respiratoria o percutánea.

Algunos producen coagulación y necrosis tisular, mientras que otros actúan mediante colicucción de los tejidos.

Las vías más importantes de eliminación de los tóxicos de cualquier naturaleza son la renal, digestiva y respiratoria.

La primera defensa antitóxica natural es la integridad de los epitelios cutáneos o mucosos, así como los vómitos o diarreas que impiden la absorción digestiva. Una vez absorbidos, el organismo procede a su detoxicación, principalmente hepática.

No obstante, según su propia actividad, dosis o puerta de entrada, los tóxicos pueden vencer estas defensas y ejercer sus efectos corrosivos, irritantes, asfixiantes o fermentativos.

En general, la marcha de una intoxicación comienza por síntomas locales digestivos, respiratorios o cutáneos, según el punto de entrada. Si la sustancia se absorbe por vía digestiva, sus efectos siguientes son hepatotóxicos y después hemáticos (estos también por vía respiratoria), para actuar luego sobre el sistema nervioso y por último producir una nefrosis por intoxicación renal.

Los órganos parenquimatosos, especialmente el hígado, desarrolla acciones metabólicas antitóxicas, y el riñón excretoras de sustancias nocivas, tanto de origen exógeno como endógeno.

F. Defensas orgánicas frente a la acción causal

1. PRIMERA REACCIÓN

La respuesta en estos casos suele ser inmediata, caracterizadas por una sobreproducción irritativa de la actividad celular ante estímulos de intensidad no habitual, como respuesta fisiopatológica primaria con exaltación de sus funciones bioquímicas, bordeando el límite superior de lo fisiológico. Si el agente efector no es neutralizado, la capacidad reaccional se agota y las células degeneran.

2. REACCIÓN LOCAL DE SEGUNDO GRADO

Preferentemente tisular, el estímulo patológico determina una alteración bioquímica y estructural del tejido afectado. La lesión bioquímica de las células,

de carácter molecular y enzimático, suele preceder a la lesión morfológica estructural.

Se caracteriza por hiperemia, exudación e infiltración inflamatorias, que tienden a restablecer la normalidad por localización y eliminación del agente morboso y la restitución a la integridad del tejido focalmente afectado.

3. REACCIÓN FOCAL DE TERCER GRADO

Se produce cuando el estímulo patógeno es suficientemente intenso o duradero, y representa el fracaso de los mecanismos de contrarregulación e inflamatorios. Las lesiones celular e hística resultan irreversibles espontáneamente, produciéndose *isquemia local* por destrucción vascular y *necrosis focal* por muerte celular.

Estas reacciones locales en cualquiera de sus grados, pero especialmente a partir del segundo de inflamación, se acompañan genéricamente de dolor como manifestación fisiopatológica de alarma y el rompimiento de la armonía de las funciones en el organismo.

4. PRIMERA FASE

La primera fase es una *reacción de emergencia inicial*, que trata de corregir inmediatamente las alteraciones originadas por la causa morbosa, restableciendo en lo posible el equilibrio fisiológico de la homeostasis orgánica.

5. SEGUNDA FASE

La segunda fase se produce cuando es superada por el agente patógeno la primera reacción de emergencia o alarma.

En este momento aparecen clínicamente los síndromes generales neuroendocrinos, metabólicos, hematológicos, alérgicos, inflamatorios y degenerativos. Las funciones vitales del individuo enfermo se desequilibran, en uno u otro sentido, y se pierde la armonía vital.

Si este desequilibrio patológico perdura, el proceso morboso entra en una tercera fase.

6. TERCERA FASE

El organismo, antes de fracasar totalmente en su defensa, trata de conseguir una situación de *tolerancia o compensación* mediante la movilización de la energía de reserva de sus órganos, aparatos y sistemas, sustituyendo con funciones vicariantes por las de los elementos inutilizados.

Por último, la reacción general puede caer en una cuarta *fase de agotamiento* con fracaso de los sistemas defensivos, reguladores o de correlación y de los mecanismos vicariantes de compensación. En esta fase el organismo es ya totalmente incapaz de una recuperación espontánea.

G. Repercusiones vitales

La alteración morfofuncional más genérica, como primera resultante del fenómeno irritativo patogénico, es una microlesión con pérdida de la semipermeabilidad selectiva de las membranas celulares.

En las células se pueden dar alteraciones morfológicas como las lesiones ultraestructurales, del núcleo o las membranas, que conducen a la degeneración y hasta la necrobiosis celular, independientemente de la necrosis total, que puede producirse por efectos deletéreos masivos, llegando a la supuración o la gangrena.

También son apreciables alteraciones celulares morfofuncionales con carácter degenerativo, regenerativo o aberrante. Representa la reacción adaptativa de la célula a las nuevas condiciones vitales que le son impuestas por los agentes causales.

Cuando estos agentes causales son tan sólo subletales para la célula y no llegan a producir su muerte rápida (*necrosis celular*) o lenta (*necrobiosis*), pueden aparecer como manifestaciones celulares reactivas la *hipertrofia*, *atrofia*, *degeneración y/o aberraciones celulares* en un sentido amplio. (Carda,P.,1990)

H. Patología toxicológica de hígado, riñón y pulmón

Para lograr un efecto, los químicos y agentes físicos deben primero entrar en contacto con el cuerpo, y luego pasar a través de las membranas celulares (absorción), antes de interactuar con el tejido. Seguidamente, los químicos son distribuidos por el cuerpo. El sitio de toxicidad del químico depende de su

distribución. La distribución se basa en sus propiedades físico-químicas, que permiten su paso por la sangre a través de las paredes de capilares hacia espacios extracelulares y después hacia el espacio intracelular. La excreción de los componentes se da principalmente a través de los sistemas urinario y gastrointestinal.

Para el análisis de los efectos tóxicos, en un estudio de toxicidad subcrónica es necesario realizar un estudio de los cambios estructurales, morfológicos y funcionales en células, tejidos y órganos, provenientes del grupo control y del grupo con tratamiento, además del mecanismo por el cual este efecto fue inducido.

El pulmón, el riñón e hígado, fueron escogidos como los órganos sobre los cuales se basará el análisis toxicológico de esta investigación, ya que son los principalmente más afectados.

1. EL HÍGADO

El objetivo principal para el entendimiento de las respuestas toxicológicas en los hígados de los animales experimentales es el de determinar si la exposición al agente causa algún riesgo en animales o en humanos.

En resumen, los siguientes conceptos son cruciales para el entendimiento de la función hepática y su patología. Las funciones exocrinas y metabólicas del tejido ocurren en el hepatocito. El hígado recibe un doble suministro de sangre, comprendidos por la circulación arterial y la portal. El intercambio entre la sangre y los hepatocitos está muy facilitado.

En toxicología patológica hepática, la desintoxicación puede ser considerada como la principal finalidad de las reacciones metabólicas del hígado,

en donde una toxina potencial es inactivada o excretada. Sin embargo, algunas veces la misma maquinaria enzimática para la desintoxicación puede resultar en un metabolito más tóxico que su progenitor.

El daño al sistema hepatobiliar es una respuesta relativamente frecuente a la exposición de agentes, Sin embargo, la diversidad de respuestas es extensa. A continuación se hará énfasis en las lesiones más importantes.

a. Respuestas no neoplásicas

Cada uno de los diferentes tipos celulares en el hígado puede responder a un ataque tóxico. El daño celular más severo resulta en necrosis. Sin embargo, un daño menor puede dar resultado a una adaptación o acumulación de varios infiltrados o pigmentos citoplasmáticos. Es importante recordar que una exposición a un agente no necesariamente conlleva a una degeneración o necrosis. Las células, particularmente los hepatocitos, tienen una gran capacidad para adaptarse a varios agentes exógenos. Mientras que las respuestas adaptativas no son manifestaciones tóxicas de la exposición a agentes, son indicadores importantes de exposición y, posiblemente, de alteraciones de la función hepática que deben de tomarse en cuenta.

a.1. Histología de los tipos de necrosis hepática

La muerte celular o la necrosis es una secuela frecuente del daño hepático. Aunque la necrosis puede afectar cualquier tipo celular del hígado, la necrosis de los hepatocitos es la más frecuente y la más estudiada.

La necrosis puede definirse como los cambios morfológicos que siguen a una muerte celular en un tejido u órgano vivo, y que se deben a la progresiva acción degenerativa de las enzimas sobre las células con lesión mortal.

Ya se ha constatado que las células mueren algún tiempo antes de que la lesión letal pueda ser identificada en microscopía óptica.

- *Necrosis lobular central*

Esta es la forma más frecuente de necrosis de hepatocitos observada en animales expuestos de forma aguda a agentes hepatotóxicos.

La necrosis ocurre en el área lobular central, con los hepatocitos necrosados alrededor de la vena central. La lesión es generalmente encontrada a lo largo del hígado con la mayoría, sino todas, de las áreas centrales lobulares afectadas. La necrosis generalmente aparece como una fila simple de hepatocitos alrededor de la vena central o puede extenderse hasta la mitad del ancho del lóbulo. Algunas veces al aumentar la dosis del agente tóxico, la lesión se expande envolviendo una mayor área del lóbulo extendiéndose hacia la triada portal. A pesar de la destrucción extensa de tejido en los casos más severos, el infiltrado de células inflamatorias es muy limitado.

Con algunos agentes, las células endoteliales de los sinusoides adyacentes a los hepatocitos necroticos también son destruidas. La necrosis hepatocelular acompañada de destrucción de las células endoteliales presenta una hemorragia en la parte centrolobular dentro de la zona de la necrosis de hepatocitos.

La necrosis centrolobular de hepatocitos es generalmente reparada rápidamente.

Este tipo de necrosis ocurre como una secuela de paro circulatorio, ya que el oxígeno es entregado por medio del paso sanguíneo continuo desde las zonas portales. La distribución de la necrosis lobular central se basa en el principio metabólico del acino.

- *Necrosis lobular medial*

Este es el tipo de necrosis histopatológica menos común de hepatocitos. Como su nombre lo indica, éste patrón de necrosis se encuentra como una banda necrótica ubicada entre la zona portal y la vena central. La zona generalmente es muy delgada, afectando solo dos o tres filas de hepatocitos del lóbulo.

- *Necrosis periportal*

La necrosis periportal de hepatocitos es menos común que la necrosis de hepatocitos en la zona central. En este patrón los hepatocitos necróticos forman un círculo completo que rodean casi todas las zonas portales. La presencia de hemorragia es poco frecuente. Como lo es en la necrosis lobular central, la respuesta inflamatoria al tejido necrótico también es limitada y algunas veces no es evidente. La reparación de la necrosis periportal, se da rápidamente.

- *Necrosis masiva*

La necrosis masiva en el hígado está caracterizada por una zona necrótica que envuelve a todo el lóbulo del hígado. Los lóbulos de las áreas menos afectadas serán el principal recurso de respuesta regenerativa, la fibrosis constituirá el mayor resultado de la regeneración.

En una etapa temprana, las áreas afectadas del hígado son de un color anormal.

Este tipo de necrosis en el hígado generalmente ocurre cuando los animales son expuestos a muy altas dosis de hepatotóxicos.

- *Necrosis focal*

Es poco frecuente encontrar la necrosis focal en estudios toxicológicos de animales.

Ésta necrosis consiste en discretas áreas con necrosis de hepatocitos, que se pueden ubicar en cualquier lugar del lóbulo hepático. Las células inflamatorias son frecuentemente encontradas en la lesión.

- *Apoptosis*

Apoptosis (derivado del griego que significa “consunción”) es una forma especial de muerte hepatocelular individual con características histológicas específicas. Se observa como hepatocitos individuales encogidos y que histologicamente son caracterizados como pequeñas densas estructuras eosinofílicas, a menudo con fragmentos cromáticos densos. Los fragmentos son fagocitados y digeridos por los fagocitos adyacentes.

Es raro encontrar la apoptosis en el hígado, y la causa y efecto de la apoptosis en el hígado de animales tratados con químicos que inducen hiperplasia hepática es poco clara.

a.2. Lipidosis hepática

La lipidosis hepática se refiere a la acumulación de triglicéridos en los hepatocitos. En algunos casos, los hepatocitos contienen una clara vacuola central grande, la cual desplaza el núcleo a la periferia de la célula. En otros casos, los hepatocitos contienen varias pequeñas vacuolas. Macroscópicamente, la lipidosis hepática se caracteriza por un parénquima hepático suave y amarillo. La lipidosis se asocia con necrosis hepática, aunque la lipidosis sola no afecta la función hepática.

La acumulación de triglicéridos en el hígado es resultado de un desequilibrio de la captación de ácido graso y su secreción como lipoproteína de poca densidad.

a.3. Infiltración y pigmentos

- *Degeneración hidrópica*

Es una acumulación de agua en la matriz celular o en el retículo endoplasmático rugoso de los hepatocitos.

- *Acumulación de glicógeno*

Su acumulación se observa en hepatocitos como manifestación de toxicidad. Se observa como vacuolas claras en el citoplasma.

- *Almacenamiento excesivo de hierro*

Ocurre como consecuencia de tratamiento con hepatotoxinas.

- *Almacenamiento excesivo de cobre*

La acumulación de cobre está asociada con necrosis y células inflamatorias.

a.4. Respuestas adaptativas hepatocelulares

La exposición del hígado a un agente puede resultar en respuestas adaptativas estructurales y funcionales que generalmente no son consideradas efectos tóxicos.

a.5. Proliferación hepatocelular

La proliferación de los hepatocitos como manifestación de toxicidad puede ocurrir de dos maneras. La primera como regeneración. La segunda proliferación se da como hiperplasia químicamente inducida. La hiperplasia no se asocia a la necrosis y se puede reconocer por el aumento en la mitosis y cambios en el citoplasma que indican inducción enzimática. Solamente dura unos pocos días aunque el animal siga en exposición al agente, el peso del hígado vuelve a la normalidad.

a.6. Lesiones del ducto biliar

La mayoría de los agentes causan daño preferencialmente a los hepatocitos comparado con otras células del hígado. Daño a los hepatocitos puede causar respuestas secundarias a otras células hepáticas, o al epitelio de los ductos biliares de las triadas hepáticas. Las lesiones pueden tomar tres diferentes formas

morfológicas: necrosis aguda, hiperplasia del ducto biliar, y proliferación de células ovaes.

a.7. Toxicidad de células no parenquimales

Estas células son rara vez afectadas por hepatotoxinas, sin embargo ocasionalmente se ven envueltas en respuestas tóxicas.

- *Lesiones endoteliales*

Aunque la necrosis de células endoteliales es una manifestación extrema de daño endotelial, algunas toxinas producen poco efecto en estas células.

- *Células Kupffer*

La respuesta fagocitaria específica de estas células a partículas de material extraño, y otras toxinas es muy conocida. En consecuencia cualquier químico que altere la función de las células Kupffer, también va a dañar al hepatocito subyacente como a otros tejidos del cuerpo. Mientras que algunos químicos pueden dañar o disminuir la actividad de estas células, otros agentes pueden acrecentar su actividad.

a.8. Cirrosis

La cirrosis es definida como fibrosis hepática y regeneración nodular. La regeneración y la fibrosis aparentemente es resultado de repetida necrosis hepatocelular.

b. Neoplasia hepática

La inducción de neoplasmas hepatocelulares es la respuesta neoplásica más común encontrada en roedores expuestos a químicos exógenos. La neoplasia hepática puede presentarse en los hepatocitos (más frecuente), ductos biliares, células endoteliales y células de Kupffer.

b.1. Neoplasia hepatocelular

A los neoplasmas malignos en hepatocitos se les conoce como carcinomas hepatocelulares. En ratas, estas lesiones son visibles macroscópicamente como nódulos firmes. En ratones, los carcinomas están compuestos por células parecidas a los hepatocitos, usualmente en un patrón trabecular.

En ratas, las lesiones benignas de hepatocitos se conocen como hiperplasia nodular o neoplasia nodular. La ambigüedad del término neoplasia nodular refleja la dificultad de distinguir la hiperplasia de la neoplasia en el hígado del roedor. Algunas de éstas lesiones pueden mejorar mientras que otras pueden progresar a carcinoma hepatocelular. En ratones, los adenomas hepatocelulares (lesiones neoplásicas) son nódulos sólidos de hepatocitos rodeados por aparentes sinusoides.

c. Evaluando la toxicidad

La mayor desventaja de un estudio clínico del animal como un “todo” es su sistema tan complejo, que obstaculiza la evaluación de las respuestas y de los posibles mecanismos por los cuales se dan las respuestas patológicas.

La evaluación macroscópica es mejor por medio de la remoción del hígado al animal. Esta evaluación para la toxicidad del hígado generalmente incluye la medición del peso del hígado. Como el peso del hígado obviamente depende del tamaño del animal, es mejor que este sea expresado en relación con el peso corporal. En la mayoría de los animales el peso relativo del hígado (peso de hígado dividido entre el peso corporal) es de aproximadamente 3.5%. La toxicidad hepática puede resultar en una disminución o aumento del tamaño del hígado. La disminución del tamaño puede ser por daño hepático agudo o crónico resultando en pérdida celular. La interpretación del aumento del tamaño del hígado es más compleja, puede ser por proliferación de los hepatocitos o por aumento del tamaño de los hepatocitos.

Las respuestas tóxicas en el hígado pueden manifestarse a corto plazo; por ejemplo, necrosis de hepatocitos ocurre en 24hr de la exposición. En contraste, otras respuestas tóxicas pueden requerir un tiempo de exposición más prolongado al agente, como lo ocurre en la inducción a cirrosis y neoplasia. El tipo de respuesta es una llave que indica la forma de acción de la toxina. Interpretando estos resultados se puede llegar a entender los efectos celulares de la toxina.

La tinción con hematoxilina y eosina demuestra muchas alteraciones de los hepatocitos y de las células epiteliales de los ductos biliares. Aunque ésta técnica provee información limitada de células no parenquimales del hígado.

1. EL RIÑÓN

a. Concepto de muerte celular

Una de las respuestas hacia el agente dañino es la muerte celular, la cual es una alteración estructural irreversible. La primera categoría se designa apoptosis (o también llamada necrobiosis o necrosis individual). La apoptosis se caracteriza por la condensación de la célula con integridad de las organelas y por la formación de una superficie protuberante que separa como una “membrana de glóbulos” (cuerpos apoptóticos). La apoptosis ocurre en tejidos individuales y no produce inflamación.

En necrosis (también llamada necrosis coagulativa) las células necróticas están típicamente aumentadas y presentan menor intensidad eosinofílica de lo normal, y puede producir poca respuesta inflamatoria; las típicas causas suelen ser la isquemia y las toxinas. El principal evento crítico de la necrosis es la pérdida del volumen celular.

Un mayor concepto en toxicología del riñón es la propensión de la nefrona a responder al daño como una unidad en vez de responder solo como un sitio subtopográfico.

b. Glomérulo

El daño glomerular puede ser inflamatorio o no inflamatorio.

b.1. Daño glomerular no inflamatorio

- *Glomeruloesclerosis focal segmentaria*

Un daño de este tipo está señalado por glomeruloesclerosis focal segmentaria. El término “focal” se refiere a la ausencia del involucramiento de todas las nefronas, y “segmentaria” denota involucramiento de solo una parte del individuo del glomérulo.

- *Nefropatía de la membrana*

La nefropatía de la membrana es causada por la deposición de complejos inmunes en los penachos glomerulares. En tinciones de rutina con H&E, la pared capilar del glomérulo afectado está ligeramente engrosada.

- *Amiloidosis*

Es una enfermedad espontánea caracterizada por la deposición extracelular de fragmentos polipéptidos de proteínas. En cortes de rutina aparece como ligero material amorfo eosinofílico dentro de los penachos glomerulares.

b.2. Daño glomerular inflamatorio

La inflamación del glomérulo se conoce como glomerulonefritis. La proliferación de células es la característica de un glomérulo inflamado. Si hay aumento en los neutrófilos en la cresta, se le designa al proceso glomerulonefritis exudativa. Y dependiendo del tipo de célula que prolifera así será el nombre del proceso (ej. Proliferación membranosa glomerulonefritis denota proliferación

celular de células mesangio y engrosamiento de la membrana). Ésta patología es raro que ocurra por daños toxicológicos.

c. Túbulo proximal

c.1. Enfermedad tubulo-intersticial

Los desórdenes que afectan a los túbulos causan reacción inmediata en el intersticio y viceversa. En etapas avanzadas de esta enfermedad se caracteriza por fibrosis intersticial, infiltrados inflamatorios intersticiales, atrofia tubular, y esclerosis glomerular.

c.2. Nefrosis tubular aguda

Se le designa a la alteración aguda del epitelio del túbulo proximal como nefrosis tubular aguda. Microscópicamente, el cambio es difuso en el túbulo contorneado proximal y está caracterizada por vacuolas citoplasmáticas.

La mayoría de las toxinas tubulares, si son dadas a concentraciones suficientemente altas, pueden inducir a muerte celular tubular. La responsabilidad del patólogo es de reportar la región de muerte celular tubular. La muerte celular puede presentarse tanto en la porción contorneada como en la recta del túbulo proximal. Pueden presentarse dos tipos de muerte celular, las cuales deben ser diferenciadas, ya sea necrosis o apoptosis.

La isquemia y los agentes que requieren de transformación metabólica para ejercer sus propiedades tóxicas, típicamente inducen a necrosis tubular y preferencialmente afecta a la porción recta. Los agentes que requieren transporte, tales como ácidos o bases, afectan preferencialmente afectan a TCP.

Los agentes que inducen a necrosis tubular proximal a altas dosis pueden inducir a apoptosis acelerada a bajas dosis.

c.3. Nefropatía crónica progresiva

La nefropatía crónica progresiva (NCP) representa la senda final de alteración renal de mecanismos provocados por hiperfiltración del concepto nefrona. La administración crónica a niveles tóxicos en ratas, aumenta la incidencia de NCP. La necrosis tubular de moderada severidad puede ser completamente reversible si las bases de la membrana se han mantenido íntegras.

c.4. Mineralización

Para poder demostrar mineralización, se recomiendan tinciones especiales. Precipitaciones de calcio pueden ocurrir y pasar desapercibidas en cortes con tinciones de rutina.

d. Necrosis papilar renal

Necrosis papilar renal (NPR) se puede descubrir microscópicamente. Puede medirse, y cada una de los grados representa un punto terminal en las lesiones del individuo animal.

d.1. Necrosis de primero grado

El grado primero se caracteriza por la pérdida de microvascularidad, asas de Henle, y células intersticiales, con reemplazo de sustancia eosinofílica. Los ductos

se mantienen intactos. El epitelio que cubre la papila puede estar intacto o focalmente afectado.

d.2. Necrosis de segundo grado

Hay necrosis focal de todas las estructuras, pero la lesión está limitada al ápice papilar.

d.3. Necrosis de tercer grado

La necrosis se extiende hasta la mitad de la papila.

d.4. Necrosis de cuarto grado

La necrosis se extiende hasta la base de la papila.

d.5. Necrosis de quinto grado

La necrosis se extiende hasta la afuera de la médula. La papila necrótica puede mineralizarse o puede estar restringida a una banda transversa en la unión con la médula. Cambios secundarios en la cortical se desarrollan como consecuencia de la obstrucción de la nefrona, reportado como glomeruloesclerosis. En algunos tejidos se puede desarrollar hiperplasia y la neoplasia como consecuencia de ésta última.

e. Hiperplasia y Neoplasia tubular

El tamaño de la lesión es una determinante de importancia para la diferenciación. El uso del microscopio de luz es una técnica limitante en la diferenciación entre la hiperplasia y la neoplasia.

El criterio universal de malignidad, esto es la metástasis, es una determinante poco común de los carcinomas tubulares renales. Como una lesión puede progresar de benigna a maligna, ambos neoplasmas deben ser indicados en el reporte. Los neoplasmas tubulares renales causados como resultado de la exposición a un agente no pueden ser diferenciados morfológicamente de tumores tubulares espontáneos.

Muchos tipos de neoplasmas renales pueden ocurrir asociados a la exposición de agentes, pero rara vez los espontáneos.

f. Antecedentes de la carcinogénesis

La inducción de agentes (en estudios subcrónicos) a la hiperplasia tubular desproporciona la respuesta daño-reparación del tejido. Y en el caso de que no se evidencie daño o reparación, representan una influencia potencial al desarrollo de tumores.

3. EL PULMÓN

a. Respuesta al agente tóxico

La exposición de los pulmones a una amplia variedad de agentes conlleva lesiones celulares o necrosis. Los agentes químicos pueden no afectar

específicamente todas las células dentro de una región, o puede seleccionar lesionando a un solo tipo de célula dentro de una región.

Las células más vulnerables para lesionarse son las células ciliadas del epitelio respiratorio, las epiteliales de tipo I y las del epitelio capilar de la región alveolar. La susceptibilidad de otras células a ser dañadas depende de la naturaleza del tóxico y su interacción con el tipo específico de célula debido a sus características únicas.

b. Consecuencias al daño parenquimal

En el parénquima pulmonar, el daño al epitelio alveolar es seguido por una proliferación de células epiteliales tipo II, cuya función normal es la secreción. Nuevamente divididas las células tipo II, pueden diferenciarse en células tipo I, que son incapaces de dividirse, o en células maduras tipo II.

Bajo condiciones normales, el total de la proliferación de células epiteliales después de la lesión es controlado por un negativo mecanismo de regeneración, así que la magnitud de la proliferación está relacionada con el total del daño. La lesión al endotelio capilar es reparada por proliferación de células endoteliales remanentes.

La proliferación de macrófagos alveolares es observada comúnmente en respuesta a la lesión. El daño específico a macrófagos alveolares conlleva a la liberación de mediadores y otras sustancias, dando como resultado una afluencia de células polimorfonucleares y monocitos hacia el pulmón. Esto es seguido por una proliferación de macrófagos remanentes, con el mantenimiento o incremento del número de células.

La proliferación de fibroblastos localizados en las paredes de las vías aéreas y en el intersticio pulmonar frecuentemente se da después de una lesión. La excesiva proliferación de fibroblastos y producción de colágeno puede conducir a una fibrosis, lo que compromete la elasticidad normal del pulmón.

Así, un daño epitelial o endotelial moderado sin lesión severa en la membrana inflamación o persistencia del agente nocivo, se puede resolver con una simple regeneración celular. Con una mayor severidad en la lesión, se puede desencadenar un proceso inflamatorio importante, lo que puede llevar a la destrucción del tejido o fibrosis.

c. Muerte celular

Cuando las células endoteliales se lesionan o mueren, se da un incremento en la permeabilidad vascular. El aumento de la permeabilidad vascular permite un mayor paso de fluido hacia los espacios intersticiales y linfáticos y eventualmente hacia espacios alveolares. Si el daño es más severo, el edema puede ser seguido de inflamación intersticial.

El daño epitelial es acompañado por una fase de exudado agudo de la inflamación caracterizado por fibrina, neutrófilos y edema. Las células tipo II empiezan a proliferar entre 12-24 horas y, después de unos días, pueden forrar alveolos. Con el tiempo, el componente inflamatorio incrementará el número de células mononucleares y macrófagos. Si el daño no es muy severo y la membrana está intacta, la resolución puede ocurrir por la transformación de células tipo II a tipo I y un alivio de la inflamación.

Sin embargo, si el epitelio alveolar y la membrana han sido lesionados, los fibroblastos se mueven rápidamente dentro del espacio alveolar, particularmente en presencia de fibrina, que formará una fibrosis intraalveolar.

Los componentes característicos de una irritación alveolar crónica son la proliferación y persistencia de células epiteliales tipo II, engrosamiento intersticial debido a fibrosis, y una acumulación de células mononucleares. El exudado intraalveolar, cuando se presenta, es usualmente compuesto de macrófagos.

I. Métodos de técnica histológica

1. PREPARACIÓN DE LOS TEJIDOS AUTOPSIADOS

Fijación es el proceso por el cual se produce la muerte y endurecimiento de los tejidos. El tejido debe colocarse en el fijador inmediatamente después de ser removido del cuerpo para conservar la relación de sus elementos como eran durante la vida. Los cortes macroscópicos deben colocarse en 20 veces su volumen de fijador.

Ejemplo de líquido fijador: formalina 10% en agua corriente.

2. PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS

A cada pieza que llega al laboratorio, se le debe dar un número de identidad, que se copia en una tirilla de papel y se coloca en la misma cápsula. Los tejidos fijados deben mantenerse en posición por medio de una sustancia firme, para permitir obtener cortes delgados y uniforme; una de las sustancias con ésta

característica es la parafina. La inclusión en parafina se logra más rápidamente y da los mejores resultados cuando se desean cortes delgados de tejidos blandos. Como la parafina no es miscible con el agua, antes es necesario que los tejidos sean deshidratados con alcohol y luego aclarados en una sustancia que sea miscible con la parafina como por ejemplo el xilol. Hay máquinas automáticas que van pasadolas cápsulas con los tejidos por las sustancias.

3. PREPARACIÓN Y OBTENCIÓN DE LOS CORTES

El bloque de parafina con la pieza se coloca en el soporte del micrótomó y la pinza del cuchillo se ajusta hacia el mismo, para comenzar a cortar lentamente. Para facilitar el cortado se aconseja aplicar un algodón mojado a la superficie del bloque y luego un cubo de hielo. El primer corte se desenrolla un pincel y se sostiene suavemente contra el cuchillo con sólo esto, generalmente los cortes siguientes se pegan al primero y se obtiene una cinta. La cinta de cortes se quita del cuchillo con un pincel y se coloca sobre agua en un baño maría. (*Técnicos de histología.,1978*)

4. PEGADO DE LOS CORTES

Se aconseja marcar las láminas con el número que corresponde a la pieza antes de montar los cortes. Sobre la superficie del portaobjeto se coloca una gota de bálsamo, el cual lo adhiere a la lámina y no permite que el corte se seque. (*Arroyo,W.,2001*)

5. PROCEDIMIENTOS RUTINARIOS DE TINCIÓN

El propósito de las tinciones es aumentar el contraste natural y hacer más evidentes diversos componentes celulares y tisulares para poder observarlos al microscopio. Los colorantes pueden ser naturales o artificiales.

La tinción más utilizada es la de Hematoxilina-Eosina, para observar tejidos tanto normales y patológicos tiñe los núcleos de color púrpura y el citoplasma y fibras colágenas de rosa. (*Selukova,I.,1999*)

CAPITULO III

METODOS Y TECNICAS

A. Metodología para la realización del diagnóstico

1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Este proyecto de graduación es de tipo experimental de casos y controles.

Definición: Estudio que comienza con la identificación de los individuos que tienen la enfermedad en cuestión (u otra variable de resultado) y un grupo apropiado de control de individuos sanos con características normales.

2. CRITERIOS DE SELECCIÓN

a.Casos

El Laboratorio de Estudios Biológicos de la UCR (LEBI) estuvo a cargo de la selección de los roedores por utilizar. Se seleccionaron ratones de la cepa NGP incluyendo tanto hembras como machos los cuales se presentaron en un rango de peso de 18-20gr.

b.Controles

Definición: Grupo central elegido de modo que se asemeje lo más posible a un grupo experimental respecto a las características pertinentes; lo ideal sería que la aplicación del estímulo experimental fuese la única diferencia importante entre ambos grupos.

Se utilizan los mismos criterios de selección de los casos a excepción del uso del medicamento en experimentación.

c. Número de Casos y Controles

Número de casos: se utilizaron 5 machos y 5 hembras.

Número de controles: el mismo de los casos, por cada caso un control.

3. DETERMINACION DE LA DURACIÓN DEL ESTUDIO

Los estudios de toxicidad subcrónica se realizan en un período de tiempo limitado de treinta a noventa días, período mínimo necesario para la obtención de la información requerida de los efectos en los animales diariamente observados durante el período de administración de la sustancia, anotándose cualquier manifestación tóxica ocurrida en cada una de las dosis. (*Brito,A.,1994*)

El Laboratorio de Estudios Biológicos de la UCR, donde se realizó la dosificación del producto y el análisis diario de cada ratón experimental, posee un protocolo en el cual se establece que el estudio de toxicidad subcrónica tipo III comprende treinta administraciones (una diaria), además de siete días después de terminada la dosificación durante los cuales se evalúa la sintomatología de cada ratón.

El propósito de este estudio es una vez concluida en el LEBI la exposición de los ratones al producto experimental, proceder a realizar el sacrificio y autopsia de los animales, con el fin de observar los cambios macroscópicos y microscópicos de los órganos más representativos.

4. MÉTODOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

Los animales experimentales se observaron cuidadosamente en el LEBI mediante un examen clínico minucioso realizado al menos una vez al día para analizar el carácter reversible o la persistencia de diferentes efectos tóxicos durante el período de dosificación, y así detectar y evitar posibles problemas.

La descripción macroscópica se realizó comparando los órganos seleccionados de los ratones con tratamiento con los órganos seleccionados de los ratones de control, mediante la observación de sus diferencias a través del estereoscopio a 25X de aumento.

La respuesta histológica a la dosificación se evaluó al comparar los cortes histológicos de los animales tratados con los de control, los cuales son ratones sin exposición al producto y por lo tanto con características normales.

5. PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

a. Sacrificio

Una vez finalizada la dosificación subcrónica, se procedió a realizar el sacrificio de todos los ratones experimentales por medio de la desnucación. Se utilizó esta técnica para evitar que los órganos se vieran expuestos a otras sustancias ajenas a la del estudio, que interfirieran en las respuestas originales de los órganos dosificados únicamente con MaxHeal®.

b. Autopsia

Se realiza un corte longitudinal siguiendo el plano sagital que comprenda tanto la región torácica como la abdominal, iniciando a nivel del manubrio esternal, descendiendo hasta la región púbica y siguiendo la línea inguinal bilateral para luego realizar la disección del tejido superficial (piel) encontrando el peritoneo a través del cual se observan las diferentes estructuras abdominales.

La cavidad torácica es a la vez expuesta por disección de la reje costal y exposición de los componentes intratorácicos junto con los órganos abdominales para realizar la fijación de los mismos.

Dicha fijación se realiza con formalina al 10% adicionando la codificación correspondiente cada especimen. Posteriormente, los diversos órganos fueron seccionados y analizados macroscópicamente.

c. Estudio macroscópico

Se utilizó pinza hemostática y bisturí con hoja #15 descartable para el corte específico de los distintos órganos.

Se realizaron los cortes macroscópicos representativos de cada órgano, para su debido estudio comparativo. Cada corte fue colocado nuevamente en su respectivo recipiente, y el resto de los tejidos fueron desechados.

A continuación, cada corte fue analizado mediante observaciones comparativas, para identificar sus diferencias.

d. Procesamiento de los tejidos

Se reciben las cápsulas selladas y numeradas

Se llevan las cápsulas a la máquina procesadora:

Fijado:

- Formalina al 10% en agua corriente

Deshidratación:

- Alcohol 70%
- Alcohol 80%
- Alcohol 95%
- Cuatro alcoholes de 100%
- Dos xilol
- Dos parafina 60%

Lavado:

- Xilol
- Alcohol

Se llevan las cápsulas a la máquina de inclusión, para formar los bloques:

- El técnico en histología interpreta el corte del patólogo
- Se coloca el corte en un molde
- Se le agrega parafina líquida 60°C
- El molde se coloca en el plato frío y se orienta el corte
- Se sella el molde con la cápsula numerada
- Se limpian excesos

Preparación de los cortes:

- Se orienta el bloque con la hoja del micrótomó en posición horizontal. Los cortes se realizaron con una hoja convencional de micrótomó de 185 mm.
- Se realiza el corte. En el estudio se realizó en promedio 1 o 2 láminas por cada animal experimental.
- Se coloca la cinta de cortes en baño maría
- Orientar el corte en la lámina
- Numerar la lámina

Secado de cortes:

Se lleva la lámina con el corte a la incubadora a 60° durante una hora, para que el corte se adhiera a la lámina y se elimine el exceso de parafina.

Proceso de tinción:

Desparafinar el corte:

- Tres cambios de xilol

Iniciar hidratación y eliminar exceso de xilol:

- Un cambio de alcohol de 100%

Hidratación:

- Un cambio de alcohol 95%
- Un cambio de alcohol 80%
- Un cambio de agua

Tinción nuclear:

- Hematoxilina
- Lavar con agua

Decoloración de la Hematoxilina:

- Tres cambios de alcohol ácido 1%
- Lavar en agua
- 15 seg.en solución acuosa de hidróxido de amonio 1% en agua destilada
- Lavar con agua

Teñir el resto del tejido:

- Solución acuosa de pícrico eosina
- Lavar en agua

Deshidratación:

- Un cambio de alcohol de 95%
- Dos cambios de alcohol de 100%
- Tres cambios de xilol

Proteger la lámina con el portaobjetos (*Arroyo, W., 2001*)

Una vez obtenidos los cortes histológicos, se procedió a observar cada uno por el microscopio de luz. Las muestras fueron leídas por un Médico Cirujano especialista en Patología

6. ASPECTOS DE ORDEN ADMINISTRATIVO***a. Lugar de estudio:***

La dosificación y el control veterinario para el estudio de toxicidad subcrónico tipo III, estuvo a cargo del personal del Laboratorio de Ensayos Biológico de la UCR respaldando los resultados proporcionados. Además, se autorizó la utilización de las instalaciones para llevar a cabo las autopsias por parte de las autoras de la tesis.

Los cortes macroscópicos y su análisis fueron realizados en Laboratorio Power Labs de la Facultad de Odontología de la Universidad Latinoamericana de Ciencia y Tecnología.

Los cortes histológicos fueron procesados y analizados en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Rafael de Alajuela.

b. Recursos financieros:

Propios

c. Recursos materiales:

- Pinzas hemostáticas
- Tijera de disección
- Mango de bisturí
- Hojas #15
- Frascos de vidrio
- Formalina 10%
- Cinta adhesiva
- Cuchareta
- Guantes
- Mascarillas
- Cera rosada
- Estereoscopio
- Campos estériles
- Agua destilada
- Cápsulas de plástico

- Máquina Procesadora de Tejidos
- Máquina de Inclusión
- Parafina
- Micrótomos
- Hoja de micrótomos de 185 mm
- Incubadora
- Microondas
- Cubreobjetos
- Máquina afiladora
- Máquina de tinción automática
- Solución de Entellan
- Hematoxilina alumínica de Harris
- Pírico-eosina
- Xilol
- Alcoholes
- Láminas
- Microscopio de luz

CAPITULO IV

DIAGNOSTICO

En este capítulo denominado diagnóstico, se expone la información recopilada en el trabajo de investigación por medio de instrumentos de trabajo. Según Hernández, Fernández y Baptista, la recolección de datos consiste en:

“Tres actividades vinculadas entre sí, las cuales son: I Selección de un instrumento de medición de los disponibles en el estudio del comportamiento o desarrollar un instrumento. II Aplicar ese instrumento de medición. Obtener las mediciones de interés para nuestro estudio. III Preparar las mediciones obtenidas para analizar y codificar los datos.”(1999,pg234)

Basándose en el párrafo anterior, se elaboraron diferentes instrumentos para obtener la información necesaria para analizar los resultados. Cada instrumento de recolección es diferente para cada variable, para el análisis clínico, macroscópico y microscópico.

A. Hallazgos clínicos

La investigación clínica es una técnica de estudio que implica la observación directa de un sujeto para fines de investigación.

Es conveniente advertir que se hace necesaria una meditación muy profunda cuando nos enfrentamos a los resultados de cualquier tipo de experimentación con animales, ya que estos poseen unas reacciones orgánicas

sobre las que pueden influir factores decisivos, que a veces se pueden pasar inadvertidos. No olvidemos que las funciones corporales de los animales están constituidas por millones de acciones y reacciones, cada una dependiente de otra o de varias.

Hay que asegurar que todas las personas responsables de realizar las observaciones en los animales, deben ser competentes para evaluar la fisiología, conducta y condición corporal normales de los animales bajo observación y las desviaciones específicas de la normalidad anticipadas. que todas las personas involucradas tengan el entrenamiento apropiado para cumplir con sus responsabilidades de observación del animal.

Ya que es de fundamental importancia estar familiarizado con la fisiología y conductas normales de la especie en estudio, y para esto el entrenamiento apropiado de todas aquellas personas involucradas en las observaciones es imprescindible, se decidió realizar el ensayo clínico de toxicidad subcrónico tipo III en el Laboratorio de Ensayos Biológicos de la UCR, para garantizar un manejo clínico apropiado de los ratones. Para la administración vía oral del producto MaxHeal® se utilizó como vehículo el agua destilada.

PRODUCTO: MAXHEAL Sol.

PRESENTACION: 10 ml solución

INICIO: 20/11/00

FINALIZACION: 13/12/00

TIEMPO DE ADMINISTRACION: 4 semanas

VIA DE ADMINISTRACION: oral

PREPARACION: 25,2 mg/ml

DOSIS: 378 mg/kg

1.REGISTRO DE PESOS (GRAMOS)

La pérdida de peso significativa puede ser uno de los signos más importantes de deterioro de la condición del animal (refleja un cambio en el consumo de agua y alimento). En estas circunstancias, la pérdida de peso siempre debe ser comparada con la de un animal control apropiada. (CCAC.,1998)

CUADRO 1
REGISTRO DE PESO (GRAMOS)
TRATAMIENTO
SEXO: HEMBRAS

	I SEMANA		II SEMANA	
	PESO INICIAL	PESO FINAL	PESO INICIAL	PESO FINAL
PROMEDIO	18,64 +- 1,32	20,66 +- 1,64	22,72 +- 1,05	22,9 +- 1,85
ERROR ESTANDAR	0,59	0,73	0,47	0,82

	III SEMANA		IV SEMANA	
	PESO INICIAL	PESO FINAL	PESO INICIAL	PESO FINAL
PROMEDIO	23,56 +- 1,97	24,54 +- 2,07	25,78 +- 2,36	25,96 +- 2,72
ERROR ESTANDAR	0,88	0,92	1,05	1,21

Fuente: LEBI

En este cuadro 1 se muestra el peso promedio inicial y final de los ratones hembras con tratamiento durante las cuatro semanas; el cual se fue incrementando paulatinamente hasta la última semana de estudio.

CUADRO 2
REGISTRO DE PESOS (GRAMOS)
TRATAMIENTO
SEXO: MACHOS

	I SEMANA		II SEMANA	
	PESO INICIAL	PESO FINAL	PESO INICIAL	PESO FINAL
PROMEDIO	19,8 +- 1,28	25,02 +- 1,4	25,72 +- 1,97	29,44 +- 1,88
ERROR ESTANDAR	0,57	0,62	0,88	0,84

	III SEMANA		IV SEMANA	
	PESO INICIAL	PESO FINAL	PESO INICIAL	PESO FINAL
PROMEDIO	30,38 +- 2,0	29,06 +- 2,11	33,06 +- 2,38	33,58 +- 2,81
ERROR ESTANDAR	0,89	0,94	1,06	1,25

Fuente: LEBI

En este cuadro se muestra el peso promedio inicial y final de los ratones machos con tratamiento durante las cuatro semanas; el cual se fue incrementando paulatinamente hasta la última semana de estudio.

CUADRO 3**REGISTRO DE PESOS (GRAMOS)****CONTROLES****SEXO: HEMBRAS**

	I SEMANA		II SEMANA	
	PESO INICIAL	PESO FINAL	PESO INICIAL	PESO FINAL
PROMEDIO	18,7 +- 0,98	20,84 +- 1,32	22,88 +- 1,75	23,42 +- 1,19
ERRO ESTANDAR	0,44	0,59	0,78	0,53

	III SEMANA		IV SEMANA	
	PESO INICIAL	PESO FINAL	PESO INICIAL	PESO FINAL
PROMEDIO	23,7 +- 1,68	25,46 +- 1,97	25,44 +- 1,78	26,08 +- 1,86
ERROR ESTANDAR	0,75	0,88	0,89	0,83

Fuente: LEBI

En este cuadro se muestra el peso promedio inicial y final de los ratones controles hembras durante las cuatro semanas; el cual se fue incrementando paulatinamente hasta la última semana de estudio.

CUADRO 4**REGISTRO DE PESOS (GRAMOS)****CONTROLES****SEXO: MACHOS**

	I SEMANA		II SEMANA	
	PESO INICIAL	PESO FINAL	PESO INICIAL	PESO FINAL
PROMEDIO	18,92 +- 1,35	21,44 +- 1,63	27,26 +- 1,49	26,96 +- 1,84
ERROR ESTANDAR	0,6	0,73	0,66	0,82

	III SEMANA		IV SEMANA	
	PESO INICIAL	PESO FINAL	PESO INICIAL	PESO FINAL
PROMEDIO	27,9 +- 2,0	28,38 +- 1,87	29,76 +- 2,12	30,18 +- 2,08
ERROR ESTANDAR	0,89	0,83	0,95	0,93

Fuente: LEBI

En este cuadro se muestra el peso promedio inicial y final de los ratones machos control durante las cuatro semanas; el cual se fue incrementando paulatinamente hasta la última semana de estudio.

2. REGISTRO DE SOBREVIDA

CUADRO 5

SOBREVIDA TRATAMIENTO

SEXO: HEMBRAS

# DE RATÓN	1 DÍA					2 DÍA	3 DÍA	4 DÍA	5 DÍA	6 DÍA	7 DÍA
	30'	1 HR	2 HS	4 HS	6 HS						
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

# DE RATÓN	8 DÍA	9 DÍA	10 DÍA	11 DÍA	12 DÍA	13 DÍA	14 DÍA
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+

# DE RATÓN	15 DÍA	16 DÍA	17 DÍA	18 DÍA	19 DÍA	20 DÍA	21 DÍA
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+

# DE RATÓN	22 DÍA	23 DÍA	24 DÍA
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+

Fuente: LEBI

INTERPRETACIÓN:

(+)= VIVO (-)= MUERTO

El registro de sobrevivencia de los ratones hembras con tratamiento, se realiza evaluando diferentes parámetros. La observación del primer día se efectúa en cinco etapas, el primer registro se hace a los treinta minutos después de la primera dosis, luego a la hora, a las dos horas, a las cuatro horas y la última del primer día es a las seis horas. Los días siguientes hasta el último (día 24) se registra una observación diaria.

CUADRO 6
SOBREVIDA TRATAMIENTO
SEXO: MACHOS

# DE RATÓN	1 DÍA					2 DÍA	3 DÍA	4 DÍA	5 DÍA	6 DÍA	7 DÍA
	30'	1 HR	2 HS	4 HS	6 HS						
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

# DE RATÓN	8 DÍA	9 DÍA	10 DÍA	11 DÍA	12 DÍA	13 DÍA	14 DÍA
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+

# DE RATÓN	15 DÍA	16 DÍA	17 DÍA	18 DÍA	19 DÍA	20 DÍA	21 DÍA
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+

# DE RATÓN	22 DÍA	23 DÍA	24 DÍA
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+

Fuente: LEBI

INTERPRETACIÓN:

(+)= VIVO (-)= MUERTO

El registro de sobrevida de los ratones machos con tratamiento, se realiza evaluando diferentes parámetros. La observación del primer día se efectúa en cinco etapas, el primer registro se hace a los treinta minutos después de la primera dosis, luego a la hora, a las dos horas, a las cuatro horas y la última del primer día es a las seis horas. Los días siguientes hasta el último (día 24) se registra una observación diaria.

CUADRO 7
SOBREVIDA CONTROLES
SEXO:HEMBRA

# DE RATÓN	1 DÍA					2 DÍA	3 DÍA	4 DÍA	5 DÍA	6 DÍA	7 DÍA
	30'	1 HR	2 HS	4 HS	6 HS						
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

# DE RATÓN	8 DÍA	9 DÍA	10 DÍA	11 DÍA	12 DÍA	13 DÍA	14 DÍA
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+

# DE RATÓN	15 DÍA	16 DÍA	17 DÍA	18 DÍA	19 DÍA	20 DÍA	21 DÍA
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+

# DE RATÓN	22 DÍA	23 DÍA	24 DÍA
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+

Fuente: LEBI

INTERPRETACIÓN:

(+)= VIVO (-)= MUERTO

El registro de sobrevivencia de los ratones hembras control, se realiza evaluando diferentes parámetros. La observación del primer día se efectúa en cinco etapas, el primer registro se hace a los treinta minutos después de la primera dosis, luego a la hora, a las dos horas, a las cuatro horas y la última del primer día es a las seis horas. Los días siguientes hasta el último (día 24) se registra una observación diaria.

CUADRO 8
SOBREVIDA TRATAMIENTO
SEXO: HEMBRAS

# DE RATÓN	1 DÍA					2 DÍA	3 DÍA	4 DÍA	5 DÍA	6 DÍA	7 DÍA
	30'	1 HR	2 HS	4 HS	6 HS						
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

# DE RATÓN	8 DÍA	9 DÍA	10 DÍA	11 DÍA	12 DÍA	13 DÍA	14 DÍA
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+

# DE RATÓN	15 DÍA	16 DÍA	17 DÍA	18 DÍA	19 DÍA	20 DÍA	21 DÍA
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+

# DE RATÓN	22 DÍA	23 DÍA	24 DÍA
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+

INTERPRETACIÓN:

(+)= VIVO (-)= MUERTO

El registro de sobrevivencia de los ratones hembras con tratamiento, se realiza evaluando diferentes parámetros. La observación del primer día se efectúa en cinco etapas, el primer registro se hace a los treinta minutos después de la primera dosis, luego a la hora, a las dos horas, a las cuatro horas y la última del primer día es a las seis horas. Los días siguientes hasta el último (día 24) se registra una observación diaria.

3. RESUMEN DE PARÁMETROS EVALUADOS EN RATONES CON TRATAMIENTO.

CUADRO 9

RESUMEN DE PARÁMETROS EVALUADOS TRATAMIENTO

PARAMETROS EVALUADOS	I SEMANA		II SEMANA		III SEMANA		IV SEMANA	
	Hem bra	mac ho	hemb ra	mac ho	hem bra	mac ho	hem bra	Mac ho
ATAXIA	0	0	0	0	0	0	0	0
PARALISIS ANTERIOR	0	0	0	0	0	0	0	0
PARALISIS POSTERIOR	0	0	0	0	0	0	0	0
ACT.PRENSIL ANTERIOR	0	0	0	0	0	0	0	0
ACT.PRENSIL POSTERIOR	0	0	0	0	0	0	0	0
REACCION DE ALARMA	0	0	0	0	0	0	0	0
PALIDEZ	0	0	0	0	0	0	0	0
ERECCION DE LA COLA	0	0	0	0	0	0	0	0
PILOERECCION	0	0	0	0	0	0	0	0
EQUILIBRIO	0	0	0	0	0	0	0	0
REFLEJO DE ENDEREZAMIENTO	0	0	0	0	0	0	0	0
DESHIDRATACION	0	0	0	0	0	0	0	0
MICCION	0	0	0	0	0	0	0	0
DEFECACION	0	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: LEBI

Interpretación:

(+) = aumenta

(-) = disminuye

(0) = no se alteró

B. Hallazgos macroscópicos

1. HALLAZGOS MACROSCÓPICOS HEMBRAS CON TRATAMIENTO

TABLA #1

HEMBRA #1

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones con tratamiento MaxHeal®	Pulmones	Coloración parda. En el lóbulo inferior del pulmón derecho hay presencia de trauma posiblemente por la forma de sacrificio. En el resto de los pulmones no se observa ninguna anomalía.
	Riñones	Coloración amarillo paja. No se distingue presencia de anomalías.
	Hígado	Color amarillo intenso. No se distingue presencia de anomalías.

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

La tabla 1 muestra que en la hembra tratada con MaxHeal® no se observa ninguna anomalía evidente

TABLA #2
HEMBRA #2

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones con tratamiento MaxHeal®	Pulmones	Los pulmones se observan de coloración parda claro y se palpan de consistencia blanda. No se observa ninguna anomalía.
	Riñones	No se distingue presencia de anomalías.
	Hígado	No se distingue presencia de anomalías

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

En los órganos de hembra #2 con tratamiento no se observan anomalías.

TABLA #3**HEMBRA #3**

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones con tratamiento MaxHeal®.	Pulmones	Los pulmones se observan diáfanos en toda su extensión
	Riñones	Los riñones se observan de coloración amarillo paja. No se observa ninguna anomalía.
	Hígado	El hígado se observa de color amarillo claro. No se distingue presencia de anomalías.

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

En esta tabla se muestran que los órganos se encuentran dentro de los patrones normales

TABLA #4**HEMBRA #4**

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones con tratamiento MaxHeal®.	Pulmones	en el pulmón derecho se observa los lóbulos superior e inferior con una diafanización moderada, mientras que el lóbulo medio se presenta diáfano en toda su extensión. El pulmón izquierdo se observa con una diafanización moderada.
	Riñones	se observan de color blanquesino. La corteza y la médula están bien diferenciados. No se observa ninguna anomalía.
	Hígado	el parénquima del hígado se observa de aspecto muy vital. No se distingue presencia de anomalías

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

En este caso no se encuentra ningún tipo de anomalía.

TABLA #5**HEMBRA #5**

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones con tratamiento MaxHeal®.	Pulmones	se observan los lóbulos de ambos pulmones sin presencia de trauma y de color claro en la pared del mediastino. El lóbulo superior del pulmón derecho es de coloración más clara comparado con los demás lóbulos de ambos pulmones.
	Riñones	son de color amarillo claro. No se observa ninguna anomalía.
	Hígado	el hígado se observa de color amarillo claro.

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

Los órganos de este ratón se encuentran dentro de los patrones normales.

2. HALLAZGOS MACROSCÓPICOS MACHOS CON TRATAMIENTO

TABLA #6

MACHO #1

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones con tratamiento MaxHeal®.	Pulmones	los pulmones se observan diáfanos en toda su extensión. En las paredes parietal y diafragmática no hay presencia de congestión. El parénquima es de coloración clara.
	Riñones	no se distingue presencia de anomalías.
	Hígado	No se observan anomalías en los lóbulos

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

Según la observación macroscópica de estos órganos, no hay evidencia de anomalía alguna.

TABLA #7**MACHO #2**

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones con tratamiento MaxHeal®.	Pulmones	Se observa la traquea y los bronquios completamente limpios, también se logra identificar la arteria pulmonar y vena. Los lóbulos se observan de aspecto diáfano. (estereoscopio 25x)
	Riñones	No se distinguen anomalías
	Hígado	No se observan anomalías.

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

En este ratón macho #2 con tratamiento no se encuentra evidencia de alguna anomalía.

TABLA #8**MACHO #3**

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones con tratamiento MaxHeal®.	Pulmones	se logran observar los lóbulos de ambos pulmones de color blanquesino, con un punteado rojo poco marcado. Los pulmones se palpan de consistencia blanda.
	Riñones	no se distingue presencia de anomalías.
	Hígado	el hígado se palpa de consistencia blanda. Hay presencia de una zona de traumatismo talves por la forma de sacrificio, en el tejido que se logra observar no se distingue ninguna anomalía. La arteria hepática se encuentra libre de tejido sanguinolento

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

Todo dentro de las características normales, con excepción de la zona de traumatismo en el hígado consecuencia de la forma de sacrificio.

TABLA #9**MACHO #4**

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones con tratamiento MaxHeal®.	Pulmones	El lóbulo inferior del pulmón izquierdo se observa moderadamente diáfano, en la cara mediastinal se observa trauma. El pulmón derecho también se observa moderadamente diáfano ya que presenta ligero trauma.
	Riñones	Se puede observar los riñones de un aspecto normal de color amarillo pálido.
	Hígado	Se palpa de consistencia firme y presenta color amarillo paja.

En este macho #4 todo se encuentra dentro de los parámetros normales, con excepción de una ligera zona de trauma los pulmones.

3. RESUMEN DE LOS HALLAZGOS MACROSCÓPICOS MÁS IMPORTANTES DEL GRUPO TRATAMIENTO

CUADRO #10

“ INCIDENCIA DE HEMORRAGIA EN PULMÓN DEL GRUPO DE TRATAMIENTO”

	Hembra	Macho	TOTAL Absoluto
Hemorragia	2	2	4
Sin anormalidades	3	2	5
TOTALES	5	4	9

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

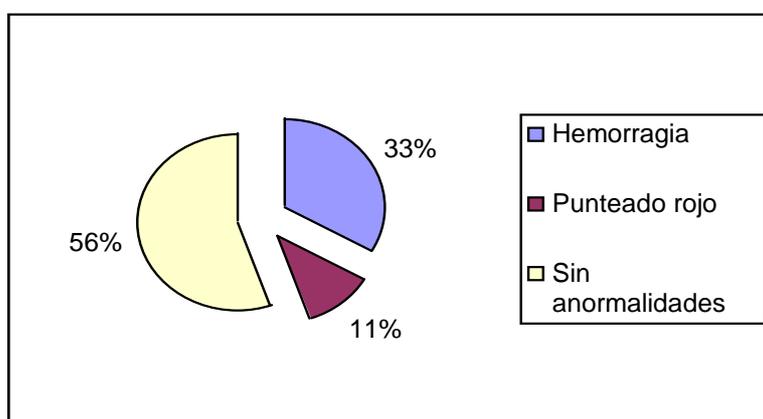
En el cuadro anterior se puede observar la comparación de la incidencia de hemorragia entre hembras y machos.

La mayoría de la población no presenta hemorragia, mientras que 4 individuos, 2 hembras y 2 machos sí tienen focos de traumatismo.

Como se puede notar en el pulmón no se observó ningún otro hallazgo macroscópico.

GRÁFICO #1

“ INCIDENCIA DE HEMORRAGIA EN PULMÓN DEL GRUPO DE TRATAMIENTO”



Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

El gráfico 1 ilustra la incidencia de hemorragia en el grupo de tratamiento. Un 56%, la mayor parte de la población no presenta anomalías.

En el 44% del grupo se observa algún tipo de traumatismo, 33% con hemorragia y un 11% que representa a un único individuo con punteado rojo poco marcado.

CUADRO #11

**“HALLAZGOS MÁS IMPORTANTES EN HÍGADO DEL GRUPO
TRATAMIENTO”**

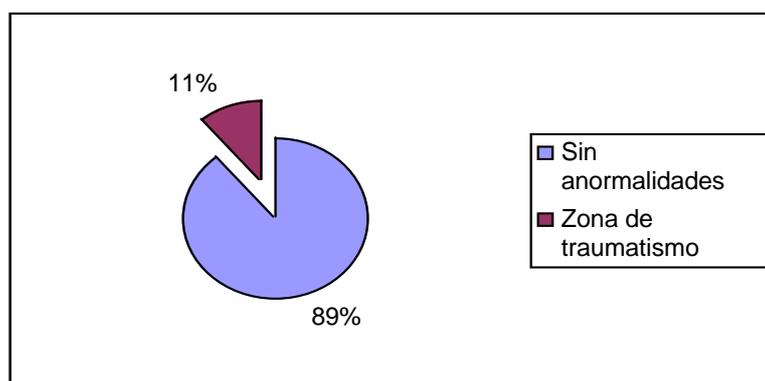
	Hembra	Macho	TOTAL Absoluto
No se observan anomalías	5	3	8
Zona de traumatismo	–	1	1
TOTALES	5	4	9

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

Entre los hallazgos hepáticos más evidentes macroscópicamente, se puede notar que ninguna de las 5 hembras presentó cambios, y del grupo de los machos solo se hizo presente solamente un macho con traumatismo, en los otros 3 ratones machos no se observaron anomalías.

GRÁFICO #2

“HALLAZGOS MÁS IMPORTANTES EN HÍGADO DEL GRUPO
TRATAMIENTO”



Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

El gráfico 2 solamente hace más evidente la información explicada en el cuadro anterior.

Un 89% del grupo de tratamiento, es decir 8 ratones machos y hembras no presentan anomalías macroscópicamente. Y un único ratón representa a un 11% con traumatismo hepático.

4. HALLAZGOS MACROSCÓPICOS HEMBRAS CONTROL

TABLA #10**HEMBRA #1**

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones control.	Pulmones	el pulmón izquierdo y el lóbulo medial del pulmón derecho son diáfanos en toda su extensión. En el lóbulo superior e inferior del pulmón derecho se observa trauma en la pared mediastinal, y una diafanización moderada en el resto del tejido.
	Riñones	los riñones son de coloración amarillo claro. Se observa la corteza de aspecto oscuro. En el resto del tejido no se distinguen anomalías.
	Hígado	el hígado se observa de color amarillo paja. No se observa ninguna anomalía.

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

La única observación que se puede destacar es la zona de trauma en el pulmón, debido a la forma de sacrificio.

TABLA #11

HEMBRA #2

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones control.	Pulmones	los tres lóbulos del pulmón derecho se observan de coloración clara, aunque en el lóbulo medio e inferior hay una ligera presencia de trauma. El pulmón izquierdo y la llingula son diáfanos en toda su extensión.
	Riñones	se observan de coloración amarillo paja. No se observa ninguna anomalía.
	Hígado	El hígado es de color amarillo claro. No se observa ninguna anomalía.

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

Con excepción de una ligera zona de trauma en el pulmón, el resto se observa sin ninguna anomalía.

TABLA #12**HEMBRA #3**

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones control.	<p>Pulmones</p> <p>Riñones</p> <p>Hígado</p>	<p>los pulmones se encuentran moderadamente diáfanos. Los lóbulos superior y medio del pulmón derecho se observan sin congestión.</p> <p>no se distingue presencia de anomalías.</p> <p>no se distingue presencia de anomalías.</p>

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

En esta tabla #12 no se observa ningún tipo de anomalía.

TABLA #13**HEMBRA #4**

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones control.	Pulmones	los pulmones se observan de coloración parda en general, pero en toda la periferia presentan un color más blanquesino
	Riñones	no se distingue presencia de anomalías.
	Hígado	no se distingue presencia de anomalías.

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

Los órganos de este ratón se encuentran en perfecto estado, sin ninguna anomalía.

TABLA #14

HEMBRA #5

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones control.	Pulmones	los pulmones se observan de coloración parda y se palpan de consistencia blanda. No se observa ninguna anomalía en el resto del tejido.
	Riñones	no se distingue presencia de anomalías.
	Hígado	no se distingue presencia de anomalías.

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

La hembra #5 presenta los órganos dentro de las características normales.

5. HALLAZGOS MACROSCÓPICOS MACHOS CONTROL

TABLA #15

MACHO #1

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones control.	Pulmones	los pulmones se observan de coloración parda. Todo el pulmón se palpa de consistencia blanda.
	Riñones	no se distingue presencia de anomalías.
	Hígado	el hígado se observa de color amarillo paja y de consistencia firme. No se observa ninguna anomalía.

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

En este caso todo se encuentra dentro de los parámetros normales.

TABLA #16

MACHO#2

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones control.	Pulmones	no se observan anomalías en los pulmones, solamente hay presencia de trauma en el lóbulo medio del pulmón derecho talves por la forma de sacrificio. Se logra observar la aorta, la cual no presenta anomalías.
	Riñones	los riñones son de coloración amarillo opaco. No se distinguen anomalías.
	Hígado	el hígado se observa de color amarillo opaco. No se distinguen anomalías.

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

En el pulmón se encuentra una ligera zona de trauma, por lo demás se encuentra dentro de las características normales.

TABLA #17**MACHO #3**

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones control.	Pulmones	hay presencia de hemorragia en los pulmones, pero en su periferia se logran observar diáfanos
	Riñones	no se distingue presencia de anomalías.
	Hígado	no se distingue presencia de anomalías

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

No se distinguen anomalías importantes en esta tabla #17.

TABLA #18

MACHO #4

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones control.	Pulmones	en toda la periferia de los pulmones se observa un color blanquesino.
	Riñones	no se distingue presencia de anomalías.
	Hígado	es de consistencia compacta. No se observan anomalías.

Ningún tipo de alteración evidente, todo dentro de los patrones normales.

TABLA #19**MACHO #5**

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente en los cortes macroscópicos de pulmón, riñón e hígado de ratones control.	Pulmones	los pulmones no se observan diáfanos. Se logra distinguir la aorta ascendente. No se observan anomalías.
	Riñones	los riñones son de color amarillo paja intenso. No se observan anomalías.
	Hígado	el hígado se observa de coloración amarillo paja. No se observan anomalías.

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

No se observó ninguna anomalía. Todo dentro de las características normales.

6. RESUMEN DE LOS HALLAZGOS MACROSCÓPICOS MÁS IMPORTANTES DEL GRUPO DE CONTROL

CUADRO #12

“ INCIDENCIA DE HEMORRAGIA EN PULMÓN DEL GRUPO DE CONTROL”

	Hembra	Macho	TOTAL Absoluto
Hemorragia	2	1	3
Sin anormalidades	3	4	7
TOTALES	5	5	10

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

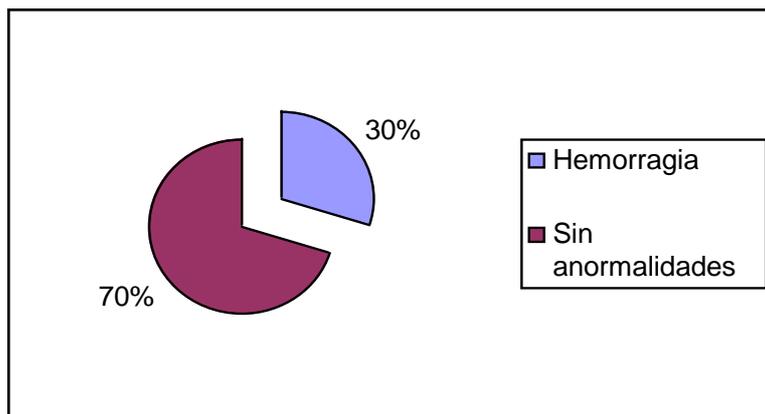
En el cuadro 11 se refleja que la mayor parte de los machos no presentan anormalidades en pulmón, sino que solamente 1 muestra hemorragia.

En el grupo de hembras, 3 de ellas están sin cambios macroscópicos, mientras que solo 2 presentan hemorragia.

Hay mayor cantidad de machos sin anormalidades comparados con las hembras con iguales características. Por ésta afirmación, podemos deducir entonces que hay más cantidad de hembras que machos con hemorragia.

GRÁFICO #3

“ INCIDENCIA DE HEMORRAGIA EN PULMÓN DEL GRUPO DE CONTROL”



Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

Se presentan 7 ratones sin anomalías en pulmón, lo que significa un 70%.

Y un 30% del grupo de control que presenta hemorragia pulmonar, es decir, 3 individuos.

Se concluye entonces, que la mayoría de la población se encuentra sin traumatismo.

CUADRO #13

“ COMPARACIÓN EN LA INCIDENCIA DE HEMORRAGIA PULMONAR DE HEMBRAS Y MACHOS DEL GRUPO DE CONTROL Y TRATAMIENTO”

	Tratamiento		TOTAL	Control		TOTAL
	Hembra	Macho		Hembra	Macho	
Hemorragia	2	1	3	2	1	3
Otro traumatismo	–	1	1	–	–	
Sin anormalidades	3	2	5	3	4	7
TOTAL	5	4	9	5	5	10

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs 2001

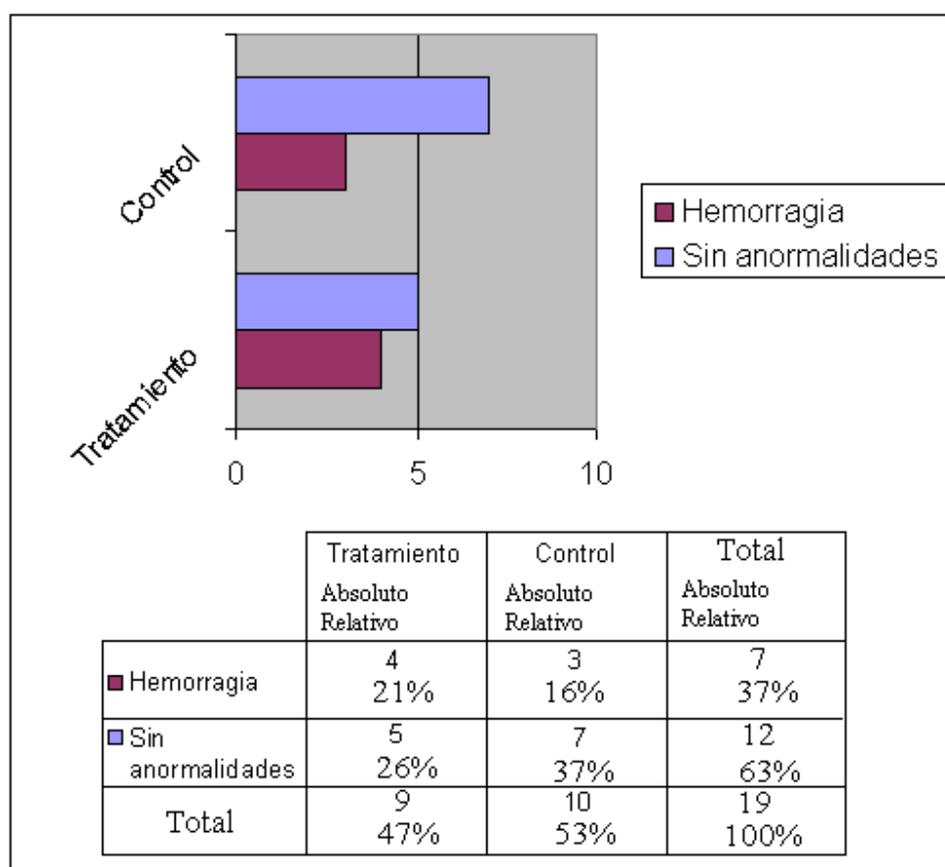
Se puede ver claramente que las hembras y machos que presentan hemorragia están exactamente en igual cantidad, 2 hembras y 1 macho de ambos grupos son los que se encuentran en ésta categoría.

A los ratones que mostraron otro tipo de traumatismo, solo se hizo presente un individuo macho dosificado, que se le observó un punteado rojo.

En partes iguales están las hembras y los machos que no tuvieron anormalidades macroscópicas, más específicamente, se puede exponer que en el grupo de las hembras son 3 del grupo de tratamiento y 3 del grupo de control, para un total de 6 hembras que no mostraron cambios, y los machos también fueron 6 sin anomalías, 2 de tratamiento y 4 de control. Pero desde el punto de vista de grupo de tratamiento y control, el segundo comprende más individuos sin hallazgos que el primero.

GRÁFICO #4

“ COMPARACIÓN EN LA INCIDENCIA DE HEMORRAGIA PULMONAR DEL GRUPO DE CONTROL Y TRATAMIENTO”



Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

A grandes rasgos se nota que la barra gráfica que representa a los controles sin anomalías es de mayor tamaño, lo que indica que éste tiene 7 individuos en esa barra mientras que los de tratamiento solo 5.

De la totalidad de la población, 12 individuos un 63% no presentan anomalías, y un 37% presentan hemorragia, incluyendo aquí al individuo que presenta un punteado rojo.

También se deduce que hay más dosificados con hemorragia que los que los controles.

CUADRO #14

“COMPARACIÓN DE LOS HALLAZGOS MACROSCÓPICOS EN HÍGADO DE LAS HEMBRAS Y MACHOS DE LOS GRUPOS DE CONTROL Y TRATAMIENTO”

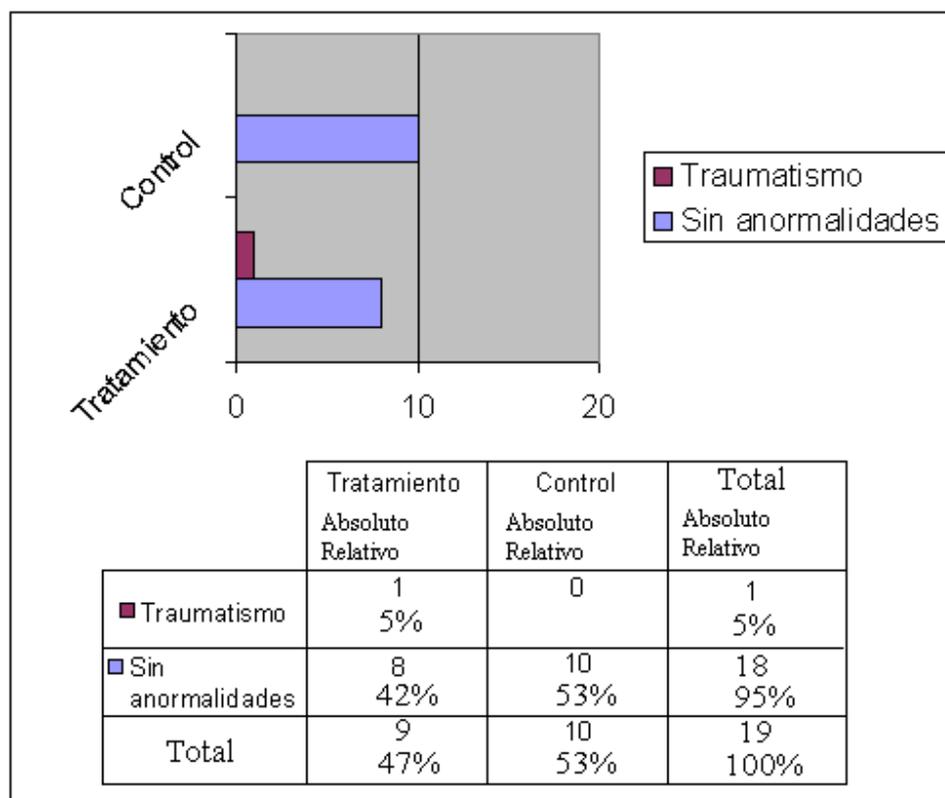
	Tratamiento		TOTAL	Control		TOTAL
	Hembra	Macho		Hembra	Macho	
No se observan anomalías	5	3	8	5	5	10
Zona de traumatismo	–	1	1	–	–	
TOTALES	5	4	9	5	5	10

Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

Éste cuadro refleja que el único hallazgo macroscópico en hígado se hizo presente en un macho tratamiento, el cual presenta una zona de traumatismo. El resto de la población no presenta anomalías.

GRÁFICO #5

“COMPARACIÓN DE LOS HALLAZGOS MACROSCÓPICOS EN HÍGADO DE LOS GRUPOS DE CONTROL Y TRATAMIENTO”



Fuente: Observaciones realizadas en los Laboratorios PowerLabs, ULACIT. 2001

La comparación anterior es obvia, el 53% del total de la población en estudio representa a todos los ratones del grupo control que no mostraron anomalías, y en el grupo de tratamiento un 5% que es igual a 1 individuo que mostró trauma, mientras que el 42% restante de éste grupo no tuvo anomalías evidentes macroscópicamente.

Se deduce que el 95% de la población se encuentra sin hallazgos y solo el 5% presenta trauma.

C. Hallazgos microscópicos

1. HALLAZGOS MICROSCOPICOS DE HEMBRAS CON TRATAMIENTO

TABLA #20

HEMBRA #1

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en las hembras con tratamiento MaxHeal®	Pulmones	Se observa extensa hemorragia
	Riñones	Moderada presencia de vacuolas en la superficie del riñón Los túbulos y los glomérulos no presentan anormalidades.
	Hígado	Hay presencia de pequeños focos inflamatorios con necrosis.

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.200

TABLA #22

HEMBRA #3

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en las hembras con tratamiento MaxHeal®	Pulmones	No se observa ninguna anomalía
	Riñones	Se presenta una cantidad casi nula de células vacuoladas en la superficie del riñón Los túbulos y los glomérulos no presentan anomalías
	Hígado	Se observa poca presencia de células inflamatorias y pequeños grupos de células con necrosis (apoptosis)

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

TABLA #23

HEMBRA #4

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en las hembras con tratamiento MaxHeal®	Pulmones	No se observa ninguna anomalía
	Riñones	Moderada presencia de vacuolas en la superficie del riñón
	Hígado	Se observa acúmulos dispersos de células de Kuffer por el hígado.

TABLA #24**HEMBRA#5**

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en las hembras con tratamiento MaxHeal®	Pulmones	No se observa ninguna anormalidad
	Riñones	Se presenta una cantidad casi nula de células vacuoladas en la superficie del riñón
	Hígado	Mínima presencia de células inflamatorias y necrosis. No hay presencia de células en mitosis

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

2. HALLAZGOS MICROSCÓPICOS DE MACHOS CON TRATAMIENTO

TABLA #25

MACHO #1

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en los machos con tratamiento MaxHeal®	Pulmones	No se observa ninguna anomalía
	Riñones	Mucha presencia de células vacuoladas en la superficie del riñón
	Hígado	No se observa ninguna anomalía

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

TABLA #26

MACHO #2

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en los machos con tratamiento MaxHeal®	Pulmones	No se observa ninguna anomalía
	Riñones	Mucha presencia de células vacuoladas en la superficie del riñón
	Hígado	Se observan focos necróticos con inflamación

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

TABLA #27

MACHO #3

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en los machos con tratamiento MaxHeal®	Pulmones	Presenta un cuadro histológico normal
	Riñones	Se presenta una cantidad moderada de células vacuoladas en la superficie del riñón
	Hígado	No se observa ninguna anomalía

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Cateólica.2001

TABLA #28

MACHO #4

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en los machos con tratamiento MaxHeal®	Pulmones	Se observa hemorragia extensa.
	Riñones	Se presenta una cantidad moderada de células vacuoladas en la superficie del riñón
	Hígado	Hay poca inflamación con necrosis. Se observa también presencia de mitosis.

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

3. RESUMEN DE LOS HALLAZGOS MICROSCÓPICOS MÁS IMPORTANTES DEL GRUPO TRATAMIENTO

CUADRO #15

“ INCIDENCIA DE HEMORRAGIA EN PULMÓN DEL GRUPO DE TRATAMIENTO”

	Hembra	Macho	TOTAL Absoluto
Hemorragia	1	1	2
Sin anormalidades	4	3	7
TOTALES	5	4	9

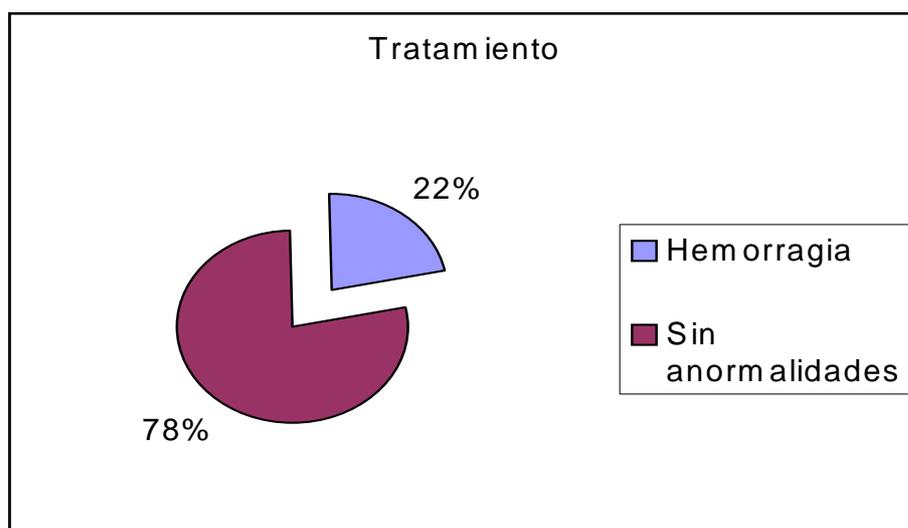
Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

En el cuadro anterior se observa que la mayoría de las hembras y machos no presentan anormalidades, de hecho están muy comparados ya son 4 machos y 3 las hembras.

De los ratones que presentan hemorragia solamente lo hace 1 individuo de cada sexo.

GRÁFICO #6**“ INCIDENCIA DE HEMORRAGIA EN PULMÓN DEL GRUPO DE TRATAMIENTO”**

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001



Se observa que la incidencia de hemorragia es mínima, apenas un 22%, lo que representa 2 individuos. La mayoría de la población, un 78% no presenta cambios en su histología normal.

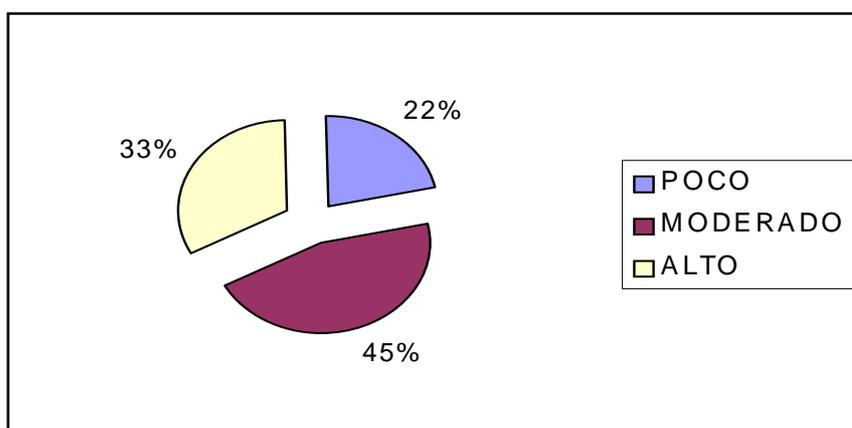
CUADRO #16**“PORCENTAJE DE CÉLULAS VACUOLADAS EN RIÑÓN DEL GRUPO DE TRATAMIENTO”**

	Hembra	Macho	TOTAL Absoluto
Poco grado de vacuolización	2	–	2
Moderado grado de vacuolización	2	2	4
Alto grado de vacuolización	1	2	3
TOTALES	5	4	9

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

El cuadro 15 muestra de forma numérica los ratones que presentaron células vacuoladas, se logra observar que la mayor cantidad de individuos presentan un grado moderado de vacuolización, 2 machos y 2 hembras.

En el grupo de los machos hay presencia de moderada y alta cantidad de vacuolas, y en el de las hembras hay presencia de los 3 grados de vacuolización.

GRÁFICO #7**“PORCENTAJE DE CÉLULAS VACUOLADAS EN RIÑÓN DEL GRUPO DE TRATAMIENTO”**

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

En el gráfico 7 se resume la incidencia de células vacuoladas en el grupo de tratamiento con MaxHeal® compuesto por 9 individuos, en donde se puede apreciar que el 100% de los ratones del grupo de tratamiento presentan algún grado de vacuolización:

- El 23% corresponde a 2 ratones hembras con pocas células vacuoladas
- El 44% del grupo con una cantidad moderada de vacuolas corresponde a 4 ratones, de los cuales 2 son hembras y 2 machos.
- El último 33% restante pertenece al grupo que tiene un alto grado de vacuolas, este corresponde a 3 ratones, 2 son machos y 1 es hembra.

CUADRO #17

“HALLAZGOS MICROSCÓPICOS EN HÍGADO DEL GRUPO DE TRATAMIENTO”

	Hembra	Macho	TOTAL Absoluto
Inflamación, Necrosis, Mitosis	–	1	1
Inflamación, Necrosis	3	1	4
Mitosis	1	–	1
Patrón histológico normal	1	2	3
TOTALES	5	4	9

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

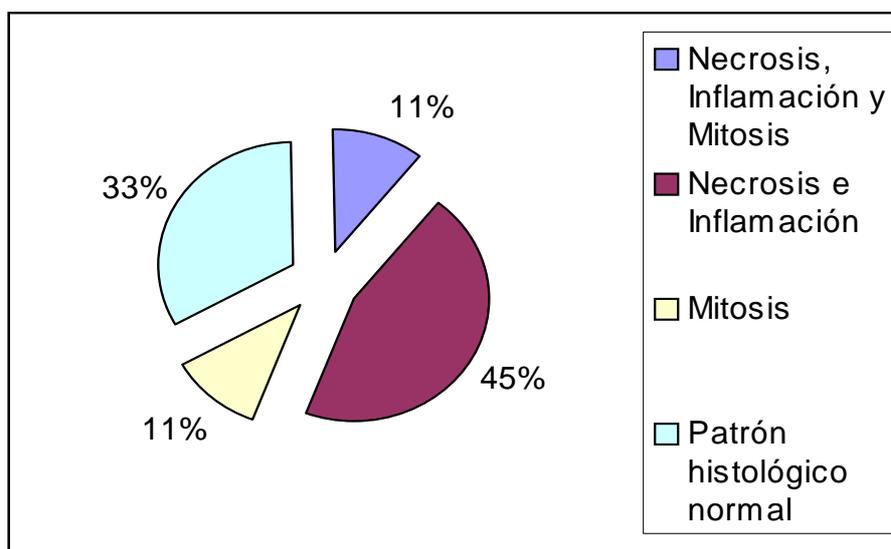
El grupo de tratamiento fue dividido en hembras y machos para mostrar los hallazgos que presentan de una forma más específica, como se puede observar en el cuadro 1.

En el total absoluto se puede notar que 6 individuos dosificados presentan algún tipo de hallazgo, osea el 67% del total de la población y 3 ratones tuvieron un patrón histológico normal, lo que representa un 33%.

En los individuos que presentan algún hallazgo, las hembras predominan con 4 ratones, comparado con los 2 machos que también presentan hallazgos.

GRÁFICO #8

“HALLAZGOS MICROSCÓPICOS EN HÍGADO DEL GRUPO DE TRATAMIENTO”



Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

El gráfico 8 ilustra con mayor claridad los hallazgos encontrados durante las observaciones microscópicas de hígado del grupo de tratamiento; en éste el 11 % representa a un individuo, ya que la población está compuesta por 9 ratones, 5 hembras y 4 machos. En dicha ilustración se puede especificar que:

- Un 11% representa a un único ratón macho en el cual se presentaron los tres hallazgos microscópicos: necrosis, inflamación y mitosis.
- El 45% de la población está compuesto por 4 individuos con algún grado de necrosis e inflamación, 3 de ellos son ratones hembras y 1 macho.
- El otro 11% lo compone una hembra en la cual se observó solamente mitosis.
- El 33% restante pertenece a 3 ratones, 1 hembra y 2 machos los que no presentan alteración alguna en la histología normal hepática

4. HALLAZGOS MICROSCOPICOS DE HEMBRAS CONTROL

TABLA #29

HEMBRA #1

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en las hembras del grupo control	Pulmones	Hay presencia de hemorragia
	Riñones	La presencia de vacuolización observada en la superficie del riñón es casi nula.
	Hígado	Hay presencia de células inflamatorias.

TABLA #30

HEMBRA #2

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en las hembras del grupo control	Pulmones	No se observa ninguna anormalidad.
	Riñones	Hay poca presencia de células vacuoladas en la superficie del riñón
	Hígado	Se observa un patrón histológico normal.

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

TABLA #31

HEMBRA #3

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en las hembras del grupo control	Pulmones	Hay presencia de focos hemorrágicos
	Riñones	La presencia de células vacuoladas en la superficie del riñón es casi nula.
	Hígado	Hay presencia de mitosis (posible daño hepático). Se puede observar también células inflamatorias.

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

TABLA #32

HEMBRA #4

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en las hembras del grupo control	Pulmones	Se observa un patrón histológico normal
	Riñones	Hay presencia de una cantidad moderada de células vacuoladas en la superficie del riñón
	Hígado	Se identifican focos inflamatorios muy pequeños y ocasionales.

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

TABLA #33

HEMBRA #5

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en las hembras del grupo control	Pulmones	No se observa ninguna anormalidad.
	Riñones	Hay presencia de una vacuolización extensa en los túbulos contorneados proximales, cerca de la superficie del riñón.
	Hígado	Se observa un patrón histológico normal.

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

5. HALLAZGOS MICROSCÓPICOS MACHOS CONTROL

TABLA #34

MACHO #1

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en los machos del grupo control	Pulmones	No se observa ninguna anormalidad.
	Riñones	Hay presencia de una vacuolización extensa cerca de la superficie del riñón.
	Hígado	Se identifican pequeños focos inflamatorios con células necróticas

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

TABLA #35

MACHO #2

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en los machos del grupo control	Pulmones	Se observa la presencia de un nódulo extraño, el cual está bien diferenciado
	Riñones	La presencia de vacuolas es casi nula. Se observan importantes focos inflamatorios en ambos riñones.
	Hígado	Se presencia apoptosis y mitosis.

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.20

TABLA #36

MACHO #3

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en los machos del grupo control	Pulmones	Patrón histológico normal. Excepto por la presencia de una pequeña zona hemorrágica.
	Riñones	Hay presencia de una vacuolización extensa cerca de la superficie del riñón.
	Hígado	No se observa ninguna anomalía

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

TABLA #37

MACHO #4

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en los machos del grupo control	Pulmones	Se observa la presencia de focos hemorrágicos.
	Riñones	Se identifican bastantes vacuolas en la superficie del riñón.
	Hígado	Hay presencia de un patrón histológico normal

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

TABLA #38

MACHO #5

Objetivo	Variable	Resultado
Describir cualquier aspecto anormal presente durante las observaciones microscópicas en los machos del grupo control	Pulmones	No se observan alteraciones
	Riñones	Se identifican bastantes vacuolas en la superficie del riñón.
	Hígado	Hay presencia de un patrón histológico normal

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

6. RESUMEN DE LOS HALLAZGOS MICROSCÓPICOS MÁS IMPORTANTES DEL GRUPO CONTROL

CUADRO #18

“ INCIDENCIA DE HEMORRAGIA EN PULMÓN DEL GRUPO DE CONTROL ”

	Hembra	Macho	TOTAL Absoluto
Hemorragia	2	2	4
Sin anormalidades	3	2	5
Otros hallazgos	–	1	1
TOTALES	5	5	10

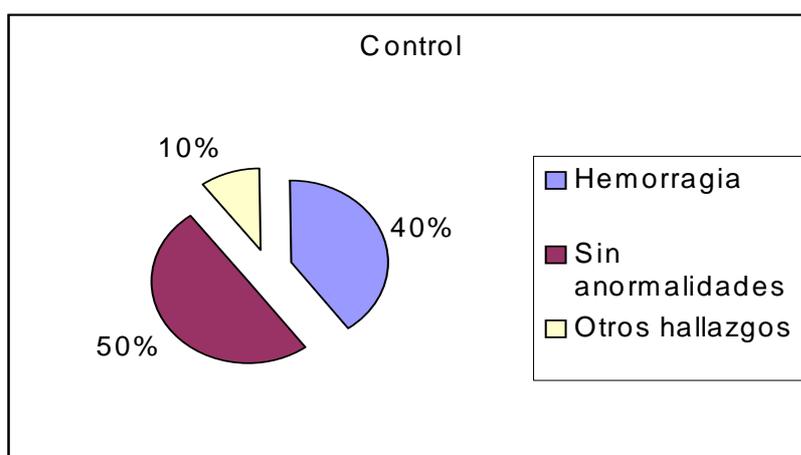
Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

Del cuadro 17 se puede deducir que la mayoría de las hembras no presentan anormalidades, mientras que los machos solamente 2 se encuentran en este estado.

Mayor cantidad de machos presentan algún hallazgo, siendo así que 2 ratones tienen hemorragia pulmonar y 1 presenta una lesión bien diferenciada, sin embargo las hembras solamente en 2 se observó hemorragia.

GRÁFICO #9

“ INCIDENCIA DE HEMORRAGIA EN PULMÓN DEL GRUPO DE CONTROL”



Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

El gráfico 9 ilustra con mayor claridad el cuadro anterior, en donde la mitad de la población no presenta anormalidades, y un 40% presenta hemorragia.

Se observa también un 10% que lo constituye un único individuo que presenta otro hallazgo diferente a la hemorragia.

CUADRO #19**“PORCENTAJE DE CÉLULAS VACUOLADAS EN RIÑÓN DEL GRUPO DE CONTROL”**

	Hembra	Macho	TOTAL Absoluto
Poco grado de vacuolización	3	1	4
Moderado grado de vacuolización	1	—	1
Alto grado de vacuolización	1	4	5
TOTALES	5	5	10

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

En el cuadro 18 se exponen los ratones del grupo de control según el tipo de vacuolización que presenten.

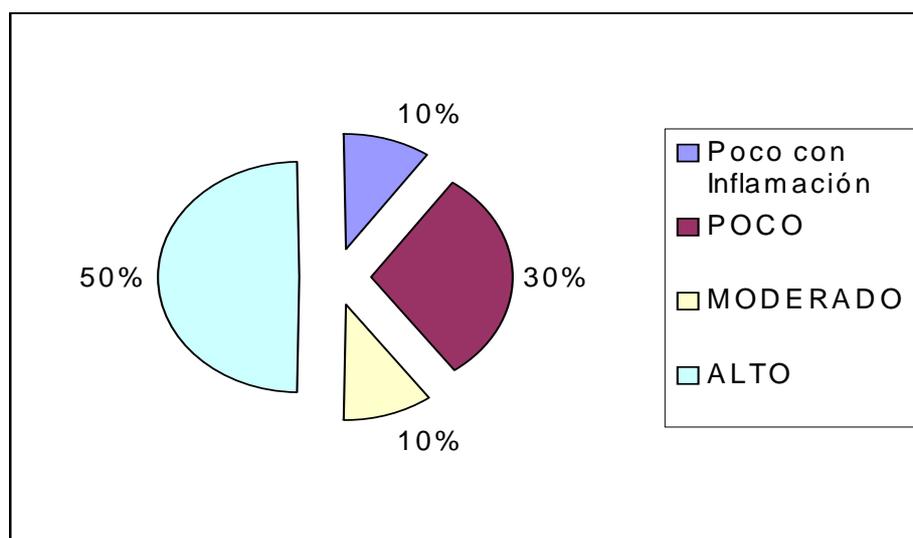
Se observa que la mitad de la población tienen células vacuoladas 4 que presentan poco grado y una que presenta moderada cantidad de vacuolas, los otros 5 ratones presentan un alto grado de vacuolas, 4 machos y una hembra.

Según el grupo de hembras y machos, las primeras tienen los 3 grados de vacuolización y los machos presentan uno poco grado y 4 alto grado de vacuolas.

Así podemos resumir que la incidencia de vacuolización es en el 100% del grupo.

GRÁFICO #10

“PORCENTAJE DE CÉLULAS VACUOLADAS EN RIÑÓN DEL GRUPO DE CONTROL”



Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

La presencia de vacuolización renal en el grupo de control, se explica en el gráfico 4, donde se puede observar que la incidencia en los 10 individuos que componen dicho grupo se resume así:

- El grupo con poco grado de vacuolas corresponde a un 30%, representado por 4 ratones, 3 de ellos hembras y 1 macho.
- Con moderada cantidad de vacuolas está representado un 10% amarillo , que corresponde a 1 ratón hembra.

- Con un alto grado de vacuolas está el 50% de la población del grupo control representado por 5 ratones, una hembra y 4 machos
- En el gráfico hay un 10% de color morado representado por un único macho el cual además de presentar poco grado de vacuolización, también tiene células inflamatorias en ambos riñones.

CUADRO #20

“HALLAZGOS MICROSCÓPICOS EN HÍGADO DEL GRUPO CONTROL”

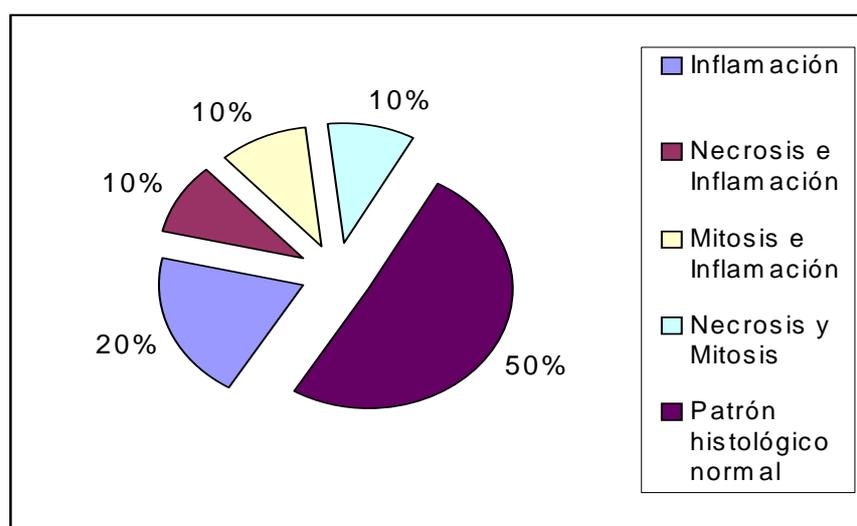
	Hembra	Macho	TOTAL Absoluto
Inflamación	2	–	2
Inflamación, Necrosis	–	1	1
Mitosis, Inflamación	1	–	1
Necrosis, Mitosis	–	1	1
Patrón histológico normal	2	3	5
TOTALES	5	5	10

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

La población se dividió según la cantidad de individuos que presentaran el mismo hallazgo microscópico.

Se puede observar que la mitad de los ratones del grupo de control presentan hallazgos hepáticos y la otra mitad un patrón histológico normal.

Entre los ratones que presentan hallazgos, predominan las 3 hembras comparado con los 2 machos que también presentan algún tipo de hallazgo.

GRÁFICO #11**“HALLAZGOS MICROSCÓPICOS EN HÍGADO DEL GRUPO CONTROL”**

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

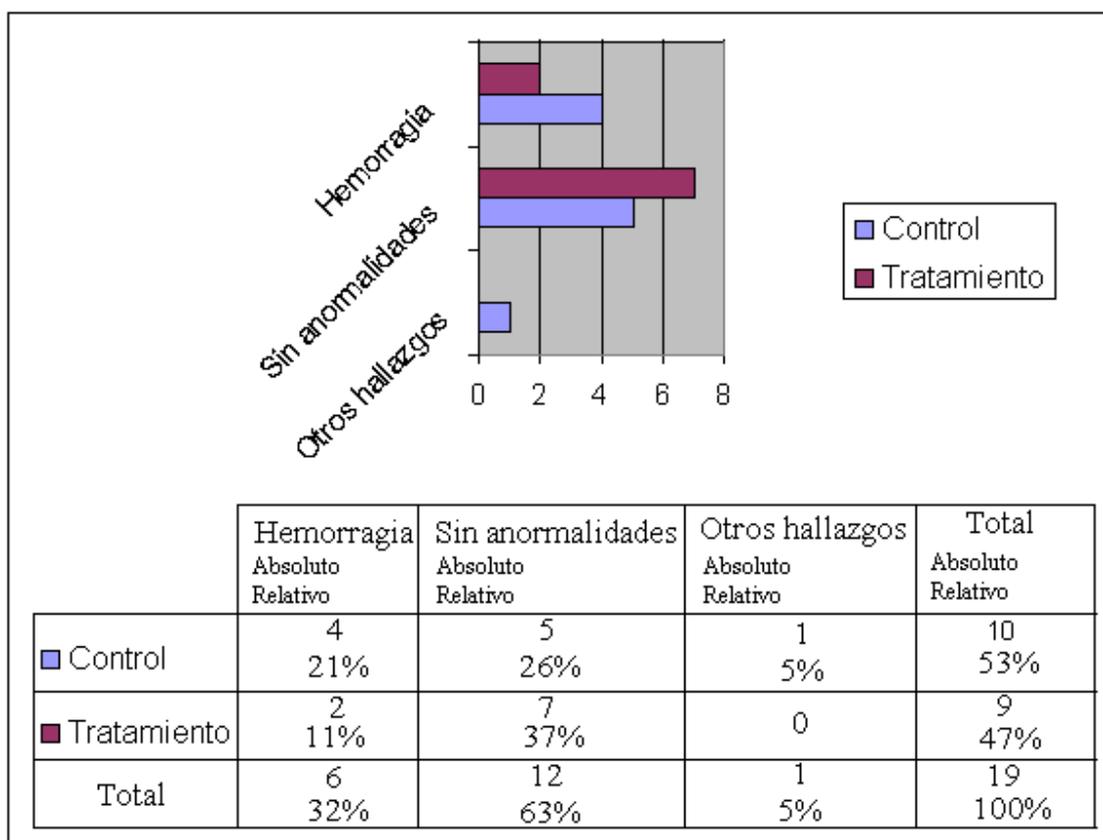
En el gráfico 11 se resumen los hallazgos microscópicos hepáticos encontrados en el grupo de control, compuesto por 10 ratones, por lo cual cada uno representa un 10% de la población. En esta ilustración se puede apreciar que:

- En el gráfico un 10% de color celeste corresponde a un ratón macho en el que se presenta apoptosis y mitosis.
- La mitad de la población del grupo en estudio, no presentó alteraciones en la histología normal, de ellos 2 son hembras y 3 machos.
- El 20% pertenece a los individuos en que se observó solamente inflamación, está compuesto por 2 ratones hembras.

- La necrosis con inflamación se hizo presente en un 10% del total, el cual se encuentra de color vino en el gráfico y está constituido por 1 ratón macho.
- Otro 10% de color amarillo representa una hembra que presentó inflamación y mitosis

GRÁFICO #12

“COMPARACIÓN EN LA INCIDENCIA DE HEMORRAGIA PULMONAR DEL GRUPO DE CONTROL Y TRATAMIENTO”



El gráfico 12 compara la incidencia de hemorragia o algún otro tipo de hallazgo de los 2 grupos de estudio.

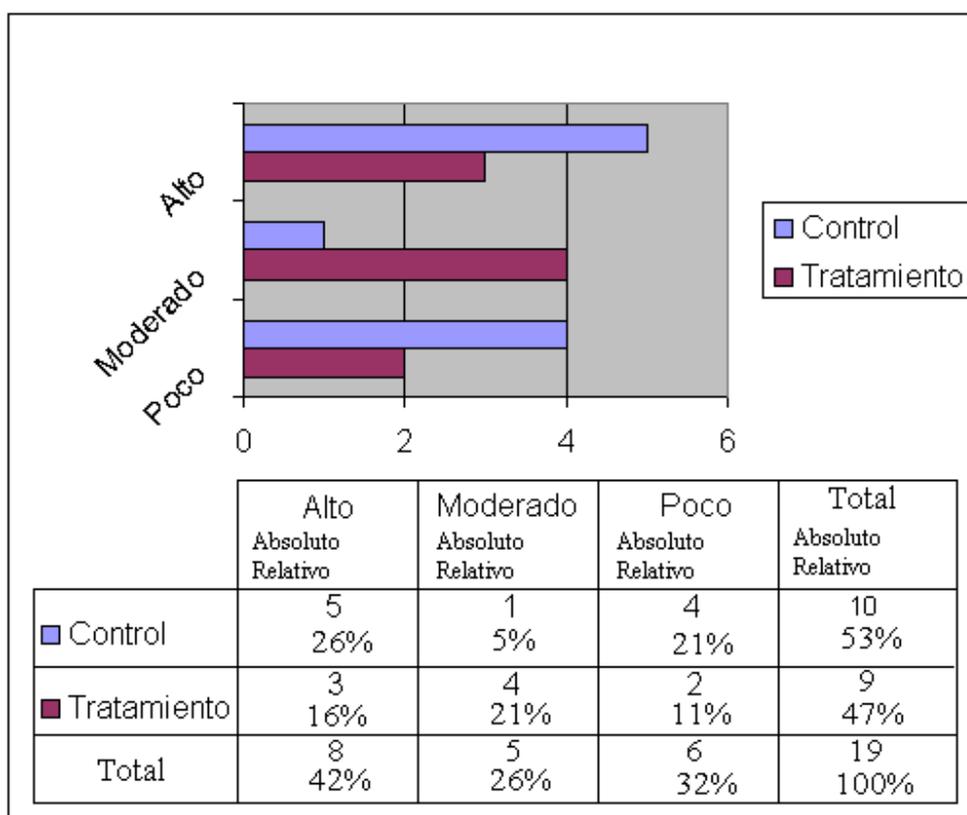
A grandes rasgos se observa que la mayor parte de los individuos del grupo de tratamiento un 37% conformado por 7 individuos se localizan en la categoría sin anomalías, por otro lado, el grupo de control presenta solamente 5 individuos un 26% de la totalidad de la población con las mismas características.

También se muestra que en el grupo de control hay mayor cantidad de ratones con hemorragia un 21% comparado con los tratados donde solamente un 11% presenta focos hemorrágicos pulmonares.

Además de la hemorragia hay un 5% representado por un individuo del grupo de control con una lesión bien diferenciada. Mientras que en el grupo dosificado ningún ratón obtuvo otro tipo de hallazgo aparte a la hemorragia.

GRAFICO #13

“VACUOLIZACIÓN EN RIÑONES DE LOS GRUPOS DE TRATAMIENTO Y CONTROL”



Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

El gráfico 13 muestra que la vacuolización renal del grupo de control y del grupo tratamiento está muy comparada ya que se presenta siempre en algún grado en ambos grupos, mostrando una incidencia de vacuolas en el 100% de la población.

Se puede deducir que éste hallazgo es algo común, ya que como se observa en el gráfico el grupo de control presenta una mayoría de individuos (5 ratones) con alto grado de células vacuoladas, mientras que el de tratamiento solamente 3 individuos.

En cuanto a los otros dos grados de vacuolización, hay una presencia moderada de vacuolas en ambos grupos, el grupo de tratamiento con 4 individuos y el de control solamente 1, con poca presencia de vacuolas en el grupo de control hay 4 individuos y en el de tratamiento 2 ratones.

Entonces se puede notar que el mayor porcentaje, un 42% se presenta en los individuos con un grado alto de vacuolización.

CUADRO # 21

“COMPARACIÓN DE LOS HALLAZGOS MICROSCÓPICOS EN HÍGADO DE HEMBRAS Y MACHOS DE LOS GRUPOS DE CONTROL Y TRATAMIENTO”

	Tratamiento		TOTAL	Control		TOTAL
	Hembra	Macho		Hembra	Macho	
Inflamación	3	2	5	3	1	4
Necrosis	3	2	5	–	2	2
Mitosis	1	1	2	1	1	2
Patrón histológico normal	1	2	3	2	3	5

Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

En el cuadro anterior se dividen las hembras y los machos en la incidencia de vacuolización según su grado.

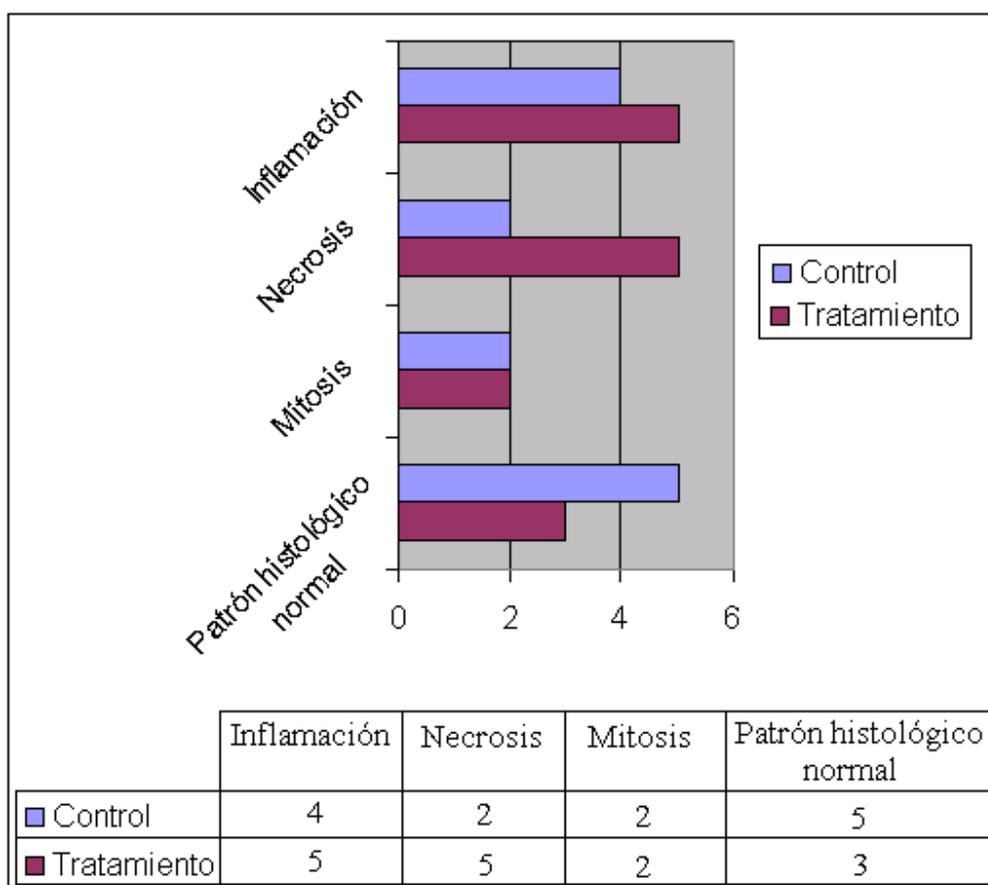
Debemos recordar que el grupo de tratamiento lo componen 9 individuos, 2 machos y 1 hembra que presentan una histología normal, lo que quedarían 6 ratones restantes, 4 hembras y 2 machos que presentan más de un tipo de hallazgo por lo que se repiten en cada categoría que cada uno presente.

En los controles, la mitad de la población no presenta anomalías en la histología, y la otra mitad compuesta por 3 hembras y 2 machos se encuentran en la (s) casilla (s) en que presentan algún hallazgo.

Se refleja entonces que las hembras dosificadas y del grupo de control presentan más hallazgos que los machos, comparando 7 hembras contra 4 machos. Y los machos de ambos grupos se presentan más con un patrón normal, comparando 5 machos contra 3 hembras; sumando todos los ratones para darnos la totalidad de la población de 19 individuos.

GRAFICO #14

“COMPARACIÓN DE LOS HALLAZGOS MICROSCÓPICOS EN HÍGADO DE LOS GRUPOS CONTROL Y TRATAMIENTO”



Fuente: Observaciones realizadas en el Departamento de Patología, Hospital Clínica Católica.2001

La población de ratones estudiada es de 19, 10 son del grupo de control y 9 del grupo de tratamiento, detalle que hay que tener en cuenta al observar sus diferencias.

En el gráfico 14 se ilustra con mayor claridad la incidencia de los 3 hallazgos microscópicos encontrados en hígado de 11 ratones, los cuales se exponen comparativamente de manera individual, siendo así que el individuo es contado en cada hallazgo que presente de manera única, a excepción de los 8 ratones que presentan un patrón histológico normal y solamente se mencionan en esa categoría.

Se observa que los tres hallazgos se hacen presente tanto en el grupo de tratamiento como en el de control. Mostrando una incidencia muy similar de ambos grupos en cuanto a lo que se refiere a inflamación y mitosis.

Se observa también que sí se muestra una diferencia en la aparición de células necrosadas en ambos grupos, presentando el grupo de tratamiento una mayor cantidad de necrosis con 5 individuos comparado con el grupo de control que solamente 2 individuo presentan necrosis, para un total de 7 individuos con necrosis.

En general en el grupo de control hubo 5 individuos que presentaron más de un tipo de hallazgo, lo que representa un 26.3 % del total de ratones estudiados, mientras que en el de tratamiento 6 ratones fueron los que presentaron hallazgos hepáticos, un 31.5% (recordemos que estos 11 individuos de ambos grupos se repiten en cada hallazgo que presenten).

En cuanto a los individuos que no presentan variaciones en la histología normal, el grupo de control presenta una mayoría de 5 individuos, osea el 26.3 % de una población de 19 individuos, mientras que en el de tratamiento fueron 3 ratones el 15.7 % los que no presentaron hallazgos anormales.

CAPITULO V

RESULTADOS

A. Conclusiones

1. INTERPRETAR LOS RESULTADOS DE LOS HALLAZGOS CLINICOS REALIZADOS EN EL LEBI PARA IDENTIFICAR SIGNOS DE TOXICIDAD DURANTE EL PERIODO DE ENSAYO CON RATONES.

Una vez finalizados los 24 días del estudio, el Laboratorio de Estudios Biológicos de la UCR (LEBI), recopila los datos para formular los resultados del comportamiento de los individuos durante el período de ensayo.

Recibidos los resultados, se procedió a la interpretación de los mismos, para obtener las siguientes conclusiones:

En animales de laboratorio, usualmente la preocupación es por la pérdida de peso anormal o inesperada, sin embargo esa situación no se presentó, sino, el peso de cada ratón tanto control como tratamiento fue aumentando gradualmente.

Además ningún animal presentó signos anormales en los parámetros evaluados durante los 24 días del período de observación.

Cabe notar que al finalizar el período de ensayo, se obtuvo una sobrevivencia del 100%.

Se concluye entonces, que conforme a los resultados clínicos el ensayo no evidencia signos de toxicidad durante el período de estudio, el cual inició el 20 de noviembre del 2000 y finalizó el 13 de diciembre del mismo año.

2. DESCRIBIR LOS CORTES MACROSCOPICOS DE PULMON, RIÑÓN E HIGADO DE RATONES DOSIFICADOS CON MAXHEAL® COMPARADOS CON LOS DE CONTROL PARA IDENTIFICAR POSIBLES DIFERENCIAS.

A través de las observaciones después de las autopsias realizadas en los Laboratorios Power Labs, se concluye lo siguiente:

a. Pulmón

En cuanto a los ratones del grupo control, los pulmones se encuentran dentro de los parámetros normales, con excepción de ligeras zonas de hemorragia en los ratones hembra #1, hembra #2, macho #2, macho #3. Se presume que dichas zonas son producto de la forma de sacrificio a la que fueron sometidos los animales.

En los pulmones de los animales con tratamiento, se observa la mayoría de una coloración normal y sin anomalías. No hay presencia de focos hemorrágicos, con excepción de la hembra #1 y el macho #4. En el macho #3 lo que se observa es la presencia de un leve punteado rojo.

En ambos grupos de estudio se observan diferentes grados de diafanización, la de mayor grado es aquella que abarca prácticamente la totalidad de los lóbulos, y fue precisamente esta la que se observó en la mayoría de los casos.

b. Riñón

Tanto en el grupo de control como en el de tratamiento, se puede diferenciar claramente la corteza de la médula. Además, presentan una coloración común amarillo paja.

Según los hallazgos macroscópicos no se observa anomalía alguna.

c. Hígado:

En ambos grupos en estudio el hígado se observa con características dentro de los patrones normales esperados, tanto de coloración como de consistencia. A excepción de un caso, específicamente el ratón macho #3 con tratamiento, en el que se observa una zona de traumatismo hemorrágico.

3. MOSTRAR POSIBLES CAMBIOS EN LA HISTOLOGIA PULMONAR, RENAL Y HEPATICA DE LOS RATONES CON MAXHEAL® PARA IDENTIFICAR ALTERACIONES AL COMPARARLOS CON LOS RATONES DE CONTROL.

Según los resultados microscópicos no se encontraron en hígado, pulmón y riñón efectos atribuibles a la droga. Los hallazgos no parecen estar relacionados al MaxHeal®. (Piza,J.,2001).

El análisis histológico fue ciego, ya que el patólogo no sabía cuáles láminas eran del grupo de control o con tratamiento, hasta que todos los resultados fueron recopilados.

a. Pulmón

En los pulmones del grupo de tratamiento, prevalecen las características normales, sin embargo en la hembra #1 y el macho #2 hay presencia de mucha hemorragia, producto quizá de la forma de sacrificio.

En los hallazgos microscópicos en el grupo de control, se logra observar en 4 casos zonas hemorrágicas, además de un macho #2 el cual presenta un nódulo extraño, no relacionado a la aplicación del producto pues es precisamente un ratón del grupo que no fue dosificado (Piza, J.,2001). En los demás casos no se observan alteraciones.

b. Riñón

En el grupo control, los tejidos se encuentran libres de alteraciones, a excepción del macho #2, en el cual se presentan importantes focos inflamatorios en los dos riñones.

La presencia de vacuolas en los túbulos renales fue evaluada en tres grados, según la cantidad de túbulos con dicho fenómeno, principalmente en la región subcortical. La mayor cantidad de vacuolas predominó en el grupo control. Igualmente las de menor vacuolación fueron predominantemente en el grupo control.

La vacuolación renal se puede dar por diversas causas, principalmente puede corresponder a un artificio de técnica histológica o a la expresión anatómica de un estado funcional de los animales. En el hombre, se ha descrito más que todo después de la administración intravenosa de sucrosa hipertónica o en la hipopotasemia.

Ambas condiciones son improbables bajo las condiciones experimentales controladas del presente trabajo. Además el análisis de los resultados no demuestran ninguna relación con la administración o no de la droga.

Sin embargo, cabe resaltar que una vacuola es un espacio al parecer vacío dentro del citoplasma celular, puede estar formado de agua o grasa.

1. Hígado

En los hígados de grupo con tratamiento, se presenta en el ratón macho #4 y en la hembra #4 células mitosis y en la hembra #2 gran cantidad de ellas, lo cual puede ser un proceso normal o en recuperación después de un trauma. No se puede determinar si en el caso de los roedores es algo normal o anormal.

En varios casos hay presencia de necrosis de hepatocitos (apoptosis), y en ocasiones se observa acompañada de células inflamatorias.

Se logra identificar en el caso de la hembra #4 del mismo grupo de tratamiento, acúmulos de macrófagos (células de Kuffer), lo que podría significar una probable respuesta a una lesión, además de pequeños grupos de células inflamatorias.

En el grupo de control, se observan en la mayoría varios focos inflamatorios aislados, lo cual suele estar relacionado como respuesta al proceso de necrosis. Se identifica en un caso, macho #1, necrosis con inflamación.

El macho #2 y la hembra #3 de control, fueron los únicos en presentar mitosis, lo que indica posible daño hepático.

La presencia de necrosis en los grupos de estudio no muestra una diferencia que se pueda tomar como determinante en cuanto a posible daño hepático del producto. Se muestra un aumento en el grupo tratamiento, sin embargo se observa necrosis también en el grupo control aunque en menor porcentaje, pero su presencia prácticamente obliga a descartar relación directa del MaxHeal® con la necrosis presente en el grupo tratamiento.

B. Limitaciones

Durante la realización de este proyecto de graduación, se presentó un inconveniente durante la manipulación de los ratones por parte del LEBI. Pese a ser reconocido como un laboratorio altamente calificado, no está exento a errores, pues por motivos desconocidos, uno de los ratones no se nos fue entregado, de manera que los análisis macroscópicos y microscópicos se realizaron con una población de 19 ratones y no con 20 como estaba establecido.

C. Recomendaciones

Mediante los resultados obtenidos en este proyecto de graduación, se recomiendan y justifican posteriores investigaciones:

- Investigaciones en donde se aumente el tamaño de la población de estudio, de manera que se pueda brindar una mayor cantidad tanto de observaciones como de posibles respuestas, que ofrezcan amplias descripciones que corroboren resultados de estudios iniciales.
- Algunos mamíferos han sido los elegidos para varios tipos de estudios de laboratorio, entre los que se encuentran los gatos, perros, cerdos, ratones, ratas, conejos y más recientemente los hamsters. Se recomienda entonces promover ensayos con diferentes animales de laboratorio para así obtener un conocimiento más amplio en cuanto a las propiedades y reacciones de MaxHeal® ya que cada uno de ellos al presentar diferentes características brindan nueva información preclínica de los fármacos.
- Realizar estudios de tiempo más prolongado, donde se pueda evaluar la función de MaxHeal® durante una mayor cantidad de administraciones, para poder obtener un margen más amplio de reacciones en los animales experimentales.
- Otros tipos de análisis que ofrezcan nueva y distinta información de MaxHeal® para así complementar estudios ya realizados y además brindar mayor respaldo a posteriores estudios.
- Se recomienda durante futuros ensayos efectuar exámenes bioquímicos al animal de experimentación, de manera que se complemente la información que se obtenga del estudio.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Arroyo, Walter. Entrevista personal. Técnico de histología. Dic.2000
- Carda Pedro y Gaspar Gómez (1990). Patología General Veterinaria. España. Editorial Acribia

- Canadian Council on Animal Care (1998). “La selección del punto final apropiado en experimentos en que se utilizan animales para investigación científica, enseñanza y pruebas de laboratorio”. México. Editorial MVZ,MB.Ciro Lomelí, LAMS.
- Canadian Council on Animal Care (2000). “La selección del punto final apropiado en experimentos en que se utilizan animales para investigación científica, enseñanza y pruebas de laboratorio”. México. Editorial MVZ,MB.Ciro Lomelí, LAMS.
- Cook Margaret J. (1983). “Anatomy”. The Mouse in Biomedical Research. USA.
- García, Mildred. Entrevista personal. Dic.2000.
- Irina Selukova (1999). Atlas a Color de Histología. Costa Rica.
- Leeson, Leeson, Paparo (1990). Texto/Atlas de Histología. México. Editorial Interamericana.
- Martín Z. Jesús (2000). Biología del animal de experimentación. Costa Rica. Módulo II. UCR, Laboratorio de ensayos Biológicos ACCMAL.
- National Institutes of Health. “Mice”. NIH Roedents 1982 Catalogue. USA, pg.9.

- Souza, Alba (1994). Manual de Ensayos Toxicológicos invivo. Brasil. Editorial Unicamp.
- Técnicos de histología (1978). Histotecnología técnicas y prácticas. Costa Rica. Servicio de Anatomía Patológica: CCSS.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Hebel Rudolf (1976). Anatomy of the laboratory rat. USA. Editorial Williams and Williams company.
- Felicia Hill y Deborah Burdick. Manual for veterinary Technicians. USA.
- National Institutes of Health. “Using This Catalogue”. NIH Roedents 1982 Catalogue. USA, pgs.xi-7.
- Real Academia Española (1970). Diccionario De La Lengua Española . España. Editorial Espasa-Calpe.
- Rousseaux, Haschek (1998). Fundamentals of Toxicologic Pathology. USA. Editorial Wanda M. Haschek y Colin G. Rousseaux.
- Ruager Jorge (1969). Técnica de necropsia y recolección de muestras. Argentina.
- The laboratory rat (1979)._ USA. Editores Hery J. Baker, J. Russell Lindsey, Steven H. Weisbroth.

- US Patent and Trademark Office. “ United States Patent: 5,310,419 ”. USA: Mayo 10 de 1994.

Artículos de revista

- Cristina Jimenez. “¿Cómo se obtiene un nuevo medicamento?” Preguntas y Respuestas. Madrid
- Feoli, Enrique. MaxHeal® . Folleto informativo. M.E.D.Química.

Información de Internet (Documentos HTML)

- Animales de laboratorio.
<http://www.popin.org/~unpopterms/files/data/esp00184.html>.
- Eli. Fish Base Glossary. Abril 12 de 2000.
www.fishbase.org/Glossary/Glossary.cfm
- Encyclopedia Britannica online. 1994-2000. www.eb.com
- HSUS. “Animal research issues”. 1998. www.hsus.org
- Lopez B. Myriam. Salud y medicina. 23 Ene.1997. www.el-mundo.es/salud/snumeros/97/S231/S...imentacion.html
- MaxHeal.www.geocities.com/maxheal
- National Library of Medicine. “Toxicology Tutor 1”.
<http://sis.nlm.nih.gov/toxtutor.cfm>

- OSHA. U.S.Department of laboratory. USA : Dic 13 de 2000.
www.osha.gov/readingroom.html
- Ruiz C. AMMVEPE. Nov-Dic. 1996: vol 6, #6.
www.imbiomed.com.mx/Ammvepe/Vev7n6/espanol/Wve66-03.html
- U-Net. “LD50 information”. www.business.u-net.com
- Web de interes. www.secal.es/webint.html

ANEXOS

