



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XHOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA
SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Utilización de la Rata (*Rattus rattus*) como modelo para valorar
clínica e histopatológicamente el efecto de la combinación
quitosán-coumestrol en el hígado y riñón para el control de
fauna feral

T E S I S
(Idónea Comunicación de Resultados)

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

MVZ Elizabeth Chávez Cobazín

COMITÉ TUTORAL

Asesor

M en C. Osvaldo López Díaz

Director de tesis

Dr. Juan José Pérez Rivero Cruz y Celis

CDMX, 11 octubre de 2016

El jurado designado por la Comisión Académica de la Maestría en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis titulada:

"Utilización de la Rata (*Ratus ratus*) como modelo para valorar clínica e histopatológicamente el efecto de la combinación quitosán- coumestrol en el hígado y riñón para el control de fauna feral"

que presentó:

MVZ Elizabeth Chávez Cobazín

el día 11 de octubre de 2016

JURADO DE EXAMEN

*"Todo me sirve, nada se pierde, yo lo transformo.
Sé, nunca falla, el universo está a mi favor, y es tan mágico..."*

Gustavo Cerati

Dedicatorias

A la persona más importante en mi vida, que me ha enseñado todo cuanto soy, por darme un magnífico ejemplo de fuerza, entereza y perseverancia, quien siempre responde aunque haga todo al revés (o no lo haga), por siempre guiarme y apoyarme en mis locuras, gracias **mami!!**
Te amo!!!

A quien siempre me acurruca como pollito entre sus brazos y me enseña que la vida siempre sigue adelante y a prisa, a quien nunca descansa a ti **tía Poly**, te quiero mucho!!!

A mi mejor amiga y confidente, con quien reír y llorar es prácticamente lo mismo, con quien crecer es divertido y aleccionador, me conoces como nadie! Por recordarme todo lo que soy con sólo mirarte **Bef**, te quiero harto tontis.

Finalmente a ti **Ugo**, por qué al desordenar átomos podemos cruzar puentes donde caminar y crecer, eres el mejor ejemplo de que cuando se desea algo se puede lograr, gracias por enseñarme a ser humilde, paciente y constante por tantas noches de desvelo y por tantos días de sueños! Pero sobre todo gracias por siempre alentarme a ser una mejor persona, te amo Changuito!!

Agradecimientos

Dr. **Juan José Pérez Rivero Cruz y Celis** muchas gracias por ser mi guía, por creer y confiar en mí, gracias por qué además de ser un gran tutor me ha apoyado cuando lo he necesitado, por compartirme parte de sus conocimientos y tenerme paciencia, gracias a usted este camino ha sido más sencillo y divertido.

M. en C. **Oswaldo López Díaz** gracias por toda su ayuda, enseñanzas y asesorías.

Dra. **Guadalupe Prado** gracias por ser una excelente guía, por su luz, su tiempo y por estar al pendiente de mi crecimiento profesional.

Dr. **Alejandro Ávalos** gracias por enseñarme que la Ciencia no está peleada con la diversión.

Mariana y Alfred gracias por ser el mejor equipo de trabajo, han sido súper divertidas las horas de laboratorio, cirugía y cubículo.

Mis sirenas! Gracias por navegar en aguas dulces y no tan dulces a mi lado, por nunca dejar de escuchar sus cantos y cambiar tantos paisajes con humo; **Izchi** por tus oídos siempre dispuestos a mí y mis locuras, **Mel** por "siempre estar a mi lado".

Karen gracias por enseñarme que pese a todo se puede salir adelante; **Javito** (en diminutivo) gracias por tantas tardes de pláticas y consejos la practicidad es tu esencia y mi **Vians** que te digo cuando se está destinado a alguien pues solo se está, gracias por escucharme siempre, por ser tu misma y contagiarme siempre de buena vibra a pesar de los caminos tortuosos de la maestría.

A la familia **Domínguez-Hernández** por estar siempre al pendiente y al tiro, los quiero!

Oliver gracias por tu fantástica amistad, eres un gran ejemplo de energía y perseverancia.

Gracias a la **Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco** por permitirme seguir con mi formación académica.

Se agradece el apoyo de **CONACyT** por la beca de estudios otorgada No. 642148

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Resumen | 1 |
| 1. Impacto de los animales ferales | 2 |
| 1.1 ¿Cómo afecta a la salud humana la sobrepoblación de animales ferales? | 3 |
| 1.2 ¿Qué problemas sociales generan? | 5 |
| 1.3 Afectaciones ecológicas por la sobrepoblación de animales ferales. | 6 |
| 2. Medidas de control para animales ferales | 6 |
| 2.1 Métodos de control más utilizados en México y el mundo..... | 6 |
| 2.2 Políticas públicas a nivel Mundial para el control de fauna feral (inversión económica). | 8 |
| 3. Métodos no quirúrgicos de esterilización | 10 |
| 4. Fitoestrógenos | 11 |
| 4.1 Coumestanos | 12 |
| 4.2 Efectos de los fitoestrógenos en diversos órganos..... | 13 |
| 5. Receptores estrogénicos | 14 |
| 6. Quitosán | 16 |
| 7. Fisiología de Hígado y Riñón | 17 |
| 7.1 Hígado | 17 |
| 7.2 Riñón | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 8. Pruebas de laboratorio que indican daños a hígado o riñón..... | 19 |
| 8.1 Valoración del funcionamiento hepático..... | 19 |
| 8.2 Pruebas que indican daño hepático | 20 |
| 8.3 Valoración del funcionamiento renal | 23 |
| 8.4 Pruebas que indican daño renal | 23 |
| | |
| 9. Función de los estrógenos en hígado y riñón..... | 26 |
| 9.1 Función de los estrógenos en el hígado..... | 26 |
| 9.2 Función de los estrógenos en el riñón | 27 |
| 9.3 Intoxicación por estrógenos | 28 |
| 10. Objetivos | 29 |
| 10.1 Objetivo General | 29 |
| 10.2 Objetivos específicos | 29 |
| 11. Hipótesis | 30 |
| 12. Material y Métodos | 30 |
| 12.1 Ubicación | 30 |
| 12.2 Animales | 30 |
| 12.3 Tratamientos | 31 |
| 12.4 Toma de muestras | 31 |
| 12.5 Procesamiento de muestras | 32 |
| 12.6 Tinción de laminillas | 33 |
| 12.7 Histología de hígado y riñón | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 12.8 Bioquímica sanguínea | 34 |
| 12.9 Fluorescencia | 36 |
| 12.10 Diseño experimental | 37 |
| 12.11 Análisis estadístico | 38 |
| 13. Resultados | 38 |
| 13.1 Bioquímica sanguínea | 38 |
| 13.1.1 Fosfatasa Alcalina (FAS) | 38 |
| 13.1.2 Alanino Aminotransferasa (ALT) | 39 |
| 13.1.3 Nitrógeno ureico (BUN) | 40 |
| 13.1.4 Creatinina (CRE) | 42 |
| 13.2 Fluorescencia | 43 |
| 13.3 Evaluación histopatológica de hígado y riñón | 45 |
| 14. Discusión | 59 |
| 15. Conclusiones | 65 |
| 16. Literatura citada | 66 |

Índice de Cuadros

Índice de Figuras

Índice de Gráficas

Abreviaciones

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales métodos de control de poblaciones ferales en México y el mundo. **p8.**

Cuadro 2. Intervalos de referencia en ratas según VetScan®Prep II 2006. **p 36.**

Cuadro 3. Diseño experimental. **p 37.**

Cuadro 4. Resultados de la Fosfatasa alcalina (FAS) por semana. **p 39.**

Cuadro 5. Resultados de la Alanino aminotransferasa (ALT) por semana. **p 40.**

Cuadro 6. Resultados de Nitrógeno ureico (BUN) por semana. **p 41.**

Cuadro 7. Resultados de Creatinina (CRE) por semana. **p 42.**

Cuadro 8.- Resultados estadísticos de la histología de Hígado con congestión leve de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg). **p 49.**

Cuadro 9.- Resultados estadísticos de la histología de Hígado con congestión moderada de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg). **p 49.**

Cuadro 10.- Resultados estadísticos de la histología de Hígado con tumefacción leve de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg). **p 50.**

Cuadro 11.- Resultados estadísticos de la histología de Hígado con tumefacción moderada de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg). **p 50.**

Cuadro 12.- Resultados estadísticos de la histología de Hígado con lipidosis leve de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg). **p 51.**

Cuadro 13.- Resultados estadísticos de la histología de riñón con congestión leve de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg). **p 55.**

Cuadro 14.- Resultados estadísticos de la histología de riñón con congestión moderada de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg). **p 55.**

Cuadro 15.- Resultados estadísticos de la histología de riñón con tubulonefrosis leve de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg). **p 56.**

Cuadro 16.- Resultados estadísticos de la histología de riñón con tubulonefrosis moderada de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg). **p 56.**

Cuadro 17.- Resultados estadísticos de la histología de riñón con tubulonefrosis severa de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg). **p 57.**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura modular de los receptores estrogénicos (RE) α y β . **p 15.**

Figura 2. Intensidad de fluorescencia. **p 43.**

Figura 3. Microfotografías con tinción de HE a 100x y 400x de aumento en hígado. **p 58.**

Figura 4. Microfotografías con tinción de HE a 100x y 400x de aumento en riñón. **p 59.**

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Intensidad de fluorescencia en riñón. **p 44.**

Gráfica 2. Intensidad de fluorescencia en hígado. **p 45.**

Gráfica 3. Congestión en hígado con tratamiento de 1600 μg . **p 47.**

Gráfica 4. Tumefacción en hígado con tratamiento de 800 μg . **p 48.**

Gráfica 5. Tumefacción en hígado con tratamiento de 1600 μg . **p 48.**

Gráfica 6. Congestión en riñón con tratamiento de 800 μg . **p 53.**

Gráfica 7. Congestión en riñón con tratamiento de 800 μg . **p 53.**

Gráfica 8. Tubulonefrosis en riñón con tratamiento de 800 μg . **p 54.**

Gráfica 9. Tubulonefrosis en riñón con tratamiento de 1600 μg . **p 54.**

Abreviaciones

| | |
|-----|--------------------------|
| FAS | Fosfatasa Alcalina |
| ALT | Alanino aminotransferasa |
| BUN | Nitrógeno ureico |
| COU | Coumestrol |
| CRE | Creatinina |
| RE | Receptores estrogénicos |

Resumen

A lo largo del tiempo el ser humano ha permitido que los perros y gatos se reproduzcan de manera descontrolada, propiciando así que estos se conviertan en un serio problema dentro de las ciudades, varios son los motivos por los cuales la gente decide abandonar a estos animales que previamente fueron animales de compañía, de este modo la tendencia es que estas poblaciones en condición de calle vayan en aumento en los países en vías de desarrollo, lo que conlleva graves peligros para estas especies y un riesgo considerable para el hombre y su sociedad. El objetivo de este estudio fue evaluar mediante lecturas espectrofotométricas si existen alteraciones clínicas e histopatológicas en hígado y riñón de ratas tratadas con la combinación de quitosán-coumestrol. Se utilizaron 45 ratas macho Wistar, estas se dividieron aleatoriamente en tres grupos, 15 animales control, 15 tratados con una dosis única de quitosán-coumestrol de 800 µg y 15 tratadas con una dosis única de quitosán-coumestrol de 1600 µg por vía subcutánea, se dejó ejercer su efecto durante 9 semanas, para valorar su efecto en dichos órganos. Resultados: Se realizaron pruebas para fosfatasa alcalina (FAS), alanino aminotransferasa (ALT), creatinina (CRE) y nitrógeno ureico (BUN) no encontrando cambios entre los animales del grupo control y los tratados. Por su parte la evaluación histopatológica de riñón mostró congestión y tubulonefrosis ambas ligeras sin representar diferencia entre los animales control y los tratados. En lo referente a la valoración histopatológica de hígado se encontró congestión, tumefacción y lipidosis leve sin presentar diferencia entre los animales control y los tratados. Conclusiones: Se concluye que la utilización de la combinación quitosán-coumestrol no parece generar alteraciones funcionales o estructurales a corto plazo a nivel de hígado y riñón.

Palabras clave: Hígado, riñón, coumestrol, quitosán, fluorescencia

1. Impacto de los animales ferales

A lo largo del tiempo el ser humano ha permitido que los perros y gatos se reproduzcan de manera descontrolada, propiciando así que estos se conviertan en un serio problema dentro de las ciudades y comunidades; creándose problemas de exceso de animales, contaminación, amenazas a la salud, crueldad y abandono, entre otros. (Morales *et al.*, 2009).

Varios son los motivos por los cuales la gente decide abandonar a un perro que previamente fue animal de compañía, entre los que destacan: cambios de domicilio, camadas inesperadas, factores económicos, falta de interés, comportamiento del animal, alergias de los propietarios, hijos inesperados entre los propietarios, ingresos a hospitales o defunciones, vacaciones (Cendón y Holm, 2012).

Los animales de compañía tanto el perro como el gato para algunos países de la Unión Europea como España o Alemania son vinculados a la tenencia responsable; sin embargo los llamados perros callejeros y su abandono hoy en día se han convertido en un debate público, pues en la actualidad el vínculo mascota-dueño se ha roto, ya que los humanos han permitido la reproducción excesiva de estos, para luego abandonarlos. De este modo la tendencia es que la población canina en condición de calle vaya en aumento, en los países en vías de desarrollo, lo que conlleva graves peligros para estas especies y un riesgo considerable para el hombre y su sociedad. Otra tendencia observada es que la proporción de machos es mayor que la de hembras, esto debido a la presión por selección, realizadas sobre los machos pues se prefieren ya que a estos no se les vincula con el período de celo, estimándose así que dos tercios de la población total corresponden a machos (Hughes *et al.*, 2013; Soto, 2013).

A los perros que se mantienen en las calles se les puede clasificar como:

a) perros que tienen en apariencia dueño y este les permite andar libres por las calles.

b) perros sin un dueño específico es decir no tiene casa.

c) perros ferales que habitan en las zonas suburbanas. (Pérez-Rivero, 2008).

En Italia para 2001, existía una población de 6,9 millones de perros con dueños, de los cuales se estimó que 150,000 de estos fueron abandonados lo que representa una tasa del 2.2 por cada 100 perros con dueño; dichos animales abandonados se dieron por falta de interés, dificultades para mantenerlos (Høgåsen *et al.*, 2013).

Cuatro millones de gatos entran en refugios de animales en los Estados Unidos cada año, y cerca de 70 % de estos son eutanasiados. El impacto económico de estas poblaciones ferales estimado para 2011 fue de 620 millones de dólares al año (Greenberg *et al.*, 2013; Hughes *et al.*, 2013).

México ocupa el primer lugar en tenencia de perros y gatos en América Latina, de ahí la importancia de desarrollar una cultura que limite su reproducción y promueva el cuidado de estos animales; la Organización de las Naciones Unidas (ONU) estima que la tasa de crecimiento de la población canina en México es de 12% al año, mientras que en el ser humano el crecimiento es del 5%. (LXI Legislatura de México, 2014).

Para el año 2003 la población canina en la Ciudad de México se calculaba en poco más de un 1,393,000 perros; es decir un perro por cada 7 habitantes, sin embargo esta distribución no es homogénea pues las mayores concentraciones de perros ferales se encuentran en las delegaciones Gustavo A. Madero, Xochimilco, Iztapalapa y Milpa Alta (Secretaría de Salud, 2013).

Según el Censo Nacional de Población en 2010, había 112 millones 336 mil 538 habitantes en México (INEGI, 2013) y la Secretaría de Salud del Distrito Federal estima que en el país hay 12 millones de perros, lo que nos da una razón de 9 habitantes por perro de los cuales se pierden al año para entrar en situación de calle 18,000 perros, tomando en cuenta que el Distrito Federal tiene una población de 8,851,080 habitantes, se estima que se pierde un perro al año por cada 492 habitantes, solo en la delegación TIFASan existen 650,567 habitantes, por lo que potencialmente al año se pierden alrededor de 1322 perros.

1.1 ¿Cómo afecta a la salud humana la sobrepoblación de animales ferales?

Las zoonosis son enfermedades que se transmiten en ambos sentidos entre los animales y el hombre y viceversa, por lo que son diferentes al resto de

las enfermedades infecciosas debido a su peligrosidad para el ser humano por lo que, su prevención y control requiere estrategias muy particulares basadas en investigaciones de tipo epidemiológico (Gil y Samartino, 2000; Dabanch, 2003).

Las enfermedades transmitidas a los seres humanos por animales considerados fauna nociva, cada vez son más frecuentes y peligrosas para la salud humana. En los últimos años se ha observado la emergencia y reemergencia de algunas zoonosis, fenómeno estrechamente relacionado a cambios ecológicos, climáticos y socioculturales que han determinado que la población animal comparta su hábitat con el hombre cada vez con mayor frecuencia (Dabanch, 2003). En la actualidad estas enfermedades representan un gran porcentaje de las enfermedades descritas en muchos países y constituyen el origen de pérdidas económicas tanto para la salud animal como para la salud pública (Traversa, 2005).

Existen dos maneras de transmisión de zoonosis, estas son la directa e indirecta; en la primera se habla de una manera circunstancial en la convivencia y se da por mordeduras y contacto con la saliva y secreciones corporales, mientras que en la indirecta se atribuye a ciclos de transmisión determinados por el ambiente (agua, suelo y materia orgánica) provenientes de los animales y sus vectores (Fuentes, 2006).

Los perros son la causa del 99% de las 55,000 muertes humanas por rabia reportados en todo el mundo, sobre todo en Asia y África, de igual manera están asociados con más de 60 zoonosis (Hughes *et al.*, 2013; Massei y Miller, 2013) como equinococosis, toxocariasis, leishmaniasis, toxoplasmosis y bartonelosis, además de los problemas originados por contaminación ambiental con desechos de la orina y las heces (Slater *et al.*, 2008).

Los perros causan entre el 85 y 90% de las mordeduras por mamíferos, seguidos por los gatos con un 5 a 10%, mientras que los roedores participan entre 2 y 3%, representando así un problema de salud pública a nivel mundial; en algunos países desarrollados han llegado a ubicarse como el segundo lugar en cuanto a problemas de salud pública más costosos, al asociarse a complicaciones de índole infeccioso, funcionales e incluso fatales para la persona agredida (Muñoz, 2012).

Pese a la frecuencia de agresiones por perros, la poca notificación de casos de personas mordidas en Estados Unidos y México es elevado, esto

debido a que sólo los lesionados que requieren hospitalización son los que reportan la agresión, siendo estos un número muy reducido, pues la mayoría prefiere atenderse en casa, en estos reportes los niños son las víctimas más frecuentes de las agresiones (Pérez-Rivero, 2008).

En la República Mexicana las zoonosis más frecuentes transmitidas por perros son la rabia, leptospirosis, brucelosis, coccidiosis, tuberculosis, tripanosomiasis, toxocariasis, giardiasis, de las cuales se tienen pocos reportes a excepción de la rabia (Sánchez *et al.*, 2010; SAGARPA, 2007).

1.2 ¿Qué problemas sociales generan?

Las poblaciones caninas que deambulan por las calles causan en la sociedad diversas consecuencias, dentro de las que destacan el gran acúmulo de materia fecal tanto en las calles como en los parques o plazas, dicho acúmulo atrae moscas y roedores; de igual manera se puede correr el riesgo de ser atacado y mordido por alguno de estos perros ferales, y de manera importante la contaminación acústica por los ladridos. Desde el punto de vista humanitario hacia los animales estos se encuentran expuestos a desnutrición, parasitismo, contraer enfermedades, abusos, ser atropellados o pueden ser causa de accidentes automovilísticos (Høgåsen *et al.*, 2013; Hughes *et al.*, 20013; Soto 2013).

Otro grave problema que existe en el control de las poblaciones de estos animales es el de hacinamiento que ocurre cuando son albergados en instituciones especializadas, en donde por lo general presentan falta de higiene y falta de alimentación en las perreras llevando un incremento sostenido en la población canina y contribuyendo así al deterioro ambiental, con la consiguiente disminución de la calidad de vida de las personas (Rivera, 2009).

De esta manera la seguridad personal es el problema más importante en el control de perros y gatos, seguido por el bienestar animal, la salud pública y saneamiento (Høgåsen *et al.*, 2013).

Por lo cual debido a la falta de educación y cultura cívica de los humanos al adquirir un ejemplar canino o felino y abandonarlo en la calle se genera el problema de la sobrepoblación de estos animales en las ciudades (Sánchez *et al.*, 2010).

1.3 Afectaciones ecológicas por la sobrepoblación de animales ferales

Por muchas décadas la gente ha reconocido la importancia de la conservación de la vida silvestre, sin embargo a partir de este siglo ha comenzado a llamar la atención de los conservacionistas, por tanto en la medida en que la población humana se ha extendido también lo han hecho muchas especies en sus hábitats y ecosistemas, de ahí que los impactos negativos de los animales domésticos que se han vuelto ferales afecten negativamente a las poblaciones de fauna nativa a través de la depredación, competencia, alteración, hibridación y transmisión de enfermedades, tal es el caso de la rabia y el moquillo (Hughes *et al.*, 2013).

Al ser los perros depredadores, son considerados como factor de riesgo y se asocian a la reducción poblacional del conejo y del venado bura, pudiendo desplazar competitivamente tanto a coyotes como a lobos, no obstante lo más grave es la afectación de poblaciones de presas como aves, reptiles y algunos mamíferos pequeños y medianos. En poblaciones ferales, los perros tienen impacto importante sobre la fauna nativa como depredador sobre todo en las islas. De la misma manera es capaz de hibridar con el lobo y hasta con el coyote, lo cual significa una amenaza a la integridad genética y la continuidad de las poblaciones; otra forma de afectación ecológica es que en ocasiones ayudan a las ratas a remover la basura y sacarla de sus contenedores en ambientes urbanos (Álvarez-Romero y Medellín, 2005).

2. Medidas de control para animales ferales

2.1 Métodos de control más utilizados en México y el mundo

Los perros y gatos son una especie con un alto índice de prolificidad y con características reproductivas muy particulares; una estimación es que en 6 años una perra y sus crías tienen el potencial para producir 67 mil nuevos perros, de ahí que se busquen maneras eficaces de control de poblaciones caninas pues es un grave problema a nivel mundial y en la Ciudad de México (Pérez-Rivero, 2008).

El control de animales ferales está dirigido a reducir su número y de esta manera evitar agresiones a humanos minimizando así la posibilidad de

algún contagio de enfermedades zoonóticas, la afectación de la economía para tratamientos preventivos. Aunque el 63% de los cachorros nacidos en un sitio mueren por accidentes o enfermedades infecciosas, el problema de la sobrepoblación sigue siendo grave (Pal, 2005).

Dentro de las medidas preventivas para contener la población de los gatos y perros son la adopción, la esterilización, la profilaxis química para el control del embarazo, y la educación del propietario. Otras formas para la disminución de la población de animales callejeros es la eutanasia (Selby *et al.*, 1979). En el cuadro 1 se muestran los principales métodos de control de poblaciones en México y el mundo.

La manera de detener la población canina se ha centrado principalmente en la esterilización quirúrgica, la cual puede ser realizada tanto en cachorros que aún no han entrado a la pubertad como en perros adultos, requiere técnicas quirúrgicas y asépticas apropiadas para poder garantizar buenos resultados y bienestar animal. Es más aceptada por la sociedad en general que la eutanasia, no obstante es de costo elevado debido a que se requiere el uso de fármacos, personal especializado, requiere de instalaciones idóneas, y pone en riesgo el bienestar del animal debido a que es un procedimiento invasivo en donde se utilizan agentes anestésicos (Massei y Miller, 2013). No obstante, la esterilización mejora la calidad de vida del animal, en el caso de los machos el deseo de apareamiento desaparece, alejándolos de peleas por dominancia; mientras que en el caso de las hembras se evitan los celos recurrentes, el nacimiento de camadas, en cualquiera de los casos los animales se tornan más pacíficos y dóciles (Pérez-Rivero, 2008; González y Orrego, 2013).

En el caso específico de gatos han existido proyectos que pretenden reducir el número de estas comunidades, dichos proyectos incluyen la liberación intencional del virus de panleucopenia, intoxicación, introducción de depredadores, eutanasia y castración (Foley *et al.*, 2005). Para que estas medidas de control sean efectivas los factores sociales juegan un papel importante en la implementación de la erradicación de gatos callejeros (Nogales *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Principales métodos de control de poblaciones ferales en México y el mundo.

| Método | México | Mundo |
|---------------------------|---|--------------------------------|
| Esterilización quirúrgica | ✓ | ✓ |
| Castración | ✓ | ✓ |
| Eutanasia | ✓ Aprobada por la NOM-033-SAG/ZOO-2014 | ✓ En Italia no es aprobada |
| Educación | ✓ | ✓ |
| Profilaxis química | ✓ | ✓ |
| Adopción | ✓ | ✓ |
| Medicina alternativa | ✓ <i>Carica Papaya</i> Coumestrol- Quitosán | ✓ <i>Asia Embelia ribes</i> |

Una de las preocupaciones para abordar este problema de la sobrepoblación de caninos y felinos es atendida en los centros de atención canina (Clínicas veterinarias delegacionales en la Ciudad de México), los cuales son establecimientos de servicio públicos orientados a resolver esos problemas, entre las actividades que estos lugares realizan se encuentra la captura de perros callejeros, recolección y observación de animales agresivos, sacrificio de los animales no reclamados y obtención de muestras para diagnóstico de animales sospechosos (Secretaría de Salud, 2013).

2.2 Políticas públicas a nivel Mundial para el control de fauna feral (inversión económica)

Debido a la creciente preocupación acerca de los perros y gatos vagabundos en algunos países como Italia en donde la prohibición de la eutanasia es dictada por las autoridades, excepto si los perros están enfermos incurables o son peligrosos, promoviendo la inscripción en un registro del perro y su esterilización, así como la protección y asistencia para los perros y gatos vagabundos como se menciona en la Ley n. 281 "de Animales de Compañía y la Prevención de Vagabundos", que describe los problemas y sentó las bases para las acciones para resolverlos, haciendo hincapié en el bienestar de los animales; mientras que en Japón y Australia el 10% de perros capturados en las calles son devueltos a sus

dueños y al resto se les realiza eutanasia, de esta manera se controla a la población canina (Høgåsen *et al.*, 2013; Slater *et al.*, 2008).

En Venezuela cuentan con una Ley para la Protección de los Animales Domésticos, dominados, silvestres y exóticos, libres y en cautiverio, que da protección a los animales y plantea un trato justo. Establece sanciones que garanticen la integridad física y psicológica de los animales domésticos en condiciones que no impliquen maltrato, abandono, daños, crueldad y sufrimiento (LXI Legislatura de México, 2014).

La Ley de Protección Animal de Argentina sanciona el maltrato animal para animales domésticos y su abandono (LXI Legislatura de México, 2014).

En Chile la Ley de Tenencia Responsable de mascotas instaura la eutanasia como una forma de control de la población de animales abandonados (LXI legislatura de México, 2014).

En México, específicamente en el Distrito Federal se calcula un total de 1, 200, 000 animales de los cuales se estima que un 10% se encuentran en situación de calle, es decir (120,000). Para la delegación Coyoacán el presupuesto asignado para realizar la actividad de esterilización de animales asciende a \$1, 200,000.00 para el 2014, mientras que para la delegación Milpa Alta el presupuesto asignado es de \$150,000, para la delegación Tláhuac se tiene un presupuesto de \$ 625, 008 para las mismas actividades (IFAI, 2014).

Se cuenta con el programa denominado "Sé un dueño responsable" dándose inicio en el año 2012, abarca la esterilización, vacunación las cuales se llevan a cabo desde 1996 y 1995 respectivamente y fomenta a través de pláticas ciudadanas, brindarle a los animales de compañía un trato digno y convivencia para todos, así como, Centros de Atención Canina (IFAI, 2014).

La Norma Oficial Mexicana (NOM-033-SAG-ZOO-2014) menciona los métodos utilizados para el control letal de poblaciones de perros, dentro de las cuales se encuentra la electro insensibilización así como sobredosis de fármacos vía intravenosa (barbitúricos) para perros mayores de 4 meses.

3. Métodos no quirúrgicos de esterilización

La esterilización no quirúrgica de perros y gatos callejeros presenta la ventaja de ser más rentable que la esterilización quirúrgica pues ayuda a reducir el tamaño y el impacto de dichos animales, pues más animales pueden ser tratados por unidad de tiempo (Massei y Miller, 2013).

Las formas alternativas de anticoncepción en animales ferales en los últimos años han observado mayor interés, uno de los métodos de anticoncepción utilizado en gatos y que es alternativo a la castración o esterilización quirúrgica es usado en Estados Unidos, se trata del acetato de megestrol (AM) (Greenberg *et al.*, 2013).

Otra alternativa para el control de poblaciones callejeras son las vacunas anticonceptivas las cuales se han utilizado para inhibir la reproducción en roedores, ungulados, carnívoros, elefantes, y marsupiales (Massei y Miller, 2013).

Algunos fármacos que han sido utilizados para la esterilización de los perros machos, son esterilizantes intratesticulares, los cuales son inyectados en los testículos provocando infertilidad, dentro de estos encontramos el Gluconato de Zinc neutralizado por arginina (Neutersol), otro nuevo estudio se realiza también con el cloruro de calcio (CaCl_2), como inyección intratesticular (Massei y Miller, 2013). También se ha utilizado la inyección de metilcianoacrilato (MCA) en la cola del epidídimo la cual provoca azoospermia y como consecuencia la esterilidad de los perros (Galván *et al.*, 1994).

En cuanto a medicina alternativa, la administración vía oral del extracto de la semilla de *Carica Papaya* ha demostrado ser efectiva en el control de poblaciones de perros callejeros (Ortega *et al.*, 2011).

La planta *Embelia ribes* es utilizada para prevenir la gestación y ha sido usada en perros machos por vía oral como control de poblaciones temporal (Pérez-Rivero *et al.*, 2008).

4. Fitoestrógenos

Los estrógenos de origen vegetal mejor conocidos como fitoestrógenos, (Pilsakova *et al.*, 2010). Son producidos por una gran diversidad de plantas, y estos se caracterizan por tener actividad estrogénica o antiestrogénica sobre humanos y animales; los fitoestrógenos se producen en mayor cantidad en las leguminosas y son utilizados por las plantas como un mecanismo de defensa (Pike *et al.*, 1999).

La estructura química de los fitoestrógenos es similar a la de los estrógenos, debido a que en su estructura existe un anillo aromático y un grupo hidróxilo (Ososki y Kennelly, 2003).

Debido a su diversidad química los fitoestrógenos se pueden dividir en diferentes familias de compuestos, dentro de los cuales se encuentran los flavonoides representados por las isoflavonas donde destaca la Genisteína, los coumestanos donde el coumestrol es su principal representante, los lignanos con la enterolactona y los estilbenos con el resveratrol (Patisaul *et al.*, 2001). Los fitoestrógenos que más abundan en la naturaleza son las isoflavonas y los coumestanos, estos últimos con una estrogénicidad de 1/1000 y las isoflavonas con 1/10000 comparándolos con la actividad del 17 β - estradiol (Adams, 1995).

Debido a que los fitoestrógenos a dosis reducidas imitan funcionalmente a los estrógenos de los animales domésticos, estos desempeñan un papel importante en la prevención de cáncer, enfermedades del corazón y síntomas de la menopausia, de manera similar estimulan el desarrollo de tejidos reproductivos femeninos y masculinos y en el mantenimiento del sistema nervioso central y esquelético; debido a que influyen en el crecimiento y funcionamiento de los diferentes tejidos (Ososki y Kennelly, 2003).

Estos estrógenos producidos por las plantas ingresan a células blanco, en diferentes tejidos donde existan receptores para estrógenos, los cuales pueden ser del tipo alfa (RE α), los cuales se encuentran en tejidos como el hígado, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, huesos, útero y glándula mamaria. Los fitoestrogenos también se unen a receptores tipo β (ER β) los cuales se encuentran presentes en la próstata, ovarios, testículos,

tiroides, suprarrenales, páncreas, vesícula biliar, piel, tracto urinario, tejido linfóide, pulmón, hipotálamo, cerebelo y bulbo olfatorio (Lenis *et al.*, 2010).

La gran diversidad en la actividad biológica de los fitoestrógenos se debe a su capacidad de actuar como agonistas, esto significa que imitan a los estrógenos endógenos y causan efectos estrogénicos, también pueden actuar como antagonistas de los estrógenos ya que pueden bloquear o alterar los receptores de estrógeno (RE) y evitar la actividad estrogénica, causando así efectos antiestrogénicos (Ososki y Kennelly, 2003).

Los fitoestrógenos tienen una mayor afinidad de unión para ER β que para RE α , no obstante la complejidad de estos procesos hace difícil definir con exactitud a cual se une más eficientemente debido a las diferentes actividades de transcripción en función de los tipos de fitoestrógenos. (Ososki y Kennelly, 2003).

Las diversas actividades y la biodisponibilidad de los fitoestrógenos varían dependiendo de la forma de administración, dosis, metabolismo del individuo y la ingestión de otras sustancias, el tipo de tejido donde tienen efecto y sobre todo del tipo de fitoestrógeno (Ososki y Kennelly, 2003).

El empleo de algunos fitoestrógenos administrados por vía oral ha sido descrito como una alternativa en el control reproductivo en el vampiro común (Serrano *et al.* 2007).

4.1 Coumestanos

Los coumestanos se sintetizan a partir de ácido cinámico, siendo el coumestrol un compuesto de 15 carbonos (Hernández, 2004), son fitoestrógenos que muestran actividad estrogénica, las plantas que más contienen coumestanos son el trébol (*Trifolium*) y la alfalfa (*Medicago sativa*), el contenido de coumestrol en estas plantas se da según la variedad de la planta, etapa de crecimiento, corte, presencia de enfermedad por ataques de insectos o de hongos (Ososki y Kennelly, 2003).

Se ha reportado que en algunos animales que consumen estos forrajes se ha demostrado que tienen efectos estrogénicos negativos principalmente en hembras, esto debido a su fuerte afinidad a los RE β (Ososki y Kennelly, 2003).

El coumestrol es un fitoestrógeno que al incorporarse a la dieta de los animales machos reporta una disminución importante en el peso y la libido (Whitten *et al.*, 1994).

4.2 Efectos de los fitoestrógenos en diversos órganos

El sistema vascular expresa el E_{α} y E_{β} por lo cual los fitoestrógenos se unen con diferente afinidad, teniendo efecto biológico tanto en sus células endoteliales como en las del músculo liso; la genisteína inhibe la proliferación de las células endoteliales inhibiendo las señales de transducción involucradas en trastornos vaso-oclusivos (Dubey *et al.*, 2000).

Los RE_{β} en el cerebro se expresan en el área preóptica, en el núcleo ventro-medial del hipotálamo y en el tallo cerebral antagonizando la acción del estradiol mediante la regulación del ARNm para el RE_{β} en el núcleo paraventricular (Pérez-Rivero *et al.*, 2007). El coumestrol tiene la capacidad de suprimir picos de hormona luteinizante (LH) en ratas; la presencia de los RE_{α} y RE_{β} en las neuronas secretoras de la (GnRH) abre la posibilidad de que los fitoestrógenos actúen sobre ellas (McGarvey *et al.*, 2001).

En el aparato reproductor del macho, los RE_{β} se expresan en diversas regiones en el testículo, dentro de las cuales se encuentran los conductos eferentes, epidídimo, conductos deferentes y la próstata; de igual manera se sabe que se expresan en las células de Sertoli, espermatogonias y espermatocitos, solo en las células de Leydig de los adultos se expresan los RE_{α} (Pérez-Rivero *et al.*, 2007). La exposición a estrógenos exógenos como los fitoestrógenos o inhibición de estrógenos endógenos durante el desarrollo o edad adulta induce cambios estructurales y funcionales dentro del tracto reproductivo masculino (Assinder *et al.*, 2007).

Los fitoestrógenos alteran también la expresión de RE en la hembra, influenciando de manera negativa los ciclos foliculares en los ovarios ya que estos actúan uniéndose a los RE_{β} presentes en las células de la granulosa, por lo que actúan disminuyendo el efecto de los estrógenos en los folículos (Whitten y Patisaul, 2001).

Los estrógenos tienen una participación importante dentro del sistema óseo ya que ayudan a disminuir el riesgo de osteoporosis y fracturas en hembras (Wen-Ling Lee *et al.*, 2013).

5. Receptores estrogénicos

Las hormonas esteroides ejercen acción por medio de la unión a receptores miembros de la superfamilia de receptores nucleares, los cuales son factores de transcripción, dentro de los cuales se encuentran receptores de andrógenos (RA), glucocorticoides (RG), progesterona (RP), mineralocorticoides (RM) y estrógenos (RE); todos ellos con una estructura modular que consiste en un dominio carboxi-terminal de unión al ligando (LBD), una región localizada en el centro de la estructura la cual es capaz de unir ADN (DBD) y un dominio amino-terminal (NTD) para la completa actividad transcripcional del receptor (Bottino y Lanari, 2010).

Estructura de los Receptores Estrogenicos:

El ER α contiene 595 aminoácidos y está constituido por diferentes dominios: A/B o dominio regulador, el cual contiene varios sitios de fosforilación; dominio central de unión al ADN (DBD) en la región C y el cual es esencial para activar la transcripción y producir el cambio conformacional necesario para interactuar con el elemento respuesta a los estrógenos (ERE); un dominio en la región D que participa en el movimiento del ER al núcleo después de su síntesis en el citoplasma y finalmente un dominio de unión al ligando que se ubica en la región D, en el extremo carboxilo terminal (LBD). Por otra parte el ER β contiene solamente 530 aminoácidos, es débil por estar asociado con un dominio represor, su estructura es similar al ER α (Teppa y Terán, 2005), como se muestra en la Figura 1.

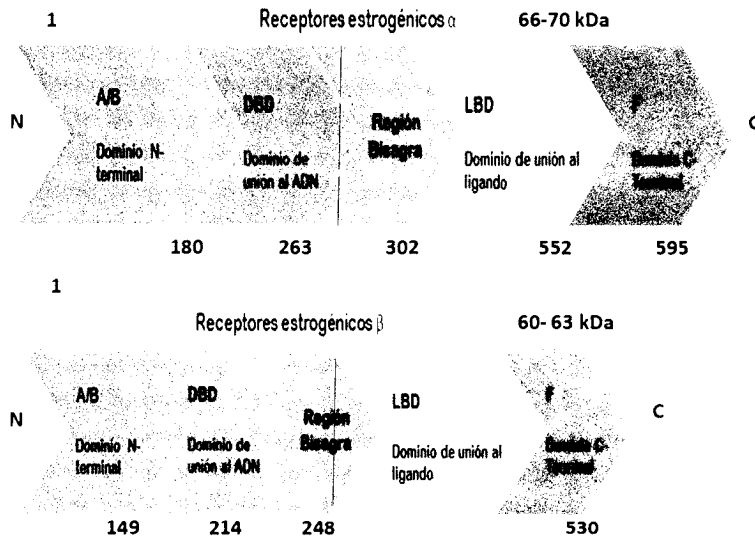


Figura 1.- Estructura modular de los receptores estrogénicos (RE) α y β .

La activación del ER se inicia cuando la hormona se une a él, induciendo cambios en la conformación del receptor, disociándose de un complejo co-represor y uniéndose a un complejo co-activador ocurriendo así su dimerización, el receptor se transporta al núcleo permitiendo así la interacción de los sitios específicos de unión al ADN del receptor con las secuencias conocidas como ERE que se encuentran en el genoma, luego se inicia la transcripción a través de la enzima ARN polimerasa y la formación de ARNm el cual migra al citoplasma, donde se realiza la traducción en los ribosomas; las proteínas resultantes actúan como correguladoras modulando la capacidad de transcripción del ER incrementándola o disminuyéndola; de tal manera que se modulan varias respuestas en muchos tejidos en donde la hormona ejerce su efecto biológico, ya sean de características agonistas o antagonistas (Teppa y Terán, 2005).

Cuando hay una ausencia de estrógenos los ER se asocian con los corepresores que inhiben la actividad de transcripción. El coumestrol puede actuar como ligando uniéndose de manera más eficiente al ER β con una afinidad similar al 17 β estradiol. (Pérez-Rivero *et al.*, 2007).

6. Quitosán

Hoy en día el uso del quitosán en la medicina veterinaria comienza a hacerse importante pues se usa como agente de curación de una herida, agente antimicrobiano, como material de vendaje, como injerto de piel, como agente hemostático, regeneración ósea, efectos analgésicos y también como un vehículo en la administración de fármacos y vacunas (Senel y McClure, 2004).

En los últimos años el quitosán se ha usado en productos farmacéuticos convirtiéndose en la promesa contra muchas dolencias y enfermedades de hoy y mañana (Semwal *et al.*, 2013).

La quitina es un polímero que se encuentra en abundancia en la naturaleza, es un polisacárido que es componente en los exoesqueletos de insectos y crustáceos y también en algunas paredes celulares de bacterias y hongos. El polímero de quitosán se obtiene después de la desacetilación alcalina de la quitina y se compone de copolímeros de glucosamina y N-acetil glucosamina, el quitosán es semicristalino y el grado de cristalinidad se obtiene en función del grado de desacetilación (Senel y McClure 2004). El interés hacia el quitosán se debe a su carácter catiónico, ya que la presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho que el quitosán sea un material muy versátil para estudiar y con una gran posibilidad de hacer modificaciones químicas debido al grupo hidroxilo; no obstante existen diferencias en el comportamiento físico-químico de este compuesto dependiendo de su origen, forma de extracción así como la desacetilación de la quitina (Chávez *et al.*, 2012).

El nombre real de la quitina es $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa. La quitina es completamente insoluble en agua o en medio ácido (Lárez, 2003).

El quitosán tiene propiedades físico-químicas y biológicas, por lo que tiene diversas aplicaciones en diversos campos como la agricultura, cosmética, nutrición, elaboración de alimentos, en la industria farmacéutica y en algunos campos de la medicina (Senel y McClure 2004).

Debido a su baja toxicidad y alergenicidad y a su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y bioactividad el quitosán es un buen agente encapsulador y transportador de fármacos y principios bioactivos, esta encapsulación consiste en el recubrimiento de un compuesto por un material de naturaleza polimérica (Neira-Carrillo *et al.*, 2013).

Tiene un alto peso molecular y una estructura lineal no ramificada, por lo tanto es un excelente agente potenciador de viscosidad en ambientes ácidos, comportándose como un material pseudoplástico, esta viscosidad se reduce cuando la temperatura disminuye; en ambientes ácidos tiene la capacidad de formar geles ya que es hidrófilo y puede retener agua en su estructura; la acetilación permite la modificación de sus grupos amino libres y es responsable del proceso de gelificación. Los geles son utilizados como suministro de fármacos de liberación lenta (Senel y McClure 2004).

7. Fisiología de Hígado y Riñón

7.1 Hígado

Se encuentra situado en la porción anterior de la cavidad abdominal, bajo el diafragma y está protegido por las costillas, lo recubre una cápsula de tejido conectivo fibroso que penetra en el órgano y forma tabiques que dividen al hígado en lóbulos y lobulillos. Los lóbulos están compuestos por las células hepáticas, un retículo delicado, canales biliares, un plexo de grandes capilares llamado sinusoides y una vena central. Los hepatocitos son las células primordiales del hígado y suponen más del 75% de este, se organizan en láminas con perforaciones, son células relativamente grandes, con núcleos redondeados, algunos son binucleados y la mayoría tetraploides, los hepatocitos son los responsables de la secreción endocrina de proteínas plasmáticas como albúminas, lipoproteínas, glucoproteínas y fibrinógenos; también almacenan y modifican vitaminas y hormonas; la insulina y el glucagón son hormonas degradadas principalmente por el hígado. Los hepatocitos son centros de detoxificación de primer orden tales como las toxinas y moléculas externas al organismo, producen la mayor cantidad de urea (Sisson y Grossman, 2005). El hígado de la rata constituye el 41.5% de su peso corporal se encuentra dividido en 4 lóbulos (mediano o lóbulo cístico, lóbulo lateral derecho, lóbulo izquierdo y lóbulo caudal). La rata no posee vesícula biliar, la cual es sustituida por los

conductos biliares donde se produce un flujo casi continuo de bilis al duodeno (Gutierrez, 2011).

El hígado es el órgano más grande del cuerpo y el más importante en la actividad metabólica dentro del organismo; dentro de las funciones bioquímicas que realiza este órgano se encuentran: almacenamiento de glucógeno, síntesis de ácidos grasos, formación de lipoproteínas, colesterol y fosfolípidos; síntesis de proteínas plasmáticas, formación de urea, conversión y desaminación de aminoácidos; almacén y metabolismo de vitaminas; liberación, síntesis y degradación de factores de coagulación; excreción y catabolismo de hormonas; detoxificación de sustancias endógenas y exógenas; formación de bilis (García y Zurita, 2010).

7.2 Riñón

Son las glándulas pares que secretan la orina; tienen color marrón y se localizan en la parte posterior de la cavidad abdominal, tienen forma de alubia y se encuentran rodeados por gran cantidad de tejido adiposo, en la parte dorsal de cada riñón se encuentran las glándulas suprarrenales, que son exocrinas. Los riñones están cubiertos por una cápsula de tejido conectivo, formada de una red fibrosa colágena con una pequeña cantidad de fibras elásticas; debajo de esta se encuentra la corteza renal es de color rojizo oscuro y granular donde están los corpúsculos renales cada uno formado por el origen dilatado de un túbulo renal con una red invaginada de capilares (glomérulos) cuya función es el filtrado de la sangre y la regulación del equilibrio hidrosalino del medio interno, aquí es donde se encuentran las nefronas así como los túbulos contorneados proximales, en los cuales se tiene lugar la reabsorción de aproximadamente el 60% de las sustancias filtradas, además realiza otra función que es recibir productos que son secretados desde la sangre para ser excretados en la orina; entre las sustancias orgánicas endógenas que son secretadas a este nivel se incluyen las sales biliares, uratos, creatinina, adrenalina; también se eliminan algunos antibióticos, diuréticos, analgésicos y herbicidas; por otra parte en los túbulos distales se recupera la capacidad para el transporte de solutos; la médula se proyecta dentro de la pelvis renal (cálices) con una o más papilas; las papilas son los vértices de las pirámides renales. La función principal del riñón no es sólo eliminar productos de desecho presentes en la sangre, sino que también

controla la concentración de electrolitos, la relación ácido-base y la presión sanguínea (Sisson y Grossman, 2005).

El sistema urinario está compuesto por dos riñones, dos uréteres, una vejiga y la uretra, situados en la cavidad abdominal, es uno de los sistemas más importantes del cuerpo, y tiene una gran cantidad de funciones como: filtrar la sangre y reabsorber sustancias en un proceso que mantiene el balance ácido-base; regulan el pH conservando o excretando iones de amonio y carbonato; mantiene la presión sanguínea al regular el contenido de agua en sangre y orina; conservar la concentración de químicos en la sangre y eliminar productos de desecho; filtran sustancias y excretan desechos incluyendo urea, creatinina, ácido úrico, metabolitos de drogas y otras sustancias exógenas; reabsorben algunas de estas mismas sustancias, electrolitos y nutrientes; tienen funciones endocrinas, produciendo hormonas como renina la cual controla a la angiotensina; eritropoyetina que controla la producción de eritrocitos; contribuye a mantener en el cuerpo la cantidad de calcio necesaria para los huesos (Ramírez P. 2010 y Sisson y Grossman, 2005).

8. Pruebas de laboratorio que indican daños a hígado o riñón

8.1 Valoración del funcionamiento hepático

Debido a que en los seres vivos se producen reacciones químicas constantemente, las cuales transforman las sustancias en energía y materia prima para crear nuevas estructuras, las reacciones que se realizan son a gran velocidad gracias a la existencia de catalizadores, los cuales son capaces de acelerar una reacción química sin formar parte de los productos finales ni desgastarse en el proceso dichos catalizadores se denominan enzimas (Pin y Guzmán, 2004).

El hígado suele ser afectado en diversos procesos inflamatorios por infecciones de origen viral, procesos autoinmunes, toxicidad por fármacos y sus metabolitos, así como por defectos genéticos; a este tipo de afectaciones se le llama hepatotoxicidad, la cual se define como la lesión o daño hepático causado por la exposición a un medicamento u otros agentes no farmacológicos. Si bien las reacciones adversas son difíciles de definir se han establecido estas en las alteraciones en los análisis bioquímicos hepáticos los cuales incluyen aumento en por lo menos

alguno de ellos (alanina aminotransferasa, aumento de la bilirrubina sérica, aumento de aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina y en la concentración total de bilirrubina) (Tejada, 2010).

La química sérica ayuda a detectar anomalías hepáticas, dentro de las que se incluyen lesiones o necrosis de los hepatocitos, alteraciones de las funciones excretoras o de síntesis en el hígado, colestasis y alteraciones en la circulación portal (Latimer, 2005).

Una alteración en la permeabilidad de la membrana celular de los hepatocitos ocasiona el derrame de enzimas citosólicas al líquido extracelular y la sangre; dicho derrame puede producirse tanto con daño hepatocelular subletal como con necrosis hepatocelular la magnitud del aumento de la actividad enzimática en el suero depende del número de hepatocitos afectados, gravedad de la lesión y tiempo de vida media en suero de la enzima; el daño hepatocelular suele ir acompañado de tumefacción celular el cual puede llegar a comprimir los canalículos biliares ocasionando colestasis intrahepática; este derrame provoca un aumento de la alanina aminotransferasa (ALT) (Latimer, 2005).

La colestasis es la interrupción u obstrucción del flujo o excreción de la bilis y puede ser consecuencia de inflamación, infección, neoplasias o bien desajustes metabólicos por hepatotoxicidad; la colestasis causa inducción y liberación de fosfatasa alcalina (FAS) (Latimer, 2005).

8.2 Pruebas que indican daño hepático

Para detectar enfermedades hepáticas resulta útil recurrir a las alteraciones en los parámetros de química sérica, las cuales pueden incluir actividades alteradas de las enzimas hepáticas, o aumento de la concentración de sustancias que el hígado eliminaría o excretaría normalmente. Las enzimas hepáticas se dividen en dos categorías de derrame hepatocelular e inducidas; las primeras enzimas se liberan cuando se produce un daño a las membranas de los hepatocitos asociado a daño o necrosis hepatocelular como la ALT, las enzimas hepáticas inducidas no son liberadas al suero cuando aumenta la permeabilidad de la membrana, sino que el aumento de esta es consecuencia de la inducción de la enzima por colestasis, fármacos o efectos hormonales como la FAS (Latimer, 2005).

Alanina aminotransferasa (ALT)

Las aminotransferasas son indicadores bioquímicos empleados para valorar individuos con sospecha de padecimientos hepáticos esto debido a que son marcadores sensibles que detectan lesiones hepáticas (Sánchez y Nogales, 2009).

La alanina aminotransferasa es una enzima de origen hepático que cataliza la transferencia de grupos amino para formar oxaloacetato, por lo tanto su función es catalizar la transferencia reversible de un grupo amino, dando como resultado ácido pirúvico y ácido glutámico en presencia de su activador (vitamina B6); la alanina es un aminoácido de 2 carbonos, el músculo utiliza aminoácidos como fuente de combustible, los grupos amino se transfieren al glutamato por transaminación; el glutamato se convierte en glutamina o transfiere su grupo amino al piruvato mediante la alanina aminotransferasa. Se encuentra de manera abundante en el citoplasma de los hepatocitos. La alanina aminotransferasa es considerada como una enzima hígado-específica aunque también se puede encontrar en el riñón y en cantidades menores en el miocardio y músculo esquelético; (Álvarez-Martínez y Pérez-Campos, 2005; Jiménez *et al.*, 2010 y Tejos *et al.*, 2013).

La distribución de la alanina aminotransferasa es aproximadamente 65% citoplásmica, 8% mitocondrial y 20% fracción nuclear impura, aunque los niveles séricos de dicha enzima pueden cambiar por efecto de ejercicio o por las mañanas en donde tiende a aumentar hasta en un 45%; la alanina aminotransferasa tiene una vida media de 63 horas y es vertida a la sangre cuando se lesiona la membrana celular, aunque no siempre es necesario que exista necrosis del hepatocito para su liberación (Álvarez-Martínez y Pérez-Campos, 2005; González, 2012; Valladares, 2014).

Debido a que en el hígado se producen múltiples reacciones de transaminación una de gran valor clínico es la alaninoaminotransferasa, esta enzima ayuda a cuantificar el grado de inflamación y lesiones hepáticas causadas por exposición a sustancias de origen químico o natural, ya que según sus niveles encontrados en las concentraciones séricas, cuando estas se encuentran elevadas se habla de enfermedades virales como hepatitis o hipotensión prolongada, también tiende a elevarse

por fármacos o toxinas y otras enfermedades hepáticas asociadas con necrosis como: mononucleosis infecciosa y colestasis (Pérez-Jackson *et al.*, 2010 y Valladares, 2014).

Fosfatasa alcalina (Ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa)

Es una enzima que hidroliza el enlace éster fosfórico entre un grupo fosfato y un radical orgánico a pH básico, liberando fosfato inorgánico. La fosfatasa alcalina se sitúa en la membrana celular e interviene en la precipitación del fosfato cálcico en los huesos, absorción de fosfatos por el intestino, síntesis de proteínas hísticas e hidrólisis de los ésteres fosfáticos del riñón e hígado; por lo tanto se encuentra presente en hígado, riñón, intestino, placenta y hueso; cada uno de estos sitios contiene una isoenzima diferente que puede ser separada mediante electroforesis. La fosfatasa alcalina del hígado se encuentra predominantemente unida a la membrana plasmática de los hepatocitos y epitelio biliar, tiene amplios intervalos de referencia, la isoenzima hepática es específica de enfermedades hepáticas y su aumento es un indicador sensible de colestasis, tiene un tiempo de aclaramiento de aproximadamente 72 horas en los perros; por lo tanto es un marcador de disfunción biliar, cuyos valores pueden aumentar hasta 10 veces en procesos inflamatorios, obstrucciones de vías biliares o presencia de masas. La medida de niveles anormales de esta enzima en el suero indica la existencia de daños hepáticos o de enfermedades óseas degenerativas. El aumento fisiológico de los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina se produce en hembras gestantes o en animales en fase de crecimiento (Fernández *et al.*, 2008; Latimer, 2005 Sánchez *et al.*, 2002 y Bárcena *et al.*, 2007).

Algunas otras elevaciones aisladas de esta enzima se pueden observar en enfermedades tales como diabetes, insuficiencia cardíaca e hipertiroidismo. La elevación de fosfatasa alcalina de origen hepático mayor de 3 veces lo normal ocurre en individuos con enfermedad colestásica intra o extrahepática y enfermedades infiltrativas tales como granulomatosis, neoplasias y amiloidosis (Valladares, 2014).

8.3 Valoración del funcionamiento renal

Los riñones son órganos vitales que realizan múltiples funciones con el fin de mantener la sangre limpia y químicamente balanceada. El cálculo de la tasa de filtración glomerular (TFG) es uno de los principales indicadores de la función renal, ya que su valoración permite un diagnóstico precoz de insuficiencia renal (Caruncho-Méndez *et al.*, 2007).

Los biomarcadores más utilizados para determinar la función renal son la creatinina, el ácido úrico y la urea; un biomarcador ideal para determinar la función renal debe filtrarse libremente por el capilar glomerular y excretarse solo por el glomérulo sin reabsorberse ni secretarse por túbulos renales, así mismo debe tener niveles circulantes estables y no unirse a proteínas plasmáticas, puede ser endógeno (preferentemente) o exógeno pero no tóxico ni alterar la función renal (Férnandez- García *et al.*, 2010).

8.4 Pruebas que indican daño renal

Creatinina

La creatinina es un desecho metabólico que se origina de manera endógena por conversión no enzimática de creatina, es un compuesto nitrogenado natural que se combina con fosfato originando así fosfocreatina como forma de almacenamiento de la energía metabólica en el músculo esquelético teniendo importancia en el metabolismo energético durante la contracción del músculo esquelético y la recuperación tras un esfuerzo físico, y es excretada libremente por vía renal y una pequeña parte excretada en heces, siendo retirada del plasma por filtración glomerular; su medición es útil en el diagnóstico de diversas nefropatías (Carrillo y Gilli, 2011; García *et al.*, 2011; Latimer, 2005; Pérez, 2004).

Todos los días se transforma una cantidad constante de creatina en creatinina la cual no es reutilizada; esta última se encuentra en valores superiores en machos que en hembras y se distribuye en toda el agua corporal difundándose más lentamente que la urea, la creatinina es filtrada libremente por los glomérulos no habiendo reabsorción tubular. (Latimer, 2005).

Lo habitual es interpretar los valores de la función renal basándose en la creatinina sérica, sin embargo suele ser un criterio que no refleja el mismo

grado de función renal entre los individuos, por lo tanto las concentraciones de creatinina no refleja con exactitud la tasa de filtrado glomerular. La constante formación y excreción de este metabolito la convierte en un índice de la función renal, teniendo una utilidad casi exclusivamente para la evaluación de dicha función como pérdida de la función de las nefronas o perfusión renal alterada. (Férrandez-Fresnedo et al., 2002).

La creatinina depende entonces de la masa muscular, sexo, edad y secreción tubular entre otros factores, ya que el riñón es capaz de perder hasta un 50% de su función sin reflejar un incremento en la creatinina sérica (Gómez et al., 2006).

Nitrógeno ureico (BUN)

El ciclo de la urea es un conjunto de seis reacciones metabólicas encaminadas a la eliminación de amonio que se forma en la degradación de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, donde dos átomos de nitrógeno (uno procedente del carbamilfosfato y otro del aspartato) y un carbono procedente del bicarbonato dan lugar a una molécula de urea en cada vuelta del ciclo, también gracias a este ciclo se realiza la biosíntesis y degradación de arginina; es el hígado el único órgano donde el ciclo de la urea se completa (Pintos et. al., 1997).

Por lo tanto la vía metabólica que permite la transformación del amoníaco en urea se cataliza a través de seis enzimas: N-acetilglutamato sintetasa (NAGS), carbamilfosfato sintetasa (CPS), ornitina transcarbamilasa (OTC), argininosuccinato sintetasa (ASS), argininosuccinato liasa (ASL) y arginasa. Las tres primeras enzimas se localizan en la mitocondria. Permiten eliminar la toxicidad de una primera molécula de amoníaco en forma de citrulina. La primera etapa es la síntesis del N-acetilglutamato, que es un coactivador indispensable de la enzima siguiente, la CPS I. También existe una CPS II citosólica que cataliza la formación de carbamilfosfato a partir de la glutamina como dador de nitrógeno. Este carbamilfosfato citosólico se utiliza en la síntesis de las bases pirimidínicas, con el ácido orótico como metabolito principal. La citrulina se exporta en el citosol, donde fija una segunda molécula de amoníaco aportada por el aspartato antes de la

transformación final de la urea. Esta parte citosólica del ciclo la catalizan las tres últimas enzimas (Carretero, 2004).

La degradación de los aminoácidos origina amoníaco, la cual es una sustancia tóxica que se transforma en urea; el amoníaco se origina de los aminoácidos mediante dos etapas; la primera en la cual se produce una transaminación con formación de glutamato, la segunda donde se realiza la desaminación del glutamato con formación de amoníaco. La desintoxicación del amoníaco se consigue mediante un ciclo metabólico llamado ciclo de la urea o urogénesis; la cual transcurre en los hepatocitos periportales (Mataix y Sánchez de Medina, 2009).

El amoníaco procede del catabolismo de los aminoácidos hepáticos y del originado por los microorganismos del intestino, el ciclo de la urea posee entonces una gran capacidad metabólica y está regulado por efectos alostéricos y por inducción enzimática (Mataix y Sánchez de Medina, 2009).

Por lo tanto la urea es el producto final del catabolismo de los aminoácidos y es la forma no tóxica de amoníaco la cual es sintetizada en el hígado y que se excreta por los riñones, es filtrada libremente por el glomérulo y reabsorbida por el túbulo colector, la urea no aparece en las heces porque es absorbida o convertida en amoníaco por bacterias que contienen ureasa. Una vez la urea entra al aparato circulatorio, difunde de forma pasiva por todo el compartimento acuoso, requiriéndose aproximadamente 90 minutos para alcanzar el equilibrio; el BUN y el nitrógeno ureico sérico se encuentran en la misma concentración, por lo tanto eritrocitos, plasma y suero tienen la misma concentración de urea (Férnandez- García *et al.*, 2010 y Latimer, 2005).

La concentración de urea es reportada como Nitrógeno ureico sanguíneo (BUN). Existen dos grandes procesos que alteran la concentración de la urea en el suero y estos son la tasa de síntesis de urea por los hepatocitos y la tasa de aclaración de la urea por los riñones. La tasa de síntesis de la urea depende en forma primaria de la función hepática y se encuentra influenciada por alteraciones en la dieta a base de proteína o su catabolismo. La tasa de aclaración renal depende de la filtración glomerular y de la tasa de resorción de urea por los túbulos renales (Mutis-Barreto y Pérez Jiménez, 2005). La urea puede elevarse por diversos

factores destacando la ingesta proteica o hemorragia digestiva o aumento en el catabolismo proteico (Laso, 2010).

Los niveles de nitrógeno ureico se usan para evaluar la función renal basada en la capacidad del riñón de remover desechos nitrogenados en la sangre; del mismo modo sirve como un indicador del metabolismo proteico, por lo tanto su excreción es importante e indispensable para el reconocimiento de algunas enfermedades o situaciones clínicas (Mutis-Barreto y Pérez Jimenez, 2005; Nicolás-Martinuzzi *et. al.*, 2011).

El aumento de la concentración de BUN es resultado de una disminución de filtración glomerular, existiendo dos clasificaciones de azotemia; la azotemia prerrenal originada por necrosis, inanición, infección y/o fiebre; y la azotemia renal que se produce cuando aproximadamente tres cuartas partes de las nefronas no son funcionales; por otro lado cuando se encuentran niveles bajos de BUN hay una disminución de la función hepática particularmente en el ciclo de la urea reduciendo el catabolismo proteico (Latimer, 2005).

9. Función de los estrógenos en hígado y riñón

9.1 Función de los estrógenos en el hígado

Ambos receptores estrogénicos son expresados en el hígado de roedores y otros mamíferos en una cantidad menor en comparación con órganos reproductivos, su cantidad es independiente del sexo, y de la etapa de la vida de los individuos, siendo más altas durante el período perinatal, disminuyendo hasta el inicio de la pubertad y aumentando para llegar a pico en la postpubertad (Shen, 2015 y Koritnik *et al.*, 1995).

Según Teppa y Terán, 2005 los estrógenos en el hígado estimulan la producción de proteínas que son factores de la coagulación y receptores para lipoproteínas hepáticos.

La globulina fija hormonas sexuales, los estrógenos inducen la producción de la globulina por el hígado y consecuentemente hace que los niveles de testosterona libre en plasma disminuyan, en el macho solo una fracción pequeña de estrógenos circulantes provienen del testículo, ya que la

mayoría proviene de la conversión periférica en el tejido adiposo por la actividad de las aromatasas, la producción diaria de estradiol es menor a 45 µg (Hernández, 2004).

La cantidad de RE en el hígado de hembras se encuentra regulada por diversos tejidos de los cuales destaca el útero, la exposición a los estrógenos con dosis agudas aumenta los niveles de RE nucleares por acción de las hormonas de la pituitaria, por su parte los machos tiene 7 veces los niveles más altos de actividad de 2-hidroxilasa que las hembras lo cual es ventajoso para el rápido metabolismo de los estrógenos en los machos, ya que se impide al acceso de los estrógenos de los RE hepáticos, estas enzimas potencian la capacidad de respuesta de los andrógenos (Koritnik et al., 1995).

Los estrógenos son conjugados a nivel hepático, por lo cual se convierten en compuestos hidrosolubles y pueden llegar a ser estructuralmente parecidos a los ácidos biliares, los cuales son excretados hacia el intestino a través de la vía biliar; en el intestino la flora bacteriana normal desconjuga los estrógenos haciéndolos nuevamente liposolubles; por lo que estas formas liposolubles vuelven a tener actividad biológica y son nuevamente reabsorbidos vía circulación entero-hepática, regresando así a la circulación como un metabolito activo (Medina, 2010).

Se ha demostrado que el hígado es un órgano blanco importante para los estrógenos, la actividad transcripcional a nivel hepático de los RE está asociada con el ciclo reproductivo y estado nutricional del individuo. Varias líneas de evidencia indican que los estrógenos están implicados en la prevención de depósitos de grasa, reducen la síntesis de lípidos y aumentan el transporte de triglicéridos a nivel hepático (Della-Torre et al., 2016).

9.2 Función de los estrógenos en el riñón

Si bien el efecto de los estrógenos sobre el riñón aún hoy en día es incierto se sabe que hay tres receptores de estrógeno distintos, incluyendo RE β , y GPER (conocidas como proteínas G-proteína-par 30), las cuales se

expresan en el riñón. Los estrógenos pueden suprimir la síntesis de colágeno en las células mesangiales glomerulares mediante la atenuación de la angiotensina II inducida por la actividad de proteína quinasa activada por mitógeno y la expresión del factor de transcripción AP-1, para así inhibir indirectamente la proliferación de células mesangiales glomerulares mediante la modulación de la síntesis de promotores e inhibidores del crecimiento, lo cual puede limitar la progresión de la glomeruloesclerosis porque el aumento de la generación y deposición de proteínas de la matriz extracelular es considerada como un paso inicial en una lesión glomerular y pérdida de la función renal (Wen-Ling Lee et al., 2013).

Los riñones en las ratas son sensibles a los andrógenos, los cuáles juegan un papel importante en la hipertrofia glomerular y renal, a pesar de que los estrógenos tienen efecto antiandrógeno estos no pueden bloquear todas las consecuencias adversas de los andrógenos en el riñón. Los estrógenos influyen en el crecimiento normal del riñón, ya que el riñón está influenciado por REa (Lane, 2008).

9.3 Intoxicación por estrógenos

La toxicidad por estrógenos se da en relación con la dosis, los diferentes tipos de estrógenos, la edad del animal y la sensibilidad de cada animal, aunque la mayoría de los animales que son intoxicados por estrógenos suelen recuperarse una vez eliminados estos de su cuerpo, frecuentemente se desarrolla anemia aplásica crónica severa e irreversible y el animal muere debido a anemia profunda, hemorragias masivas, trombocitopenia o infecciones bacterianas secundarias con cuadros sépticos debido a la neutropenia, toda esta intoxicación se da a nivel de médula ósea (Varela, 1994).

Después de que hay un aumento en el cuerpo de estrógenos comienza a aumentar la producción de neutrófilos en la médula ósea, lo que resulta en un aumento en las células blancas de la sangre periférica. La leucocitosis es seguida por leucopenia, la cual persiste hasta el día 21 después de la exposición elevada de estrógenos. Los efectos de los estrógenos sobre el sistema hematopoyético se produce en 3 etapas. Etapa 1 (0-13 días) se asocia con un breve incremento en el número de plaquetas seguido de

una trombocitopenia grave. Etapa 2 (13-20 días) se caracteriza por hiperplasia de la médula ósea de granulocitos con neutrofilia. Etapa 3 (días 21-45) puede estar asociada con recuperación de la médula ósea o aplasia dependiendo de la dosis (Sontas *et al.*, 2009).

Dentro de los signos clínicos que se presentan en la toxicidad por estrógenos se presentan letargia y palidez debida a la anemia, hemorragias petequiales o sangrados, fiebre debida a infecciones de leucopenia, alopecia, evidencia de estro en hembras y feminización en machos (Echeverri y Rodríguez 2007).

En el caso de los machos una intoxicación por estrógenos se ve reflejada en efectos de alteraciones sobre la espermatogénesis como incremento en la apoptosis de las células germinales (Atanassova *et al.*, 2010), disminución en la concentración y motilidad espermática (Pino y Alvis, 2009; Dehghan *et al.*, 2005), así como degeneración del epitelio germinal en el testículo (Lohiya *et al.*, 2005).

10. Objetivos

10.1 Objetivo General

Valorar el efecto de la aplicación de quitosán-coumestrol por vía subcutánea sobre el funcionamiento hepático y renal en ratas macho Wistar.

10.2 Objetivos específicos

Cuantificar los niveles de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FAS), para determinar si existen modificaciones en la secreción a nivel hepático al administrar la combinación quitosán-coumestrol por vía subcutánea que puedan indicar un probable efecto tóxico sobre el hígado.

Cuantificar los niveles de urea y creatinina sérica para determinar si existen modificaciones en su concentración que se asocian a alteraciones de función renal por toxicidad al administrar la combinación quitosán-coumestrol por vía subcutánea.

Valorar mediante microscopía de fluorescencia la presencia del coumestrol unido a su receptor en el parénquima hepático y renal para

determinar la afinidad de este compuesto hacia los tejidos antes mencionados.

Determinar histológicamente si existen alteraciones celulares y/o estructurales en hígado y riñón que interfieran con su función y que puedan ser asociadas a la administración de la combinación quitosán-coumestrol vía subcutánea.

11. Hipótesis

La administración del coumestrol por vía parenteral, utilizando al quitosán como vehículo, no producirá efectos adversos sobre el funcionamiento renal ni hepático en ratas macho (*Rattus rattus*).

12. Material y Métodos

12.1 Ubicación

El trabajo se realizó dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco (UAM-X) la cual se encuentra ubicada en Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P. 04960, D.F. México; los animales se mantuvieron en el bioterio y todas las muestras se procesaron en el laboratorio de Histopatología Veterinaria de la UAM-X.

Este proyecto fue aprobado por el Comité Interno del Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad de Xochimilco (DCBS.CICUAL.12.12) y realizado conforme a los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, NOM 062 ZOO 1999.

12.2 Animales

Se utilizaron 45 ratas macho Wistar mayores de 60 días, con un peso aproximado de 250 a 300g. provenientes del UPAL bioterio/UAM-X. se mantuvieron dentro del bioterio en condiciones convencionales; con libre acceso de agua y alimento, para cubrir sus necesidades nutricionales.

siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Las ratas se alojaron en jaulas individuales marcadas de acuerdo al grupo que les correspondía (control, tratamiento Quitosán-Coumestrol 800 µg y tratamiento Quitosán-Coumestrol 1600 µg.

12.3 Tratamientos

Las ratas se dividieron aleatoriamente en tres grupos, 15 animales fueron destinados a grupo control, 15 animales más fueron implantados con la combinación de Quitosán-Coumestrol 800 µg y por último 15 animales más fueron implantados con la combinación de Quitosán-Coumestrol 1600 µg. El implante se puso a la altura de la cruz, se anestesiaron a los animales con Isoflurano al 3% y durante todo el tiempo fueron monitoreados con un pulsioxímetro, una vez anestesiados se rasuró la zona donde se colocó el implante, se procedió a hacer la asepsia requerida para poner el implante, el cual fue administrado con una jeringa de insulina en la zona de la cruz del animal, con una aguja hipodérmica desechable calibre 21G x 32 mm, se esperó el tiempo necesario para que los animales despertaran de la anestesia y se alojaron en jaulas individuales durante el transcurso de los tratamientos. Todos los animales mantuvieron el implante durante 4 semanas, a partir de la semana 5 se sometieron a eutanasia 3 animales de cada grupo para coleccionar las muestras, siguiendo este mismo orden hasta la semana 9.

12.4 Toma de muestras

Las ratas fueron inducidas a anestesia general por inhalación con base en Isoflurano y oxígeno, una vez anestesiadas, se obtuvieron las muestras sanguíneas para realizar las pruebas serológicas de bioquímica clínica, para lo cual se utilizó una jeringa de 5 ml, con aguja G21 de 0,8 mm x 40 mm con la cual se hizo una punción cardíaca para obtener la mayor cantidad de sangre posible, una vez obtenida la sangre se pasó a un tubo vacutainer® sin anticoagulante donde se esperó 15 minutos o hasta la retracción del coágulo y liberación del suero para posteriormente centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos y separar completamente el suero, pasado ese tiempo el suero se colocó en tubos Eppendorf® con una micropipeta, evaluando las características de la muestra sérica como la presencia de hemólisis o lipemia que pudieran interferir en las

determinaciones, además de esto las muestras en óptimas condiciones se protegieron de la luz y se congelaron hasta su posterior utilización para su análisis espectrofotométrico.

Para evaluación histopatológica de hígado y riñón una vez que fueron eutanasiadas las ratas, se procedió a retirar el hígado, y se hicieron cortes aleatoriamente en dicho órgano los cuales fueron depositados en solución fijadora de formol bufferado al 10%, para el caso de los riñones se realizó un corte sagital y se depositaron en la misma solución fijadora donde se quedaron durante 72 hrs, para después continuar con la técnica de procesamiento del tejido.

12.5 Procesamiento de muestras histopatológicas

La fijación es el proceso mediante el cual los elementos constitutivos de las células, y por tanto de los tejidos, son fijados en su estado físico y parcialmente en su estado químico, lo cual permite resistir el tratamiento sucesivo con diversos reactivos sin que ocurra pérdida, distorsión o descomposición significativas. El objetivo es detener el proceso autolítico de las células y conservarlas, lo mejor posible, en el estado en que se encontraban durante la vida INECC, en este caso la fijación de los tejidos se llevó a cabo mediante formol buferado al 10%(2009).

Para el procesamiento de las muestras se hizo una deshidratación, aclarado e infiltrado de los tejidos, y para ello se utilizó el histoquinete marca Leica®, modelo TP1020 fabricado en Alemania, que es un aparato donde se colocaron las muestras durante 19 horas y que para la deshidratación utiliza diferentes concentraciones de alcohol comenzando con la menor concentración de estos; para la impregnación de parafina utiliza baños con benceno y para la infiltración de los tejidos se utiliza parafina especializada para dicho fin.

Posteriormente se sacaron del histoquinete y se incluyeron en cubos de parafina, (a esto se le conoce como inclusión en parafina) que se dejaron enfriar un par de horas para después seguir con el corte de tejidos en el micrótopo, estos se cortaron a un grosor de 3 μ m.

Una vez obtenidos los cortes se pusieron en un baño de flotación con grenetina y con un portaobjetos se levantaron, se colocaron en una platina a 58°C para realizar la fijación al portaobjetos y eliminar la parafina

y posteriormente fueron teñidas las laminillas (Armed Forces Institute of Pathology, 1994).

12.6 Tinción de las laminillas

La tinción del corte permite estudiar y conocer las características físicas de los tejidos y las relaciones entre las células que los constituyen, la utilidad de este método se debe a que los tejidos muestran afinidad diferente por los colorantes. La hematoxilina tiñe las estructuras finas del núcleo y la eosina permite distinguir los detalles del citoplasma de las células (Lynch et al; 1977). La hematoxilina es un colorante natural que al ser combinado con sales de aluminio tienen propiedades excelentes para teñir al núcleo, por el contrario la eosina es el colorante que se emplea para teñir las estructuras citoplasmáticas, este colorante se puede usar en base acuosa o alcohólica. La combinación de la hematoxilina con la eosina es una reacción de afinidad ácido-base respectivamente; es decir la hematoxilina es de naturaleza básica con afinidad nuclear y la eosina es de naturaleza acidofílica con afinidad por el citoplasma. La tinción de Hematoxilina de Harris es una tinción nuclear muy utilizada en histología y citología INECC, (2009).

El tren de tinción que se utilizó es el siguiente: 3 pases de 10 inmersiones de xilol, 10 inmersiones de alcohol absoluto, 10 inmersiones de alcohol al 80%, 10 inmersiones de alcohol al 70%, 10 inmersiones de alcohol al 50%, 10 inmersiones en agua destilada, 2 minutos en hematoxilina, 1 enjuague en agua corriente, 1 inmersión en alcohol ácido, 1 enjuague en agua corriente una inmersión en agua amoniacal al 5% hasta que torne en color gris intenso, 1 enjuague en agua corriente; 10 inmersiones en alcohol absoluto, 2 minutos en eosina, 10 inmersiones en alcohol al 96%, 10 inmersiones en alcohol al 96%, 10 inmersiones en alcohol absoluto, y 3 pases de 10 inmersiones en xilol. terminado este tiempo se hizo el montaje de las laminillas con medio de montaje Etellan Nuevo (Armed Forces Institute of Pathology, 1994).

12.7 Histología de hígado y riñón

Se utilizaron 45 preparaciones histológicas de riñón e hígado en las cuales se seleccionaron de manera aleatoria 10 campos por laminilla en el objetivo de 40x, evaluando congestión, tumefacción celular y lipidosis estadificándolas en grado de severidad leve, moderado o severa según

fuera el caso y determinando los patrones de distribución de las lesiones como focal, multifocal, zonal o difuso; además de evaluar otras lesiones estructurales, degenerativas e inflamatorias.

En el caso de riñón las variables que se evaluaron fueron congestión y tubulonefrosis del mismo modo que con el hígado se estadificó el grado de lesión en leve, moderada o severo y con sus patrones de distribución focal, multifocal, zonal o difuso; además de posibles cambios como la presencia o ausencia de lesiones estructurales degenerativas y/o inflamatorias, además de compararlas con los tejidos de los individuos control.

12.8 Bioquímica sanguínea

La bioquímica clínica es una rama del laboratorio en la que se usan métodos químicos y bioquímicos para el estudio de las enfermedades, en la práctica es exclusivamente utilizada en estudios de sangre, orina y otros fluidos biológicos y se utiliza para el diagnóstico de enfermedades y en los ensayos vinculados a la investigación de nuevos fármacos, los resultados de estas pruebas usualmente se comparan con un intervalo de referencia que representa el estado saludable de los animales, no obstante siempre se debe tener en consideración el sexo, edad, dieta, estrés, ansiedad, ejercicio, historia médica, hora de extracción de la muestra de los individuos, según la guía de laboratorio de bioquímica clínica, 2015.

El suero que se utilizó para el análisis de la bioquímica sanguínea fue previamente descongelado y verificado para saber que se encontraba en condiciones idóneas, es decir que no presentara hemólisis, lipemia, o ictericia las cuales interfirieran en las determinaciones espectrofotométricas.

La obtención del análisis de bioquímica sanguínea se hizo con el aparato VetScan VS2® fabricado en Estados Unidos, donde se colocaron 100 µl. de suero en un rotor Comprehensive Diagnostic Profile, del cual se extrajeron los datos correspondientes a FAS, ALT, CRE y BUN, este rotor proporciona determinaciones cuantitativas de dichos analitos, mediante la técnica de espectrofotometría.

Fundamento para la determinación de alanina aminotransferasa (ALT)

El método desarrollado para uso en el analizador químico VetScan es una modificación del procedimiento Wróblewski y LaDue. En esta reacción, la

ALT cataliza la transferencia de un grupo amino de la L-alanina al α -cetoglutarato para formar L-glutamato y piruvato. La lactato deshidrogenasa cataliza la conversión de piruvato a lactato. Al mismo tiempo, la NADH se oxida a NAD⁺. El índice de cambio de la diferencia de absorbancia entre 340 nm y 405 nm se debe a la conversión de NADH en NAD⁺ y es directamente proporcional a la cantidad de ALT en la muestra según Perfil VetScan® Prep II 2006.

Fundamento para la determinación de fosfatasa alcalina sérica (FAS)

El procedimiento VetScan para la fosfatasa alcalina hidroliza al *p*-NPP en un tampón con ión metálico y forma *p*-nitrofenol y fosfato. El uso de *p*-nitrofenil fosfato (*p*-NPP) aumenta la velocidad de la reacción. La fiabilidad de esta técnica aumenta significativamente con el uso de un tampón con ión metálico para mantener la concentración de iones magnesio y zinc en la reacción. La cantidad de FAS en la muestra es proporcional al índice de aumento de la diferencia de absorbancia entre 405 nm y 500 nm según Perfil VetScan® Prep II 2006.

Fundamento para la determinación de creatinina (CRE)

El método Jaffe, presentado en 1886, sigue siendo el método usado con mayor frecuencia para la determinación de los niveles de creatinina en la sangre. El método de referencia actual combina el uso de tierra de Fuller (floridina) con la técnica de Jaffe para aumentar la especificidad de la reacción. Se desarrollaron métodos enzimáticos que son más específicos para la creatinina que las distintas modificaciones de la técnica de Jaffe. Los métodos mediante la enzima creatinina amidohidrolasa eliminan el problema de la interferencia de ión amoníaco encontrada en técnicas que utilizan creatinina iminohidrolasa. Se utilizan dos cubetas para determinar la concentración de creatinina en la muestra. La creatina endógena se mide en la cubeta de referencia, que es restada de la creatina endógena combinada y la creatina formada a partir de las reacciones enzimáticas en la cubeta de prueba. Una vez eliminada la creatina endógena de los cálculos, la concentración de creatinina es proporcional a la intensidad del color rojo producido. El criterio de

valoración del fin de la reacción se mide como la diferencia en la absorbancia entre 550 nm y 630 nm según Perfil VetScan® Prep II 2006.

Fundamento para la determinación de nitrógeno ureico (BUN)

El sistema Abaxis utiliza una reacción enzimática acoplada. En esta reacción, la ureasa hidroliza la urea en amoníaco y dióxido de carbono. Al combinarse el amoníaco con 2-oxoglutarato y nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH), la enzima glutamato deshidrogenasa (GLDH) oxida la NADH en NAD+. El índice de cambio de la diferencia de absorbancia entre 340 nm y 405 nm se debe a la conversión de NADH en NAD+ y es directamente proporcional a la cantidad de urea en la muestra según Perfil VetScan® Prep II 2006. Los valores de referencia se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Intervalos de referencia en ratas según VetScan® Prep II 2006.

| | Ratas | |
|--------------------------------------|--------------|-------------------|
| Fosfatasa Alcalina Sérica | FAS | 16.0 – 30,0 U/L |
| Alanina Aminotransferasa | ALT | 20.0 – 61.0 U/L |
| Nitrógeno ureico | BUN | 9.0 – 21.0 mg/dl |
| Creatinina | CRE | 0.05 – 0.65 mg/dl |

12.9 Fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación, electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Una vez que una molécula llega al nivel vibracional más bajo de un estado excitado, sufre un proceso de que regrese a uno de varios niveles de energía vibracionales/rotacionales del estado. En este proceso radiativo llamado fluorescencia, el electrón en el orbital antienlazante hace un salto cuántico de regreso al orbital enlazante, emitiendo el fotón de luz (Martínez y Moctezuma, 2006).

El coumestrol es una sustancia que autofluoresce, la cual se excita con una longitud de onda de 400 nm, y emite su fluorescencia con una longitud de onda que varía de 532 a 559 nm. Se observaron laminillas con cortes de hígado y riñón de los tratamientos (control y quitosán-coumestrol de 800 µg) en un microscopio confocal para detectar la intensidad de fluorescencia, se tomaron fotografías, las cuales fueron analizadas con la ayuda del programa LSM 5 Carl Zeiss.

12.10 Diseño experimental

A continuación en el cuadro 3 se muestra la secuencia que se siguió en cuanto a los procedimientos de eutanasia de los animales; sacrificando 3 animales de grupo control por semana, 3 animales más del grupo tratado con el implante de quitosán-coumestrol de 800 µg y finalmente 3 animales más del grupo tratado con el implante de quitosán-coumestrol de 1600 µg, comenzando en la semana 5 y terminando en la semana 9.

Cuadro 3. Diseño experimental

| | | | | |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Control | Control | Control | Control | Control |
| Control | Control | Control | Control | Control |
| Control | Control | Control | Control | Control |
| Tx implante (C-Q) 800 µg | Tx implante (C-Q) 800 µg | Tx implante (C-Q) 800 µg | Tx implante (C-Q) 800 µg | Tx implante (C-Q) 800 µg |
| Tx implante (C-Q) 800 µg | Tx implante (C-Q) 800 µg | Tx implante (C-Q) 800 µg | Tx implante (C-Q) 800 µg | Tx implante (C-Q) 800 µg |
| Tx implante (C-Q) 800 µg | Tx implante (C-Q) 800 µg | Tx implante (C-Q) 800 µg | Tx implante (C-Q) 800 µg | Tx implante (C-Q) 800 µg |
| Tx implante (C-Q) 1600 µg | Tx implante (C-Q) 1600 µg | Tx implante (C-Q) 1600 µg | Tx implante (C-Q) 1600 µg | Tx implante (C-Q) 1600 µg |
| Tx implante (C-Q) 1600 µg | Tx implante (C-Q) 1600 µg | Tx implante (C-Q) 1600 µg | Tx implante (C-Q) 1600 µg | Tx implante (C-Q) 1600 µg |
| Tx implante (C-Q) 1600 µg | Tx implante (C-Q) 1600 µg | Tx implante (C-Q) 1600 µg | Tx implante (C-Q) 1600 µg | Tx implante (C-Q) 1600 µg |

12.11 Análisis estadístico

Después de verificar la no normalidad de los datos con la prueba de Shapiro Wilk, los resultados de la bioquímica sanguínea fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis; en el caso de la fluorescencia se realizó la prueba de Mann-Whitney; para el caso de la histopatología del hígado y riñón se ordenaron las bases de datos del menor al mayor valor en cada una de las variables, se calcularon los percentiles 25, 50 y 75, además se calculó la frecuencia de aparición de cada una de las alteraciones y para cada una de ellas se calculó el intervalo de confianza al 95% (IC95), lo que permite conocer el rango donde se encuentra el valor real de la frecuencia con un 95% de certeza.

Se consideró estadísticamente significativo una $p < 0.05$.

13. Resultados

13.1 Bioquímica sanguínea

13.1.1 Fosfatasa Alcalina (FAS)

Durante las cuantificaciones séricas de FAS en la semana 5 el grupo control presentó una media de 192.8 ± 20.15 U/L, en el grupo tratamiento de 800 μg . la media fue de 157.0 ± 25.35 U/L, el grupo tratado con 1600 μg obtuvo una media de 133.5 ± 30.55 U/L; comparando estos resultados con una prueba de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.47$, lo cual nos indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados.

Para la semana 6 las medias de determinación sérica de esta misma enzima fueron: grupo control 192.8 ± 20.15 U/L, tratamiento de 800 μg 155.3 ± 28.7 U/L, tratamiento de 1600 μg 96.0 ± 23 . U/L; con el estadístico de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.067$, lo cual nos dice que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados.

Para la semana 7 las medias de determinación sérica fueron: grupo control 192.8 ± 20.15 U/L, tratamiento de $800 \mu\text{g}$ 269.7 ± 28.6 U/L, tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ 208.5 ± 19.8 U/L; mediante el estadístico de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.16$, lo cual nos dice que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados.

En el caso de la semana 8 las medias de determinación sérica fueron: grupo control 192.8 ± 20.15 U/L, tratamiento de $800 \mu\text{g}$ 153.5 ± 22.95 U/L, tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ 194.7 ± 6.35 U/L; con el estadístico de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.31$, lo cual indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados.

Finalmente en la semana 9 las medias de determinación sérica fueron: grupo control 192.8 ± 20.15 U/L, tratamiento de $800 \mu\text{g}$ 219.5 ± 19.6 U/L, tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ 137.8 ± 22.75 U/L; con el estadístico de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.07$, lo cual nos dice que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados. En el cuadro 4 se muestran los resultados por semana de la Fosfatasa Alcalina (FAS).

Cuadro 4.- Resultados de la Fosfatasa Alcalina (FAS) por semana.

| Parámetro: | Valores normales | Semana 5 | | | Semana 6 | | | Semana 7 | | | Semana 8 | | | Semana 9 | | |
|------------------------------|------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| | | Control | TX 800 μg | TX 1600 μg | Control | TX 800 μg | TX 1600 μg | Control | TX 800 μg | TX 1600 μg | Control | TX 800 μg | TX 1600 μg | Control | TX 800 μg | TX 1600 μg |
| Fosfatasa alcalina FAS (U/L) | 16.0 302.0 | 192.8 ± 20.1 | 157.0 ± 25.3 | 123.5 ± 30.5 | 192.8 ± 20.1 | 155.3 ± 28.7 | 96.0 ± 23.0 | 192.8 ± 20.1 | 269.7 ± 28.6 | 208.5 ± 19.8 | 192.8 ± 20.1 | 153.5 ± 22.95 | 194.7 ± 6.35 | 192.8 ± 20.1 | 219.5 ± 19.6 | 137.8 ± 22.75 |
| | | P= 0.47 | | | P= 0.067 | | | P= 0.16 | | | P= 0.31 | | | P= 0.07 | | |

13.1.2 Alaninoaminotransferasa (ALT)

En el caso de la enzima alaninoaminotransferasa (ALT) durante la semana 5 las medias de determinación sérica fueron: grupo control 33.0 ± 8 U/L, tratamiento de $800 \mu\text{g}$ 31.8 ± 4.85 U/L, tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ 26.0 ± 4.1 U/L; con el estadístico de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.59$, lo que nos indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados.

Para la semana 6 las medias de determinación sérica de esta enzima fueron: grupo control de 33.0 ± 8 U/L, tratamiento de $800 \mu\text{g}$ 34.7 ± 3.25 U/L,

tratamiento de 1600 µg 27.8 ± 3.95 U/L; con el estadístico de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.67$, lo que nos indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados.

Para la semana 7 las medias de determinación sérica de ALT fueron: grupo control 33.0 ± 8 U/L, tratamiento de 800 µg 48.7 ± 5.0 U/L, tratamiento de 1600 µg 46.3 ± 2.25 U/L; con el estadístico de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.30$, lo que nos indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados.

En la semana 8 las medias de determinación sérica fueron: grupo control 33.0 ± 8 U/L, tratamiento de 800 µg 39 ± 3.55 U/L, tratamiento de 1600 µg 22 ± 2.3 U/L; con el estadístico de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.39$, lo que nos indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados.

Por último en la semana 9 las medias de determinación sérica fueron: grupo control 33.0 ± 8 U/L, tratamiento de 800 µg 44 ± 5.35 U/L, tratamiento de 1600 µg 32.3 ± 5.8 U/L; con el estadístico de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.47$, lo que nos indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados. En el cuadro 5 se muestran los resultados por semana de la enzima Alanino Aminotransferasa (ALT).

Cuadro 5.- Resultados de la Alanino Aminotransferasa (ALT) por semana.

| Parámetros | Valores normales | Semana 5 | | | Semana 6 | | | Semana 7 | | | Semana 8 | | | Semana 9 | | |
|------------------------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | | Control | TX 800 µg | TX 1600 µg | Control | TX 800 µg | TX 1600 µg | Control | TX 800 µg | TX 1600 µg | Control | TX 800 µg | TX 1600 µg | Control | TX 800 µg | TX 1600 µg |
| Alanino aminotransferasa ALT (U/L) | 20.0 - 61.0 | 33.0 ± 8.0 | 31.8 ± 4.85 | 26.0 ± 4.1 | 33.0 ± 8.0 | 34.7 ± 3.25 | 27.8 ± 3.95 | 33.0 ± 8.0 | 48.7 ± 5.0 | 46.3 ± 2.25 | 33.0 ± 8.0 | 39.0 ± 3.55 | 22.0 ± 2.3 | 33.0 ± 8.0 | 44.0 ± 5.35 | 32.3 ± 5.8 |
| | | $P=0.59$ | | | $P=0.67$ | | | $P=0.30$ | | | $P=0.39$ | | | $P=0.47$ | | |

13.1.3 Nitrógeno ureico (BUN)

Los resultados obtenidos para nitrógeno ureico, en el caso de la semana 5 las medias de determinación sérica fueron: grupo control 7.1 ± 0.55 mmol/L, tratamiento de 800 µg 5.8 ± 0.65 mmol/L, tratamiento de 1600 µg 6.1 ± 1.2 mmol/L, con el estadístico de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.21$, lo que sugiere que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo

control y los dos grupos tratados con la combinación de Quitosán-Coumestrol.

En la semana 6 las medias de determinación sérica fueron: grupo control 7.1 ± 0.55 mmol/L, tratamiento de 800 μg 6.4 ± 0.9 mmol/L, tratamiento de 1600 μg la media obtenida fue de 5.6 ± 1.2 mmol/L, el estadístico de Kruskal Wallis obtuvo una $p=0.56$, lo que sugiere que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados con la combinación de Quitosán-Coumestrol.

Para la semana 7 las medias de determinación sérica fueron: grupo control 7.1 ± 0.55 mmol/L, tratamiento de 800 μg 7.5 ± 0.4 mmol/L, tratamiento de 1600 μg 6.8 ± 0.4 mmol/L, el estadístico de Kruskal Wallis obtuvo una $p=0.51$, lo que sugiere que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados con la combinación de Quitosán-Coumestrol.

Durante la semana 8 las medias de determinación sérica fueron: grupo control 7.1 ± 0.55 mmol/L, tratamiento de 800 μg 5.3 ± 0.7 mmol/L, tratamiento de 1600 μg 7.1 ± 0.35 mmol/L, el estadístico de Kruskal Wallis obtuvo una $p=0.10$, lo que indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados con la combinación de Quitosán-Coumestrol.

Finalmente en la semana 9 las medias de determinación sérica fueron: grupo control 7.1 ± 0.55 mmol/L, tratamiento de 800 μg 7.6 ± 0.55 mmol/L, tratamiento de 1600 μg 6.1 ± 1.1 mmol/L, el estadístico de Kruskal Wallis obtuvo una $p=0.43$, lo que sugiere que no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y los dos grupos tratados con la combinación de Quitosán-Coumestrol. En el cuadro 6 se muestran los resultados por semana del Nitrógeno ureico (BUN).

Cuadro 6.- Resultados de Nitrógeno ureico (BUN) por semana.

| Parámetros | Valores normales | Semana 5 | | | Semana 6 | | | Semana 7 | | | Semana 8 | | | Semana 9 | | |
|-------------------------------|------------------|---------------|----------------------|-----------------------|---------------|----------------------|-----------------------|---------------|----------------------|-----------------------|---------------|----------------------|-----------------------|---------------|----------------------|-----------------------|
| | | Control | IX 800 μg | IX 1600 μg | Control | IX 800 μg | IX 1600 μg | Control | IX 800 μg | IX 1600 μg | Control | IX 800 μg | IX 1600 μg | Control | IX 800 μg | IX 1600 μg |
| Nitrógeno ureico BUN (mmol/L) | 3.213. 7.479 | 7.1 ± 0.5 | 5.8 ± 0.65 | 6.1 ± 1.2 | 7.1 ± 0.5 | 6.4 ± 0.9 | 5.6 ± 1.2 | 7.1 ± 0.5 | 7.5 ± 0.4 | 6.8 ± 0.4 | 7.1 ± 0.5 | 5.3 ± 0.7 | 7.1 ± 0.35 | 7.1 ± 0.5 | 7.6 ± 0.55 | 6.1 ± 1.1 |
| | | P=0.21 | | | P=0.56 | | | P=0.51 | | | P=0.10 | | | P=0.43 | | |

13.1.4 Creatinina (CRE)

Para la creatinina los resultados obtenidos en la semana 5 de las medias de determinación sérica fueron: grupo control $33 \pm 4.75 \mu\text{mol/L}$, tratamiento de $800 \mu\text{g}$ $21.3 \pm 1.4 \mu\text{mol/L}$, tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ $29.5 \pm 5.7 \mu\text{mol/L}$, con la prueba estadística de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.16$, observándose así que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Durante la semana 6 las medias de determinación sérica fueron: grupo control $33 \pm 4.75 \mu\text{mol/L}$, tratamiento de $800 \mu\text{g}$ $28.3 \pm 2.25 \mu\text{mol/L}$, tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ $33.5 \pm 5.9 \mu\text{mol/L}$, con la prueba estadística de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.91$, observándose así que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

En la semana 7 las medias de determinación sérica fueron: grupo control $33 \pm 4.75 \mu\text{mol/L}$, tratamiento de $800 \mu\text{g}$ $29.7 \pm 9.25 \mu\text{mol/L}$, tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ $18 \pm 0 \mu\text{mol/L}$, con la prueba estadística de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.094$, observándose así que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

La semana 8 las medias de determinación sérica fueron: grupo control $33 \pm 4.75 \mu\text{mol/L}$, tratamiento de $800 \mu\text{g}$ $34.0 \pm 3.6 \mu\text{mol/L}$, tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ $19.3 \pm 1.15 \mu\text{mol/L}$, con la prueba estadística de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.057$, observándose así que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Finalmente en la semana 9 las medias de determinación sérica fueron: grupo control $33 \pm 4.75 \mu\text{mol/L}$, tratamiento de $800 \mu\text{g}$ $27.7 \pm 8.35 \mu\text{mol/L}$, tratamiento de $1600 \mu\text{g}$ $41.3 \pm 9.3 \mu\text{mol/L}$, con la prueba estadística de Kruskal Wallis se obtuvo una $p=0.38$, observándose así que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. En el cuadro 7 se muestran los resultados por semana de la creatinina (CRE).

Cuadro 7.- Resultados de Creatinina (CRE) por semana.

| Parámetros | Valores normales | Semana 5 | | | Semana 6 | | | Semana 7 | | | Semana 8 | | | Semana 9 | | |
|-------------------------|------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | | Control | TX 800 | TX 1600 | Control | TX 800 | TX 1600 | Control | TX 800 | TX 1600 | Control | TX 800 | TX 1600 | Control | TX 800 | TX 1600 |
| | | | µg | µg | | µg | µg | | µg | µg | | µg | µg | | µg | µg |
| Creatinina CRF (µmol l) | 4.42 - 57.46 | 33.0 ± 4.8 | 21.3 ± 1.4 | 29.5 ± 5.7 | 33.0 ± 4.8 | 28.3 ± 2.25 | 33.5 ± 5.9 | 33.0 ± 4.8 | 29.7 ± 9.25 | 18.0 ± 0.0 | 33.0 ± 4.8 | 34.0 ± 3.6 | 19.3 ± 1.15 | 33.0 ± 4.8 | 27.7 ± 8.35 | 41.3 ± 9.3 |
| | | P= 0.16 | | | P= 0.91 | | | P= 0.094 | | | P= 0.057 | | | P= 0.38 | | |

13.2 Fluorescencia

Los resultados de la intensidad de la fluorescencia nos indican lo siguiente:

En el caso de riñón se midió la intensidad de la fluorescencia expresada en pixeles de las muestras del grupo tratamiento obteniendo una media de 36.33 ± 2.57 pixeles, mientras que en el grupo control se obtuvo una media de 14.70 ± 1.21 pixeles, como se muestra en la Figura 2.

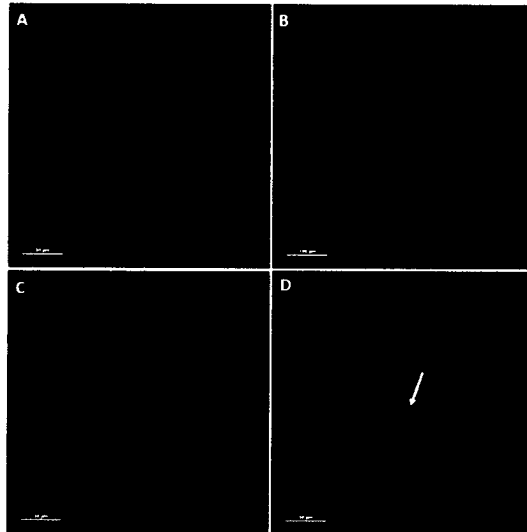
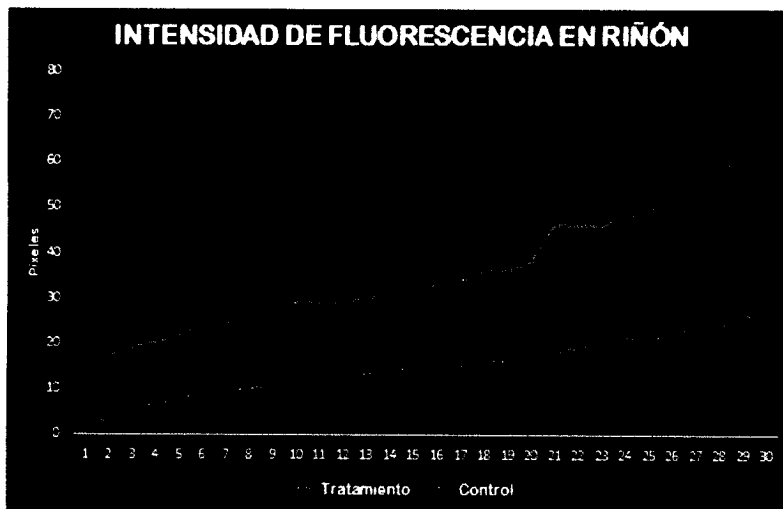


Figura 2. Intensidad de fluorescencia. A) Riñón de los animales sin tratamiento. B) Riñón animales con tratamiento. C) Hígado animales sin tratamiento. D) Hígado animales con tratamiento, la flecha indica señal fluorescente a nivel del espacio porta (arteria hepática, vena porta y canal biliar).

Se realizó un análisis estadístico de Mann-Whitney encontrando diferencia significativa entre ambos grupos $p < 0.001$, esto también puede observarse en la Gráfica 1.

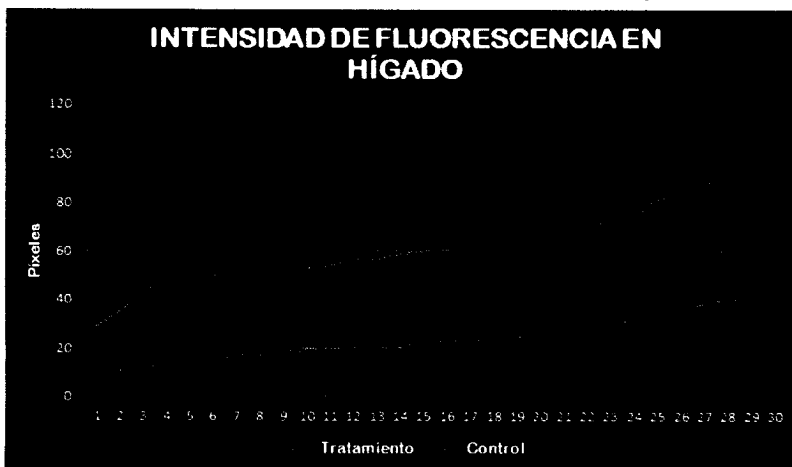
Gráfica 1. Intensidad de fluorescencia en riñón.



Para el caso de la fluorescencia del hígado se midió también la intensidad de píxeles de las muestras con tratamiento obteniendo una media de 62.83 ± 23.96 píxeles, para el grupo de animales control se obtuvo una media de 3.06 ± 1.78 píxeles, tal como se muestra en la Figura 2.

En el análisis estadístico de Mann Whitney este tuvo una $p < 0.001$, por lo tanto existe una diferencia significativa entre el grupo control y el tratamiento, como se muestra en la Gráfica 2.

Gráfica 2. Intensidad de fluorescencia en hígado.



13.3 Evaluación histopatológica de hígado y riñón

Los resultados histopatológicos de hígado fueron los siguientes: para los individuos de la semana 5.

Del total de laminillas evaluadas en el grupo control estas muestran un 33% de congestión leve multifocal, del mismo modo presenta un 67.77% de tumefacción leve difusa, 0% de lipidosis y 0% de alteraciones en los conductos biliares.

En el tratamiento de 800 μg se muestra congestión leve multifocal en el 100% de las muestras; un 67% de las muestras presentaron tumefacción leve difusa y un 33% tumefacción moderada difusa. Durante la evaluación de la lipidosis hepática un 33% de las muestras presentaron lipidosis de gota gruesa leve multifocal, sin presentar alteraciones patológicas aparentes en los conductos biliares.

En el caso del tratamiento de 1600 μg muestra el 33% de congestión leve multifocal; un 100% de tumefacción celular moderada difusa y un 33% lipidosis de gota gruesa leve multifocal, sin presentar alteraciones patológicas aparentes en los conductos biliares.

En la semana 6 los resultados obtenidos por la histología son los siguientes para el grupo control se encontró 33% de congestión leve multifocal 33%;

33% de tumefacción celular leve difusa, 0% de lipidosis y 0% de alteraciones en los conductos biliares.

El tratamiento de 800 µg tuvo una congestión leve multifocal del 100%; 33% de tumefacción celular leve difusa y un 67% de tumefacción celular moderada difusa, por último un 33% de lipidosis de gota gruesa leve multifocal sin presentar alteraciones patológicas aparentes en los conductos biliares.

El tratamiento de 1600 µg mostró una congestión leve multifocal del 33%; 67% de tumefacción celular leve difusa y un 33% de tumefacción celular moderada difusa; se obtuvieron valores del 67% de Lipidosis de gota gruesa leve multifocal sin presentar alteraciones patológicas aparentes en los conductos biliares.

La semana 7 presentó en el grupo control 0% de congestión, 67% de tumefacción celular leve difusa, 0% de lipidosis y un 0% de alteraciones en los conductos biliares.

El tratamiento de 800 µg tuvo un 33% de congestión leve multifocal; un 67% de tumefacción celular leve difusa y un 33% de tumefacción celular moderada difusa, un 0% de lipidosis y 0% de alteraciones en los conductos biliares.

El tratamiento de 1600 µg tuvo un 100% de congestión leve multifocal; un 67% de tumefacción celular leve difusa y un 33% de tumefacción celular moderada difusa y un 67% de lipidosis de gota gruesa leve multifocal y finalmente el 0% de alteraciones en los conductos biliares.

La semana 8 obtuvo los siguientes porcentajes: el grupo control obtuvo el 0% en congestión, mientras que el 67% presentó tumefacción celular leve difusa, 0% de Lipidosis y 0% de alteraciones en los conductos biliares.

El tratamiento de 800 µg tuvo un 67% de congestión leve multifocal; un 33% de tumefacción celular leve difusa y un 67% de tumefacción celular moderada difusa; 33% de lipidosis de gota gruesa leve multifocal y 0% de alteraciones en sus conductos biliares.

El tratamiento de 1600 µg mostró un 33% de congestión leve multifocal y 33% de congestión moderada multifocal; en cuanto a la tumefacción celular

33% leve difusa y 67% moderada difusa, 0% de lipidosis y 0% de alteraciones en los conductos biliares.

Finalmente la semana 9 registró los siguientes porcentajes: para el grupo control una congestión del 33% leve multifocal, tumefacción celular leve difusa; 0% de lipidosis y 0% de alteraciones en los conductos biliares.

El tratamiento de 800 µg tuvo una congestión leve multifocal del 33%; 67% de tumefacción celular leve difusa y 33% de tumefacción celular moderada difusa; 33% de lipidosis leve de gota gruesa multifocal y por último 0% de alteraciones en los conductos biliares.

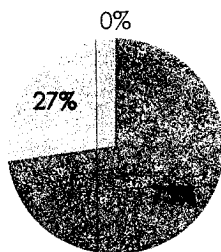
Finalmente el tratamiento de 1600 µg obtuvo un 67% de congestión moderada multifocal; 67% de tumefacción celular leve difusa y 33% de tumefacción celular moderada difusa; 0% de lipidosis y 0% de alteraciones en los conductos biliares.

En ninguna de las muestras de histología hepática tanto en los controles como en los tratamientos administrados a diferentes concentraciones con la combinación de quitosán-coumestrol se encontraron alteraciones estructurales degenerativas o inflamatorias.

Gráfica 3. Congestión en hígado con tratamiento de 1600 µg

Congestión hígado 1600 µg

● leve ● moderada ● severa

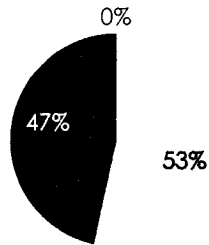


Gráfica 3. Resultados de la histología de hígado con congestión en el grupo con tratamiento quitosán-coumestrol con dosis de 1600 µg durante todo el tratamiento.

Gráfica 4. Tumefacción en hígado con tratamiento de 800 µg.

Tumefacción hígado 800 µg

leve ■ moderada ■ severa

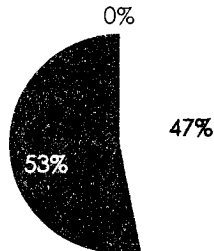


Gráfica 4. Resultados de la histología de hígado con tumefacción en el grupo con tratamiento quitosán-coumestrol con dosis de 800 µg durante todo el tratamiento.

Gráfica 5. Tumefacción en hígado con tratamiento de 1600 µg.

Tumefacción hígado 1600 µg

leve ■ moderada ■ severa



Gráfica 5. Resultados de la histología de hígado con tumefacción en el grupo con tratamiento quitosán-coumestrol con dosis de 1600 µg durante todo el tratamiento.

En los cuadros 8, 9, 10, 11 y 12 se muestran los estadísticos de la histología de hígado de los tres tratamientos, específicamente congestión, tumefacción y lipidosis.

Cuadro 8.- Resultados estadísticos de la histología de Hígado con congestión leve de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg).

| Hígado congestión leve | | | |
|------------------------|------------|---------------------|------------|
| | | % | |
| | Control | 800µg | 1600µg |
| Frecuencia ± IC95 | 13.2 ± 6.6 | 60 ± 9.6 | 53.2 ± 9.8 |
| Error estándar | 8 | 12.6 | 20 |
| Percentil 25 | 0 | 33 | 16.5 |
| Percentil 50 | 0 | 67 | 33 |
| Percentil 75 | 33 | 83 | 100 |
| Chi ² | H=4.805 | H. Corregida= 5.276 | |
| P | | >0.05 | |

Cuadro 9.- Resultados estadísticos de la histología de Hígado con congestión moderada de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg).

| Hígado congestión moderada | | | |
|----------------------------|---------|---------------------|----------|
| | | % | |
| | Control | 800µg | 1600µg |
| Frecuencia ± IC95 | 0 | 0 | 20 ± 7.8 |
| Error estándar | 0 | 0 | 13.3 |
| Percentil 25 | 0 | 0 | 0 |
| Percentil 50 | 0 | 0 | 0 |
| Percentil 75 | 0 | 0 | 50 |
| Chi ² | H=1.5 | H. Corregida= 4.286 | |
| P | | >0.05 | |

Cuadro 10.- Resultados estadísticos de la histología de Hígado con tumefacción leve de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg).

| Hígado tumefacción leve | | | |
|-------------------------|------------|---------------------|------------|
| | | % | |
| | Control | 800µg | 1600µg |
| Frecuencia ± IC95 | 73.2 ± 8.7 | 53.4 ± 9.8 | 46.8 ± 9.8 |
| Error estándar | 16 | 8 | 13 |
| Percentil 25 | 33 | 33 | 16.5 |
| Percentil 50 | 100 | 67 | 67 |
| Percentil 75 | 100 | 67 | 67 |
| Chi ² | H=1.545 | H. Corregida= 1.727 | |
| P | | >0.05 | |

Cuadro 11.- Resultados estadísticos de la histología de Hígado con tumefacción moderada de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg).

| Hígado tumefacción moderada | | | |
|-----------------------------|---------|--------------------|------------|
| | | % | |
| | Control | 800µg* | 1600µg* |
| Frecuencia ± IC95 | 0 | 46.6 ± 9.8 | 53.2 ± 9.8 |
| Error estándar | 0 | 8.3 | 13.4 |
| Percentil 25 | 0 | 33 | 33 |
| Percentil 50 | 0 | 33 | 33 |
| Percentil 75 | 0 | 67 | 83.5 |
| Chi ² | H=9.395 | H. Corregida= 10.5 | |
| P | | <0.05 | |

Cuadro 12.- Resultados estadísticos de la histología de Hígado con lipidosis leve de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg).

| | Hígado lipidosis leve | | |
|-------------------|-----------------------|---------------------|------------|
| | Control | % | |
| Frecuencia ± IC95 | 0 | 800µg | 1600µg |
| Error estándar | 0 | 26.4 ± 8.6 | 33.4 ± 9.2 |
| Percentil 25 | 0 | 6.6 | 15 |
| Percentil 50 | 0 | 16.5 | 0 |
| Percentil 75 | 0 | 33 | 33 |
| Chi ² | H=4.595 | H. Corregida= 5.655 | |
| P | | >0.05 | |

Resultados histopatológicos de riñón

Por otra parte el riñón obtuvo los siguientes resultados durante la semana 5 en su evaluación histológica; en el grupo control se obtuvo un 100% de congestión leve multifocal; en cuanto a tubulonefrosis leve multifocal se obtuvo un 67% y 0% de alteraciones a nivel glomerular.

El tratamiento de 800 µg obtuvo los siguientes resultados 33% de congestión leve multifocal y 67% de congestión moderada multifocal; tubulonefrosis leve multifocal del 67% y 0% de alteraciones a nivel glomerular.

El tratamiento de 1600 µg presentó un 67% de congestión moderada multifocal; en el caso de la tubulonefrosis se presentó 33% leve multifocal, 33% tubulonefrosis moderada multifocal y 33% de tubulonefrosis severa multifocal; 0% de alteraciones a nivel glomerular.

En la semana 6 los resultados obtenidos fueron los siguientes para el grupo control se encontró un 67% de congestión leve multifocal; 33% de tubulonefrosis leve multifocal y 0% de alteraciones glomerulares.

En el tratamiento de 800 µg. se obtuvo 100% de congestión leve multifocal; y 67% de tubulonefrosis leve multifocal; 0% de alteraciones glomerulares.

El tratamiento de 1600 µg obtuvo 33% de congestión leve multifocal y 33% de congestión moderada multifocal; 67% de tubulonefrosis leve multifocal y 0% de alteraciones glomerulares.

En la semana 7 los resultados para el control fueron los siguientes: 67% de congestión leve multifocal; 67% de tubulonefrosis leve multifocal y 0% en alteraciones glomerulares.

En el tratamiento de 800 µg el análisis histopatológico mostró 67% de congestión leve multifocal; 67% de tubulonefrosis leve multifocal y 33% moderada multifocal; 0% de alteraciones glomerulares.

El tratamiento de 1600 tuvo 33% de congestión moderada multifocal; 33% de tubulonefrosis moderada multifocal y 0% de alteraciones glomerulares.

La semana 8 tuvo como resultados en el grupo control 33% de congestión leve multifocal; 0% de tubulonefrosis y 0% de alteraciones glomerulares.

El tratamiento de 800 µg mostró 33% de congestión moderada multifocal; 67% de tubulonefrosis leve multifocal y 33% de tubulonefrosis moderada multifocal; 0% de alteraciones glomerulares.

El tratamiento de 1600 µg presentó 67% de congestión leve multifocal; 33% de tubulonefrosis leve multifocal, 33% de tubulonefrosis moderada multifocal y 0% de alteraciones a nivel glomerular.

Finalmente la semana 9 mostró los siguientes resultados histológicos; el grupo control tuvo 100% de congestión leve multifocal; 67% de tubulonefrosis leve multifocal y 0% de alteraciones glomerulares.

El tratamiento de 800 µg tuvo 67% de congestión leve multifocal; 100% de tubulonefrosis leve multifocal y 0% de alteraciones glomerulares.

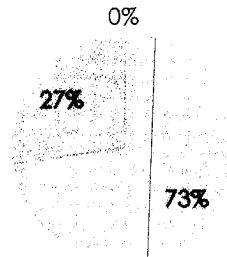
El tratamiento de 1600 µg tuvo 67% de congestión leve multifocal y 33% de congestión moderada multifocal; 33% de tubulonefrosis leve multifocal y 33% de tubulonefrosis moderada multifocal; 0% de alteraciones glomerulares.

Durante la evaluación histopatológica de riñón, ninguna de las muestras de los individuos control ni en los diferentes individuos tratados a distintas concentraciones con la combinación de quitosán-coumestrol presentaron alteraciones inflamatorias.

Gráfica 6. Congestión en riñón con tratamiento de 800 µg.

Riñón congestión 800 µg

leve moderada severa

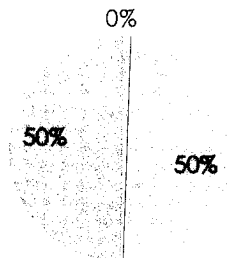


Gráfica 6. Resultados de la histología de riñón con congestión en el grupo con tratamiento quitosán-coumestrol con dosis de 800 µg durante todo el tratamiento.

Gráfica 7. Congestión en riñón con tratamiento de 800 µg

Riñón congestión 1600 µg

leve moderada severa

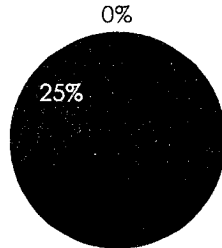


Gráfica 7. Resultados de la histología de riñón con congestión en el grupo con tratamiento quitosán-coumestrol con dosis de 1600 µg durante todo el tratamiento.

Gráfica 8. Tubulonefrosis en riñón con tratamiento de 800 µg

Riñón tubulonefrosis 800 µg

■ leve ■ moderada ■ severa

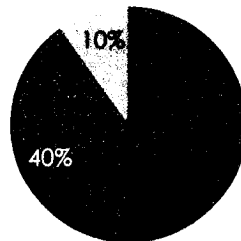


Gráfica 8. Resultados de la histología de riñón con tubulonefrosis en el grupo con tratamiento quitosán-coumestrol con dosis de 800 µg durante todo el tratamiento.

Gráfica 9. Tubulonefrosis en riñón con tratamiento de 1600 µg

Riñón tubulonefrosis 1600 µg

■ leve ■ moderada ■ severa



Gráfica 9. Resultados de la histología de riñón con tubulonefrosis en el grupo con tratamiento quitosán-coumestrol con dosis de 1600 µg durante todo el tratamiento.

En los cuadros 13, 14, 15, 16 y 17 se muestran los estadísticos de la histología de riñón de los tres tratamientos, específicamente congestión y tubulonefrosis.

Cuadro 13.- Resultados estadísticos de la histología de riñón con congestión leve de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg).

| Riñón congestión leve | | | |
|-----------------------|------------|---------------------|------------|
| | % | | |
| | Control | 800µg | 1600µg |
| Frecuencia ± IC95 | 73.4 ± 8.7 | 53.4 ± 9.8 | 33.4 ± 9.2 |
| Error estándar | 12.5084 | 17.04 | 14.98 |
| Percentil 25 | 50 | 0 | 0 |
| Percentil 50 | 67 | 0 | 33 |
| Percentil 75 | 100 | 50 | 67 |
| Chi ² | H=2.88 | H. Corregida= 3.144 | |
| P | | >0.05 | |

Cuadro 14.- Resultados estadísticos de la histología de riñón con congestión moderada de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg).

| Riñón congestión moderada | | | |
|---------------------------|---------|---------------------|------------|
| | % | | |
| | Control | 800µg | 1600µg |
| Frecuencia ± IC95 | 0 | 20 ± 9 | 33.2 ± 8.4 |
| Error estándar | 0 | 13.37 | 10.59 |
| Percentil 25 | 0 | 0 | 16.5 |
| Percentil 50 | 0 | 0 | 33 |
| Percentil 75 | 0 | 50 | 50 |
| Chi ² | H=4.22 | H. Corregida= 5.509 | |
| P | | >0.05 | |

Cuadro 15.- Resultados estadísticos de la histología de riñón con tubulonefrosis leve de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg).

| Riñón tubulonefrosis leve | | | |
|---------------------------|----------|---------------------|------------|
| | % | | |
| | Control | 800µg | 1600µg |
| Frecuencia ± IC95 | 46.8 ± 9 | 60.2 ± 7 | 33.2 ± 8.4 |
| Error estándar | 13.42 | 6.8 | 10.59 |
| Percentil 25 | 16.5 | 50 | 16.5 |
| Percentil 50 | 67 | 67 | 33 |
| Percentil 75 | 67 | 67 | 50 |
| Chi ² | H=2.66 | H. Corregida= 3.274 | |
| P | >0.05 | | |

Cuadro 16.- Resultados estadísticos de la histología de riñón con tubulonefrosis moderada de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg).

| Riñón tubulonefrosis moderada | | | |
|-------------------------------|---------|-------------------|------------|
| | % | | |
| | Control | 800µg | 1600µg |
| Frecuencia ± IC95 | 0 | 19.8 ± 7.6 | 26.4 ± 8.6 |
| Error estándar | 0 | 8.08 | 6.6 |
| Percentil 25 | 0 | 0 | 16.5 |
| Percentil 50 | 0 | 33 | 33 |
| Percentil 75 | 0 | 33 | 33 |
| Chi ² | H=4.875 | H. Corregida= 6.5 | |
| P | >0.05 | | |

Cuadro 17.- Resultados estadísticos de la histología de riñón con tubulonefrosis severa de los tres tratamientos (control, quitosán-coumestrol 800 µg y quitosán-coumestrol 1600 µg).

| Riñón tubulonefrosis severa | | | |
|-----------------------------|---------|----------------|-----------|
| | Control | % | |
| | | 800µg | 1600µg |
| Frecuencia ± IC95 | 0 | 0 | 6.6 ± 4.9 |
| Error estándar | 0 | 0 | 6.6 |
| Percentil 25 | 0 | 0 | 0 |
| Percentil 50 | 0 | 0 | 0 |
| Percentil 75 | 0 | 0 | 16.5 |
| Chi ² | H=0.375 | H. Corregida=2 | |
| P | | >0.05 | |

En lo que respecta a la evaluación histológica en hígado, de manera global la mayoría de los cambios encontrados son leves multifocales tanto en congestión como en lipidosis y en cuanto a la tumefacción celular la mayoría de los cambios fueron clasificados como leves difusos (Figura 3), sin encontrarse lesiones estructurales, degenerativas o inflamatorias, además de no encontrar diferencias significativas entre los animales del grupo control y los tratamientos. Congestión y lipidosis $p > 0.05$ prueba de χ^2 , Tumefacción $p > 0.05$ prueba de Kruskal-Wallis.

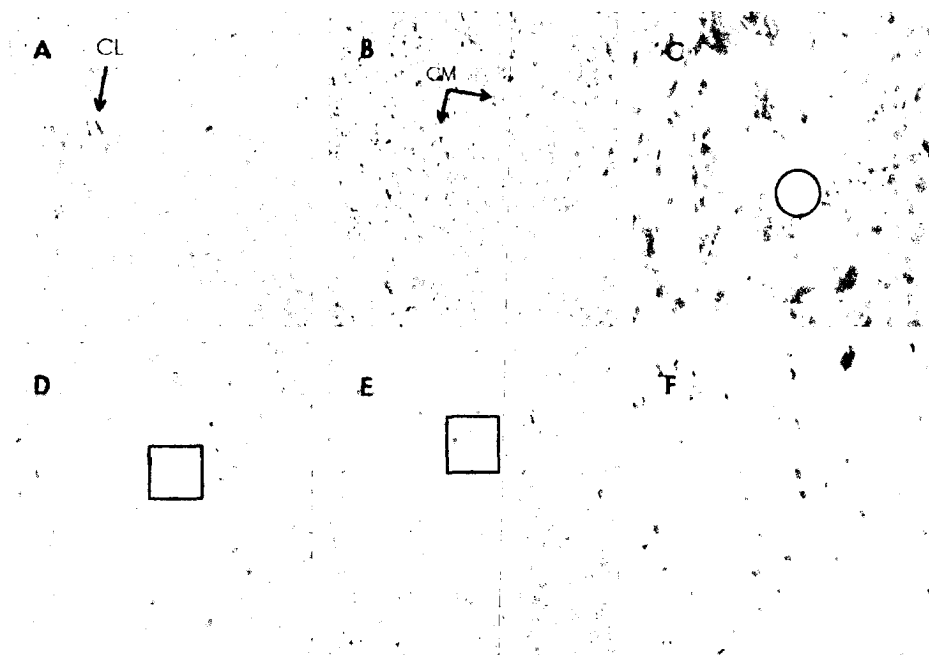


Figura 3. Se muestran microfotografías de hígado con tinción de HE a 100x y 400x de aumento. A) Hígado con congestión leve. B) Hígado con congestión moderada. C) Hígado con lipidosis de gota gruesa. D) Hígado con tumefacción leve. E) Hígado con tumefacción moderada. F) Hígado control.

Los cambios encontrados en la evaluación histológica en riñón en todos los grupos tratados son mayoritariamente leves multifocales tanto en congestión como en tubulonefrosis, encontrándose en algunos animales congestión y tubulonefrosis moderada y un solo animal con tubulonefrosis severa como se muestra en la Figura 4. sin embargo no se determinaron diferencias significativas entre los animales del grupo control y los del grupo tratado $p > 0.05$ prueba de χ^2 .

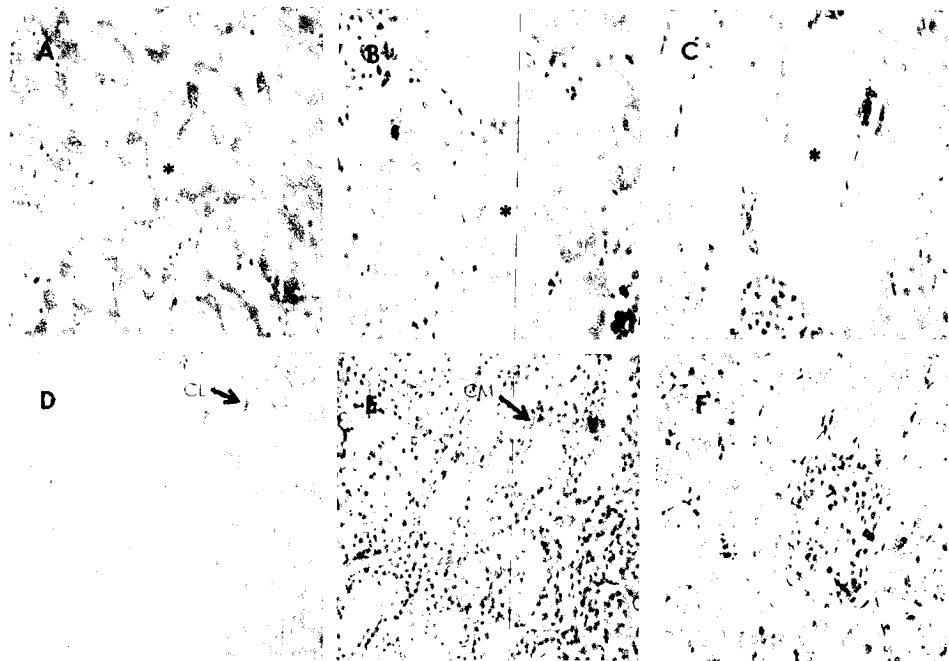


Figura 4. Se muestran microfotografías de riñón con tinción de HE a 100x y 400x de aumento. A) Riñón con tubulonefrosis leve. B) Riñón con tubulonefrosis moderada. C) Riñón con tubulonefrosis severa. D) Riñón con congestión leve. E) Riñón con congestión moderada. F) Riñón control.

14. Discusión

El hígado es el principal órgano implicado en el metabolismo de sustancias ajenas al organismo incluidos los productos de origen vegetal, por lo que hace que sea susceptible a toxicidad por dichas sustancias presentando desde hepatitis aguda o crónica, cuadros de colestasis y lesiones vasculares hasta episodios de insuficiencia hepática aguda; los factores que pueden contribuir a la hepatotoxicidad son los efectos tóxicos de las sustancias del mismo y sus efectos son a menudo crónicos, inespecíficos y clínicamente inaparentes durante tiempo (García-Cortés *et al.*, 2008).

La fosfatasa alcalina es una enzima que hidroliza ésteres de fosfato a pH alcalino, la cual se localiza en la membrana de las células en varios tejidos; no obstante la fosfatasa alcalina del plasma sanguíneo tiene

principalmente las aportaciones del hígado, intestino y hueso. Las isoformas hepáticas son dos, una propia de los hepatocitos y otra de la membrana canalicular biliar, la cual ingresa al torrente sanguíneo a través de la vía paracelular; esta enzima se encuentra elevada en cualquier forma de obstrucción del tracto biliar, colestasis biliar, carcinomas metastásicos en hígado y tejido óseo, trastornos de mala absorción (Sandoval *et al.*, 2005); en esta investigación no se observa incremento estadísticamente significativo de la actividad de la fosfatasa alcalina en ninguno de los dos grupos tratados con respecto al grupo control, lo que demuestra que no existe sobreestimulación de esta enzima que nos pueda indicar un posible daño a nivel de conductos biliares debido al implante con la combinación de quitosán-coumestrol en dosis de 800 µg y 1600 µg durante al menos 9 semanas.

En el caso de la ALT debido a que es una enzima citosólica del hepatocito y su aumento en suero refleja una fuga en la permeabilidad de la membrana es comúnmente asociada con la muerte celular, por lo que la ALT se considera como un marcador fiable y sensible de alguna enfermedad hepática. (Tejos *et.al.*, 2013; Hend, 2015) y dado que la mayoría de las reacciones hepatotóxicas normalmente cursan de una manera asintomática o bien con síntomas no específicos estas pueden descubrirse por medio de la elevación en los niveles de transaminasas (Tejada, 2010); el análisis de la literatura muestra que los valores sugeridos por el VetScan® Prep II 2006, son los ideales en la especie utilizada, por lo cual los valores obtenidos en los dos grupos tratados en esta investigación se encuentran dentro de los parámetros y no presentaron elevaciones estadísticamente significativas, lo cual hace evidente que no existen elementos para suponer que exista una toxicidad hepática al utilizar la combinación de quitosán-coumestrol en dosis de 800 µg y 1600 µg al menos hasta su uso por 9 semanas.

En el caso de los riñones debido a que son órganos de excreción altamente vascularizados, es la principal vía de eliminación de compuestos tanto de origen vegetal como de tipo xenobióticos. La concentración de urea comúnmente reportada como Nitrógeno Ureico Sanguíneo (BUN), es un compuesto nitrogenado que se produce en el ciclo hepático de la urea, estos niveles de BUN se utilizan para evaluar la función renal basada en la capacidad del riñón de remover desechos nitrogenados presentes en la sangre; en animales sanos la urea es filtrada por el glomérulo renal y

es excretada por la orina, sin embargo cuando el riñón no funciona adecuadamente, la urea no se remueve del plasma, aumentando así los niveles de este metabolito (Mutis-Barreto y Pérez Jimenez, 2005); De manera general, los resultados obtenidos en este experimento no muestran incrementos estadísticamente significativos en cuanto a los niveles de BUN. No obstante se presentaron dos episodios en donde se observó un incremento marginal de los niveles de BUN, sin salir de los intervalos de referencia para la especie, las cuales pueden deberse a la exposición a isoflurano al momento de la toma de muestras, ya que este anestésico ocasiona vasodilatación central la cual puede producir hipoperfusión a nivel renal secundaria a hipotensión; histológicamente puede haber una lesión en los túbulos renales (Díaz de León- Ponce *et al.*, 2005).

La función renal se puede medir por la filtración glomerular, la cual se mide mediante el aclaramiento de creatinina, la cual se deriva del metabolismo de la creatina (anhidro de la creatina) producto de la excreción de la actividad muscular y que circula en la sangre; su eliminación es renal por lo que hay una correlación entre su valor y la función renal; en condiciones ideales la excreción de la creatinina es igual a la producción de la misma por lo que la creatinina plasmática varía inversamente con el filtrado glomerular; cuando la creatinina plasmática se eleva el proceso de secreción se satura, mostrando entonces una reducción en el filtrado glomerular (Férrnandez-Fresnedo *et. al.*, 2002; Sandoval *et al.*, 2005); de igual forma que el nitrógeno ureico, la creatinina no mostró ningún tipo de diferencias significativas entre el grupo control y los grupos con tratamiento.

El fenómeno de fluorescencia es dado a través de las moléculas las cuales pueden absorber luz ultravioleta visible para generar un estado de excitación en el cual se van a alterar las interacciones entre los átomos de la molécula; cuando se encuentran en estado excitado las moléculas tienen propiedades diferentes al estado fundamental lo cual da lugar al desarrollo de diversos procesos fotofísicos y fotoquímicos; la fluorescencia es un proceso fotofísico que se define como la propiedad de una molécula para emitir luz cuando es excitada (Hussein, 2015).

El coumestrol es un fitoestrógeno con capacidad de fluorescer al estar unido a su receptor, posee alta afinidad a los sitios de unión a hormonas de los receptores estrogénicos tanto del tipo α como β es ideal para

detectar receptores estrogénicos en las células (Pérez-Rivero *et al.*, 2014) y en los órganos blanco. (De Boer *et al.*, 2004), en este trabajo se observó un aumento en la intensidad de la fluorescencia tanto en riñón como en hígado, entre el grupo control y el tratamiento con la combinación quitosán-coumestrol, lo que sugiere que el coumestrol está llegando a estos órganos y está uniéndose a los receptores estrogénicos presentes en ellos de manera similar a lo que sucede en el testículo de perro donde se ha demostrado por fluorescencia su presencia en el epitelio germinal, asociándolo a la distribución de los receptores estrogénicos (Serrano *et al.*, 2008).

A nivel histológico, a diferencia de algunos xenoestrógenos como el Bisfenol A o medicamentos químicos, los cuales causan daño oxidativo en hígado y riñones la combinación de quitosán-coumestrol a dosis utilizadas de 800 µg y 1600 µg no presenta efectos tóxicos, al no inducir necrosis de hepatocitos ni degeneración grasa del hígado en grados severos, a nivel renal tampoco se encontró infiltración de células mononucleares. A pesar de que el Bisfenol A y el coumestrol se unen a ER se metabolizan en el hígado y son excretados en la orina; en cambio el coumestrol tiene propiedades antioxidantes, lo que favorece la reducción de la expresión de genes relacionados con el estrés, protegiendo así las células del daño oxidativo (Arroyo *et al.*, 2012; Popa *et al.*, 2014; Hae-In Lee *et al.*, 2012). Los hallazgos encontrados a nivel tisular en este trabajo son leves, y de igual intensidad que los encontrados en los animales del grupo control tanto en hígado como en riñón, y pueden deberse al procedimiento de eutanasia realizado en los animales.

La congestión se define como el exceso de sangre que no puede salir de la circulación venosa, en el caso del hígado al haber una congestión leve multifocal en los tratamientos de quitosán-coumestrol no se observaron lesiones celulares severas y tampoco necrosis a diferencia de lo que sucede cuando hay un hígado severamente congestionado donde se observa que las venas centrolobulillares y los sinusoides están distendidos y contienen una gran cantidad de sangre (Trigo y Valero, 2004), el tipo de congestión encontrada entonces sugiere ser aguda pudiendo deberse al proceso de eutanasia que se utilizó en los animales de los tres grupos (Gallardo *et al.*, 2003).

En cuanto a la tumefacción celular en el hígado esta es la degeneración inicial en la que los hepatocitos se hinchan hasta varias veces su tamaño normal, y se hace evidente la formación de gránulos citoplasmáticos, esta patología suele asociarse con infecciones, toxemias o lesiones hipóxicas, se trata de una alteración celular reversible (Lynch, 2007); en el caso de este trabajo se encontró tumefacción celular leve difusa lo cual es un cambio común en los hepatocitos cuando hay deficiencia de oxígeno por congestión como en el caso de los procesos de eutanasia, descartando toxemias debido a que en las determinaciones séricas no existieron indicios de elevación de FAS y ALT.

En el caso de la lipidosis hepática esta es un proceso fisiológico-patológico donde tiende a existir una excesiva acumulación de lípidos en forma de vacuolas en el citoplasma de los hepatocitos, este proceso puede deberse a diversos factores dentro de los que se encuentran: mala absorción, dieta inadecuada con exceso de ácidos grasos poliinsaturados, ingesta de fármacos, disfunción metabólica ya sea hepática o pancreática, estrés oxidativo e inanición, no obstante una moderada acumulación de vacuolas de grasa en hígado puede ser común en algunos animales e incluso en casos relativamente severos no necesariamente se asocia a disfunción y enfermedad (Rubio-Delgado *et al.*, 2002); según Pérez, 2001 la lipidosis puede darse por una descompensación metabólica que se desencadena por el ayuno el cual tiene como consecuencias la acumulación de grasa en forma de esteatosis macrovesicular en el cual el hepatocito contiene una única y gran vacuola de grasa que desplaza al núcleo y que se asocia principalmente a trastornos nutricionales, metabólicos, drogas u obesidad; la otra forma de esteatosis es la llamada microvesicular donde las vacuolas son pequeñas y múltiples, no desplazan al núcleo y se observan generalmente en una gran variedad de condiciones genéticas o adquiridas como el embarazo y en reacciones tóxicas a drogas en los tejidos, en el caso de este trabajo se encontró en algunos animales grados leves de lipidosis de gota gruesa o macrovesicular durante los tratamientos por lo que puede atribuirse a trastornos nutricionales y ayuno.

En la evaluación renal uno de los cambios principales es la túbulonefrosis que se caracteriza por un conjunto de alteraciones tubulares de tipo degenerativo, de esta manera los riñones responden a la pérdida de los túbulos mediante una hipertrofia compensatoria de las nefronas restantes,

dando como resultado que los túbulos afectados se encuentren dilatados; dentro de la túbulonefrosis se encuentra la nefrosis tubular aguda la cual es una condición reversible en la que ocurre degeneración tubular como proceso primario, y es una causa importante de insuficiencia renal aguda, las principales causas son isquemia y nefrotoxinas (Vargas, 2013); en este trabajo se encontró principalmente túbulonefrosis leve multifocal, la cual puede asociarse a isquemia debido a los cambios hemodinámicos generados por las punciones sanguíneas y el proceso de eutanasia, descartando agentes nefrotóxicos al no encontrarse aumento en la creatinina sérica por lo que puede suponerse que la función tubular renal no se ve afectada gracias a agentes protectores de los fitoestrógenos ya que los fitoestrógenos en algunos casos aumentan la tasa de filtración glomerular (Schlottfeldt *et al.*, 2015).

Por otro lado la congestión a nivel renal encontrada en los grupos tratados y control fue de tipo leve multifocal, este tipo de congestión puede ser aguda debido a que se produce un aumento en la cantidad de sangre en el lado venoso del sistema circulatorio causando un impedimento súbito del flujo sanguíneo desde el corazón a los pulmones; el método que se utilizó para eutanasiar a los animales de los tres grupos causa un paro cardio-respiratorio, lo cual podría explicar la presencia de la congestión renal (Gallardo *et al.*, 2003).

En los trabajos desarrollados para el control de poblaciones es fundamental asegurar el bienestar animal, realizando estudios que garanticen la inocuidad de los productos utilizados como mecanismo de anticoncepción durante el tiempo que son empleados, es por ello que este trabajo genera información sobre la inocuidad del uso de la combinación quitosán-coumestrol administrado mediante vía subcutánea sobre la función hepato-renal ya que estos compuestos emprenden un nuevo camino en el desarrollo de métodos de control poblacional incluyendo a la fauna nociva los cuales son indispensables para lograr un bienestar en la salud animal y humana.

15. Conclusiones

Se concluye que la administración de coumestrol a una dosis de 800 µg y 1600 µg por vía subcutánea en ratas, utilizando al quitosán como vehículo alcanza al torrente sanguíneo llegando a nivel hepático y renal, sin producir lesiones patológicas que comprometan la función de éstos órganos hasta por 9 semanas. Es necesario seguir evaluando esta combinación en lo referente a su cinética de distribución y citotoxicidad por más tiempo con la finalidad de descartar cualquier daño que comprometa la salud animal, ya que es importante asegurar el bienestar animal cuando se emplean nuevas técnicas de control de poblaciones.

16. Literatura citada

Adams, N.R. 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of Animal Science* 73(5): 1509-1515.

Álvarez- Martínez H. y Pérez-Campos E. 2005. El paciente con hipertransaminasemia. *Rev Fac Med UNAM* Vol.48 No.2 Marzo-Abril.

Álvarez- Romero J y Medellín. 2005. *Canis lupus*. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. México. D.F.

Armed Forces Institute of Pathology, 1994. *Laboratory Methods in Histotechnology* American Registry of Pathology. Washington D.C.

Arroyo J., Almora Y., Quino M., Raez E., Martínez J., Buendía J., Baca D. y Hañari R. 2012. Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* comparado con silimarina. *An. Fac. Med.* v.73 n.2 Lima abr./jun.

Assinder S., Davis R., Fenwick M. y Glover A. 2007. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. *Reproduction* 133 11-19.

Atanassova, N., C. McKinnell., K.J. Turner., M. Walker., J.S. Fisher., M. Morley., M.R. Millar., N.P. Groome and R.M. Sharpe. 2000. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. *Endocrinology* 141(10): 3898-3907.

Bárcena R., J. A, García, A. C., Padilla-Peña, C.A., MartínezGalisteo, E., Díez-Dapena, J. 2007. Caracterización Cinética de la fosfatasa. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba.

Bottino M. y Lanari C. 2010. Localización extra nuclear de receptores esteroideos y activación de mecanismos no genómicos. *Medicina (Buenos Aires)* 70: 173-184.

Caruncho-Méndez I., Corredoira-Pérez A., Caruncho-Méndez J., Rodríguez-Piñeiro I., Suárez-Rey M. y Santamarina-Pernas G. 2007. Aclaramiento plasmático de creatinina exógena: ¿plasma o suero?. *RECVET*. Vol. II, N° 01-04, Enero-Abril.

Carretero M. 2004. Trastornos del ciclo de la urea Vías metabólicas alternativas. *Actualidad científica, Avances farmacológicos* Vol 23 Núm 9 octubre.

Carrillo P. y Gilli M. 2011. Los efectos que produce la creatina en la performance deportiva. *INVENIO* 14 (26):101-115.

Cendón M. y Holm A. 2012. Abandono de animales de compañía. *Universitat Autònoma de Barcelona. Deontología y Veterinaria legal.*

Chávez A., Colina M., Valbuena A. y López A. 2012. Obtención y caracterización de papel de quitosano. *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 13(2),* Abril.

Dabanch J. 2003. Zoonosis. *Rev Chil Infect* 2003; 20 (Supl 1): 47 – 51.

De Boer T, O'tjens D, Muntendam A, Meulman E, van Oostijen M, Ensing K. 2004. Development and validation of fluorescent receptor assays based on the human recombinant estrogen receptor subtypes FASh and beta. *J Pharm Biomed Anal*; 34: 671-679.

Dehghan M., Martin T. y Dehghanan R. 2005. Antifertility effect of Iranian neem seed alcoholic extract on epididymal sperm of mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 3(2), 83-89.

Della Torre S, Mitro N, Fontana R, Gomaraschi M, Favari E, Recordati C, Lolli F, Quagliarini F, Meda C, Ohlsson C, Crestani M, Uhlenhaut NH, Calabresi L, Maggi A. 2016. An Essential Role for Liver ER α in Coupling Hepatic Metabolism to the Reproductive Cycle. *Cell Rep.*15:360-371.

Díaz de León- Ponce M., Díaz de León-Ponce G., Moreno –Santillán A., González-Díaz J. y Briones-Garduño J. 2005. El riesgo del procedimiento anestésico en la función renal. Revista Mexicana de Anestesiología Volumen 28, No. 4, octubre-diciembre.

Dubey, K., R.M. Rosselli, J. Imthurn, P. Séller, y E.K. Jackson. 2000. Vascular effects of environmental oestrogens: implications for reproductive and vascular health. Hum. Reprod. Update 6:351-363.

Echeverri D. Rodríguez V. 2007. Pancitopenia en un canino ocasionada por la administración de estrógenos para evitar una preñez no deseada. Rev.MVZ Cordoba vol.12 no.2 Córdoba July/Dec.

Fernández E., Fernández E., Moreno I. y Moreno M. 2008. Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico. Medicina & Laboratorio, volumen 14, Números 11-12.

Fernández-Fresnedo G., Francisco A., Rodrigo E., Piñera C., Herráez I., Ruiz J. y Arias M. 2002: Insuficiencia renal «oculta» por valoración de la función renal mediante la creatinina sérica. Nefrología. Vol. XXII. Número 2.

Fernández García M., Rodríguez-felices Y., Gallardo-Escudero A., Mata-Soto C., Planells E., Lisbona F., Alférez M. y López-Aliaga I. 2010. Estudio del metabolismo proteico en una población de jóvenes sanos: factores asociados. Ars Pharm; 51.Suplemento 3: 401-406.

Foley P., Foley J., Levy J and Paik T. 2005. Analysis of the impact of trap-neuter-return programs on populations of feral cats. Scientific Reports: Original Study. JAVMA, Vol 227, No. 11.

Fuentes M., Pérez L., Suárez Y., Soca M., Martínez A. 2006. La zoonosis como Ciencia y su Impacto Social. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET ISSN 1695-7504, Vol. VII, nº 09, Septiembre.

Galván E., Páramo R., Esquivel C. y Valencia J. 1994. Esterilización en el perro por inyección de metilcianoacrilato en la cola del epidídimo. Vet. Méx., 25 (3).

Gallardo C., Paredes E. y Pérez J. 2003. Estudio histopatológico de hígado y riñón de caninos y su relación con las concentraciones de urea, creatinina, proteínas, enzimas (ALT y SAP) en sangre premortem y en humor acuoso a las 0 y 24 horas postmortem. Arch. Med. Vet. XXXV, N° 1.

García-Cortés M., Borraz Y., Lucena M., Peláez G., Salmerón J., Diago M., Martínez-Sierra M., Navarro J., Planas R., Soria M., Bruguera M. y Andrade R. 2008. Hepatotoxicidad secundaria a "productos naturales": análisis de los casos notificados al Registro Español de Hepatotoxicidad. REV ESP ENFERM DIG (Madrid) Vol. 100. N.º 11, pp. 688-695.

García I., Rodríguez E., Camps E. y Gámez M. 2011. Cambios corporales asociados al envejecimiento en ratas Sprague-Dawley. Rev Cubana Aliment Nutr;21(1):4-13.

García Martín M. y Zurita Molina A. 2010. Transaminasas: Valoración y significación clínica. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHP-AEP*. Madrid, España. P 267-275.

Gil, A. D y Samartino, L. 2000. Zoonosis en los sistemas de producción animal en las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. Food and Agriculture Organization Ed. Disponible en: http://www.fao.org/ag/qa/info/resources/es/publications/sector_discuss/P_P_Nr2_Final.pdf

Gómez A., Arias E. y Jiménez C. (2006). Insuficiencia renal crónica. En Tratado de Geriátrica para residentes. (637-646). Sociedad Española de Geriátrica y Gerontología.

González García J. 2007. *Alanina aminotransferasa en Sparus aurata: control de la expresión génica mediante RNAi y de la actividad enzimática por aminooxiacetato*. Memoria para obtener el título de doctor. Univeristat de Barcelona. Facultat de Farmàcia.

González C. y Orrego C. 2013. Aperrados. *Tenencia responsable canina en Santiago*. Tesis para optar al título de Sociología. Universidad Academia de Humanismo Cristiano. Santiago de Chile.

Greenberg M., Lawler D., Zawistowski S., Jöchle W. 2013. Low-dose megestrol acetate revisited: A viable adjunct to surgical sterilization in free roaming cats?. *The Veterinary Journal* 196 304–308.

Guía de laboratorio de bioquímica clínica disponible en. <http://www.fmed.uba.ar/depto/bioqhum/IP%20%2014%20Bioquimica%20Clinica-Sangre%20y%20orina.pdf> (el día 11 marzo de 2015).

Gutierrez C. Estudio morfológico y funcional de un modelo experimental de cirrosis biliar en ratas. Tesis para obtener el grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Madrid, 2011.

Hae-In Lee, Jin-Hwan Lee, Ki-Hun Park, Dipen Sangurdekar y Woo-Suk Chang. 2012. Effect of Soybean Coumestrol on *Bradyrhizobium japonicum* Nodulation Ability, Biofilm Formation, and Transcriptional Profile. *Appl Environ Microbiol.* Apr; 78(8): 2896–2903.

Hend M. 2015. Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. *Tag BMC Complementary and Alternative Medicine* 15:252.

Hernández Y. 2004. *Efecto histológico del coumestrol en próstata de ratas juveniles Wistar*. Tesis para obtener el título de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F.

Høgåsen H., Er C., Di Nardo A y Dalla P. 2013. Free-roaming dog populations: A cost-benefit model for different management options, applied to Abruzzo, *Preventive Veterinary Medicine. Italy.* 112 401–413.

Huang B., Ban X., He J., Zeng H., Zhang P. y Wang Y. 2010. Hepatoprotective and antioxidant effects of the methanolic extract from *Halenia elliptica*. *Journal of Ethnopharmacology* 131 276–281.

Hughes J. y Macdonald D. 2013. A review of the interactions between free-roaming domestic dogs and wildlife. *Biological Conservation* 157 341-351.

Hussein S. Síntesis de perilenodiimidias con aplicación como biomarcadores fluorescentes, 2015. Tesis para obtener el grado en Farmacia. Universitas Miguel Hernández.

IFAI. 2014. Respuesta a consulta de la página del IFAI <http://www.ifai.org.mx/>.

INECC, (2009). Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos. México, p, 22.

INEGI(<http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/habitantes.aspx?tema=P>) consultado el 23 de septiembre de 2013.

Jain A., Soni M., Deb L., Jain A., Rout S., Gupta V. y Krishna K. 2008. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic and aqueous extracts of *Momordica dioica* Roxb. Leaves. Journal of Ethnopharmacology 115 p.61-66.

Jímenez E., Pauta V. y Peña R. Transaminasas séricas en personas de 23-42 años de la ciudad de Cuenca-Ecuador, 2009-2010. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Laboratorio Clínico. Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Tecnología Médica. Ecuador.

Koritnik D., Koshy A. y Hoversland R. 1995. 17 β -Estradiol treatment increases the levels of estrogen receptor and its mRNA in male rat liver. Steroids, vol. 60, August.

Lane P. 2008. Estrogen Receptors in the Kidney: Lessons from Genetically Altered Mice. Gender Medicine/Vol. 5, Suppl. A.

Lárez C. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuáticos. Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 4(2), Abril.

Laso J. (2010). Patología del sistema nefrouinario. En *Introducción a la medicina clínica: fisiología y semiología*, segunda edición (273-280). España: Elsevier.

Latimer K., Mahaffey E. y Prasse K. 2005. Duncan & Prasse's Patología clínica veterinaria, cuarta edición (237-). Barcelona: Multimédica.

Lenis S., Gutiérrez G. y Tarazona M. 2010. Efectos de los fitoestrógenos en la Reproducción Animal. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín 63(2): 5455-5565.

Lohiya N, Mishra P., Pathak N., Manivannan B., Bhande S., Panneerdoss S. y Sriram S. 2005. Efficacy trial on the purified compounds of the seeds of *Carica papaya* for male contraception in albino rat. *Reproductive Toxicology* 20 135–148.

LXI Legislatura de México consultado en: http://www.diputados.gob.mx/documentos/medio_ambiente/iniciativas/INIC67,5505.pdf junio de 2014.

Lynch L. 2007. *Biopsia hepática percutánea con aguja Tru-cut® guiada por ultrasonografía en felinos*. Tesis para optar al título de Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias veterinarias. Valdivia-Chile.

Lynch M., Raphael S., Mellor L., Spare P. e Inwood M. 1977. Métodos de laboratorio. Editorial Interamericana. México Pp 1140-1145.

Martínez M. y Moctezuma C. 2006. Espectrofluorimetría. Universidad Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. Pp 10-14.

Massei G and Miller L. 2013. Nonsurgical fertility control for managing free-roaming dog populations: A review of products and criteria for field applications. *Theriogenology* 80: 829-838.

Mataix J. y Sánchez de Medina F. 2009. Proteínas. En *Nutrición y alimentación humana*, segunda edición (96-109). Madrid, España: Editorial Ergon.

McGarvey, C., Cates, P.N. Brooks, A. Swanson, I.R. Milligan, W. Coen. 2001. Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. *Endocrinology* 142:1202-1208.

Medina V. 2010. Evaluación de la actividad estrogénica de un extracto de planta medicinal endémica en útero de rata pre-púber y de su toxicidad oral aguda en ratas adultas. Tesis para obtener el grado de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago de Chile.

Morales MA., Varas C., Ibarra L. 2009. Caracterización demográfica de la población de perros de Viña del Mar, Chile. *Arch Med Vet* 41, 89-95.

Muñoz F. 2011. Mordedura canina. Univ. Méd. Bogotá (Colombia), 53 (1): 43-55, enero-marzo.

Mutis Barreto C. y Pérez Jiménez T. 2005. Determinación y análisis de valores de nitrógeno ureico en sangre (BUN), glucosa, creatin kinasa (CK) y ácido láctico pre y post ejercicio en una población de atletas equinos de salto en Bogotá, D.C. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, num. Febrero-Sin mes, pp. 1-28.

Neira-Carrillo A., Yáñez D., Aguirre P., Amar Y., Vidal S. y Egaña R. 2013. Encapsulación de Biomoléculas Usando Polímeros Naturales: "Un Nuevo Enfoque en la Entrega de Fármacos en Medicina" *Avances en Ciencias Veterinarias* V28 N° 2.

Nicolás Martinuzzi A., Alcántara S., Corbal A., Di Leo M., Guillot A., Palaoro A., Ferraresi E., Feller C. y Porbén S. 2011. Nitrógeno ureico urinario como indicador del metabolismo proteico en el paciente crítico. *Rev Cubana Aliment Nutr*, Vol. 21, No. 2.

Nogales M., Vidal E., Medina M., Bonnaud E., Tershy B., Campbell K., Zavaleta E. 2013. Feral Cats and Biodiversity Conservation: The Urgent Prioritization of Island Management. *BioScience* 63: 804–810.

Norma Oficial Mexicana: NOM-033-SAG/ZOO-2014. Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres.

Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Ortega A., Jiménez M., Acosta K., Guzmán E., Gutiérrez E., Luna W., Zavala M., González A., Perez M. 2011. Effects of papaya seeds extract on the sperm characteristics of dogs. *Animal Reproduction Science* 129: 82–88.

Ososki A. y Kennelly E. 2003. Phytoestrogens: a Review of the Present State of Research. *Phytother. Res.* 17, 845–869

Pal SK. 2005. Parental care in free ranging dogs, *Canis familiaris*. Applied Animal Behaviour Science 90; 31-47.

Patisaul, H.B., M. Dindo., P.L. Whitten and L.J. Young. 2001. Soy isoflavone supplements antagonize reproductive behavior and estrogen receptor FASHa- and beta-dependent gene expression in the brain. Endocrinology 142(7): 2946-2952.

Pérez Carreras M. 2001. Estudio anatomoclínico y fisiopatológico de una serie de 85 pacientes con esteatohepatitis no alcohólica. Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. Madrid España.

Pérez Fuentes A. 2004. Efecto hipoglicemiante del extracto fluido de *Bauhinia candicans* en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. Memoria para obtener el título de Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias.

Pérez-Jackson L., Alfonso A., Fong O., Betancourt J., Salas H., Puente E., Wawoe N. y Mora Y. 2010. Toxicidad a dosis repetida de la decocción de *Solanum torvum* Sw. (prendejera) en ratas. Revista Cubana de Plantas Medicinales; 15(2)51-59.

Pérez-Rivero J., Aguilar-Setién A., Martínez-Maya J., Pérez-Martínez M. y Serrano H. 2007. Los fitoestrógenos y el efecto de su consumo en diferentes órganos y sistemas de animales domésticos. Agricultura Técnica (Chile) 67(3):325-331.

Pérez-Rivero JJ. 2008. *Efecto del coumestrol como un producto alternativo para el control de la población canina*. Tesis para obtener el grado de doctor en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Pérez-Rivero JJ, Pérez-Martínez M, Aguilar-Setién A. 2014. Histometric analysis of vampire bat (*Desmodus rotundus*) testicles treated with coumestrol by oral route, Journal of Applied Animal Research, 42:2, 208-212.

Perfil VetScan® Prep II 2006. Disponible en. <http://www.abaxis.com/pdf/Prep%20Profile%20II%20ES.pdf> el día 9 de marzo de 2015.

Pike, A.C., A.M. Brzozowski., R.E. Hubbard., T. Bonn., A.G. Thorsell., O. Engström., J. Ljunggren., J.A. Gustafsson and M. Carlquist. 1999. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *The EMBO Journal* 18(17): 4608-4618.

Pilsakova L., Rieicansky I. y Jagla F. 2010. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiol. Res.* 59, 651-664.

Pin G. y Guzmán C. 2004. *Determinación de los niveles de fosfatasa alcalina sérica en canes*. Tesis para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.A.G.R.M. Santa Cruz, Bolivia.

Pino J. y Alvis R. 2009. Efecto de *Brugmansia arborea* (L.) Lagerheim (Solanacea) en el sistema reproductor masculino de ratón. *Rev. peru. biol.* 15(2): 125- 127.

Pintos G, Briones M, Marchante C, Sanjurjo P, Vilaseca M. 1997. Protocolo para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los trastornos del ciclo de la urea. *An Esp Peditr; Supl* 89: 1-8.

Popa D.S., Bolfa P., Kiss B., Vlase L., Pălinean R., Pop A., Cătoi C., Crisan G. y Loghin F. 2014. Influence of *Genista tinctoria* L. or methylparaben on subchronic toxicity of bisphenol A in rats. *Biomed Environ Sci.* Feb; 27(2):85-96.

Rivera Barahona, Pablo. 2009. *Población canina en las calles de 34 comunas de Santiago*. Tesis para obtener el título de Médico Veterinario. Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología. Facultad de Medicina Veterinaria, Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago de Chile.

Rubio-Delgado A., Cupul-Magaña F. y Espinosa-Avilés D. 2002. Reporte de ocurrencia de lipidosis y timpanización en crías de cocodrilo de río (*Crocodylus acutus*) en cautiverio. *Rev Biomed*: 13:154-156.

SAGARPA. 2007.
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5001157&fecha=20/09/2007.
Consultado el día 26 junio de 2014.

Sánchez G., Cervántes E., Ramírez M., Reza J., Meléndez E. 2010. Zoonosis transmitidas a humanos por los perros e implicaciones en la salud pública. Periódico del Departamento de Salud Pública. Facultad de Medicina. UNAM. Año 7 N° 31.

Sánchez D. y Nogales P. 2009. Pruebas diagnósticas en el paciente con enfermedad hepatobiliar. Jano 25 de septiembre. N. 1.746.

Sánchez R., Soriano S., Girona B., Pérez M. y Viñets G. 2002. ¿Por qué aumentan las fosfatasas alcalinas? Aten Primaria 15 de marzo. 29 (4): 241-245.

Sandoval M., Ayala S., Oré M., Valdivieso L., Loli R., Ricra V. y Huaman O. 2005. Evaluación de la toxicidad hepática y renal aguda y subaguda del látex de *Croton palanostigma* (sangre de grado) en animales de experimentación. An Fac Med Lima; 66(2) 119-126.

Schlottfeldt F., Marques S., Malisani D., Cordeiro P., Dezoti F., Watanabe M. y Fernandes M. 2015. Prevenção da nefrotoxicidade da anfotericina B por meio do uso de fitomedicamentos. Rev Esc Enferm USP; 49(Esp):74-79.

Secretaría de Salud (<http://www.salud.df.gob.mx/ssdf/index.php?> Consultado el 23 de septiembre del 2013).

Selby L., Rhoades J., Hewett J y Irvin J. 1979. A survey of attitudes toward responsible pet ownership. Public Health Report. Vol 94 (4) 380-386.

Semwal A., Singh R., Dutta P. 2013. Chitosan: A Promising Substrate for Pharmaceuticals. Journal of Chitin and Chitosan Science, Volume 1, Number 2, pp. 87-102(16).

Senel S. y McClure S. 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. Advanced Drug Delivery Reviews 56 1467-1480.

Serrano H., Pérez-Rivero JJ., Aguilar-Setién A, de Paz O. y Villa-Godoy A. 2007. Vampire bat reproductive control by a naturally occurring phytoestrogen. Reprod. Fertil. Develop; 19: 470-472.

Serrano H, Pérez-Rivero JJ, Martínez-Maya JJ, Aguilar-Setién A, Pérez-Martínez M, García-Suárez MD. 2008. Fluorescence and immunohistological detection of estrogen receptors in dog testis and epididymis after oral coumestrol administration. *Neuroendocrinology Letters* 29:977-980.

Shen M, Shi H. 2015. Sex Hormones and Their Receptors Regulate Liver Energy Homeostasis. *Int J Endocrinol*. doi: 10.1155/2015/294278.

Sisson S., Grossman J. (2005). *Anatomía de los animales domésticos tomo 1*. (5ª. Edición). Barcelona, España: Masson.

Slater M., Di Nardo A., Pediconi O., Dalla P., Candeloro L., Alessandrini B. y Del Papa S. 2008. Free-roaming dogs and cats in central Italy: Public perceptions of the problem. *Preventive Veterinary Medicine* 84: 27-47.

Sontas H., Dokuzeylu B., Turna O. y Ekici H. 2009. Estrogen- induced myelotoxicity in dogs: A review. *Can Vet J*. Oct; 50 (10): 1054- 1058.

Soto Parraguez, Alejandra. 2013. *Análisis de un problema público no abordado, el caso de los perros vagabundos y callejeros en Chile*. Tesis para obtener el grado de Magister en Gestión y Políticas Públicas. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, departamento de Ingeniería Industrial. Santiago de Chile.

Tejada Cifuentes F. 2010. Hepatotoxicidad por fármacos. *REV CLÍN MED FAM*; 3 (3): 177-191.

Tejos R., Padilla O., Pizarro M., Solís N., Arab J., Margozzini P., Miquel J., Riquelme A. y Arrese M. 2013. Niveles séricos de alaninoaminotransferasa en población chilena: análisis de los resultados de la encuesta nacional de salud 2009-2010. *Rev Med Chile*; 141: 909-916.

Teppa A. y Terán J. 2005. Nuevos aspectos bioquímicos y moleculares de la acción de los estrógenos. *Ginecol Obstet Mex*; 73: 436-42.

Traversa. 2005. Las enfermedades Zoonosis. Revisión bibliográfica. Disponible en: <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Salud%20Animal%20y%20Salud%20Publica/2010/LAS%20ENFERMEDADES%20ZONOSIS.pdf>.

Trigo F. y Valero G. 2004. *Patología General Veterinaria*. Trastornos circulatorios. 4a edición. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp 31-33.

Varela F. 1994. Toxicidad sobre médula ósea provocada por estrógenos en la especie canina. *Centre Mèdic Veterinari*. Vol. 14, n. 4.

Vargas K. 2013. *Hallazgos histopatológicos en riñones decomisados de bovinos en una planta faenadora de la región de los ríos, Chile*. Tesis para optar al título de Médico Veterinario. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias veterinarias. Valdivia-Chile.

Wen-Ling Lee, Ming-Huei Cheng, Der-Cherng Tarng , Wu-Chang Yang, Fa-Kung Lee y Peng-Hui Wang. 2013. The benefits of estrogen or selective estrogen receptor modulator on kidney and its related diseased chronic kidney diseased mineral and bone disorder: Osteoporosis. *Journal of the Chinese Medical Association* 76: 365e371.

Whiten PL, Russell E and Naffolin F. 1994. Influence of phytoestrogen diets on estradiol action in the rat uterus. *Steroids* 59: 443-449.

Whitten P.L., y H.B. Patisaul. 2001. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environ. Health Perspect.* 109:5-20.

Ramírez P. 2010, tomado de http://lils.ulatina.ac.pa/archivos/pramirez_8-189-569/Archivos_de_Cursos/Materia_-_ETM018-QUIMICA_CLINICA_II_Grupo_-_1_Anio_-_2011-1/08_-_FUNCION_RENAL.pdf el día 22 de agosto de 2015.

Evaluación clínica e histológica del efecto de la combinación quitosán-coumestrol en hígado y riñón en un modelo de Rata (*Rattus rattus*).

Elizabeth Chávez-Cobazín. Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100. Colonia Villa Quietud, Delegación Coyoacán. Ciudad de México. C.P. 04960. E-mail: mvzcobazin@gmail.com

Juan José Pérez-Rivero. (Corresponding autor) Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Departamento de Producción Agrícola y Animal. E-mail: jjperez1_1999@yahoo.com and perivet.idea@gmail.com Teléfono. (52) 55 54837000 ext. 2305 Fax. (52) 55 54837238 Calzada del Hueso 1100. Colonia Villa Quietud, Delegación Coyoacán. Ciudad de México. C.P. 04960.

Oswaldo López-Díaz. Laboratorio de Histopatología. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Departamento de Producción Agrícola y Animal. E-mail: mvz.osvaldo.id@gmail.com

Resumen

Introducción: A lo largo del tiempo el ser humano ha permitido que los perros y gatos se reproduzcan de manera desordenada, propiciando así que estos se conviertan en un serio problema dentro de las ciudades, varios son los motivos por los cuales la gente decide abandonar a estos animales que previamente fueron animales de compañía, de este modo la tendencia es que estas poblaciones en condición de calle vayan en aumento en los países en vías de desarrollo, lo que conlleva graves peligros para estas especies y un riesgo considerable para el hombre y su sociedad. El objetivo de este estudio fue evaluar clínica e histopatológicamente al hígado y riñón de ratas tratadas con la combinación de Quitosán-Coumestrol. Se utilizaron 30 ratas macho Wistar, estas se dividieron aleatoriamente en dos grupos, 15 animales control y 15 tratadas con una dosis única de quitosán-coumestrol de 800 µg por vía subcutánea, se dejó ejercer su efecto durante 9 semanas, para valorar su efecto en dichos órganos. Resultados: Se realizaron pruebas para fosfatasa alcalina (ALP), alanino aminotransferasa (ALT), la creatinina (CRE) y nitrógeno uréico (BUN) no encontrando cambios entre los animales del grupo control y el tratado.

Por su parte la evaluación histopatológica de riñón mostró congestión y tubulonefrosis ambas ligeras sin representar diferencia entre los animales control y los tratados. En lo referente a la valoración histopatológica de hígado se encontró congestión, tumefacción y lipidosis no significativos entre ambos grupos. Conclusiones: Se concluye que no existe evidencia de daño a nivel renal y hepático con la administración subcutánea de una combinación de quitosán-coumestrol.

Palabras clave: Hígado, riñón, coumestrol, quitosán, fluorescencia

Introducción

A lo largo del tiempo el ser humano ha permitido que los perros y gatos se reproduzcan de manera desordenada, propiciando así que estos se conviertan en un problema dentro de las ciudades y comunidades; generando problemas de sobrepoblación animal y como consecuencia contaminación, enfermedades y ausencia de bienestar animal (Morales *et al.*, 2009; Slater *et al.*, 2008).

El control de animales ferales y los de libre rango, está dirigido a reducir su número y de esta manera evitar agresiones a humanos y la transmisión de enfermedades zoonóticas, lo cual afecta la economía por los daños ocasionados, los tratamientos preventivos, curativos y en ocasiones la muerte (Pal, 2005).

Dentro de las estrategias utilizadas para el control de fauna feral y de libre rango se encuentran las de tipo letal, las cuales emplean por lo general productos químicos, no obstante son mal vistas por la sociedad y han demostrado ser poco eficientes debido al impacto negativo que generan al medio ambiente y a que la cantidad de animales eliminada se recupera en poco tiempo (Aslantas *et al.*, 2005).

Por otro lado, existen estrategias de control poblacional no letales, como la esterilización quirúrgica la cual es socialmente más aceptable, sin embargo el costo de esta es elevado, requieren de personal calificado, no están exentas de riesgos; por lo que se prefiere la utilización de metodologías no invasivas para el control de la reproducción, un ejemplo de estas metodologías es el uso de fitoestrógenos (Massei y Miller, 2013), los

cuales han demostrado su capacidad para llegar a testículo y producir alteraciones a nivel epitelio germinal en el perro (Pérez-Rivero *et al.*, 2009).

Los fitoestrógenos son producidos por una gran variedad de plantas principalmente leguminosas, estos actúan como un mecanismo de defensa contra algunos patógenos como los hongos (*Pseudopeziza medicaginis*) el cual afecta a la alfalfa (*Medicago sativa*). Debido a su estructura química los fitoestrógenos se dividen en diferentes familias: flavonoides, lignanos, estilbenos y los coumestanos, siendo el coumestrol su principal representante (Patisaul *et al.*, 2001). Estos productos presentan en su estructura un anillo aromático y un grupo hidróxilo por lo que pueden tener actividad estrogénica o antiestrogénica dependiendo de la dosis y el tejido donde ejerzan su efecto (Pike *et al.*, 1999; Ozoski y Kenelly, 2003).

Los coumestanos son los fitoestrógenos que más abundan en la naturaleza presentan una estrogénicidad equivalente a 1/1000 comparándolos con la actividad del 17β - estradiol (Adams, 1995). Estos agentes ingresan a las células blanco donde existen receptores para estrógenos del tipo α (ER α), los cuales se encuentran localizados principalmente en el hígado, el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular, los huesos, el útero y la glándula mamaria. También se unen a receptores tipo β (ER β) presentes en la próstata, los ovarios, los testículos, la tiroides, las suprarrenales, el páncreas, la vesícula biliar, la piel, el tracto urinario, el tejido linfoide, el pulmón, el hipotálamo, el cerebelo y el bulbo olfatorio (Lenis *et al.*, 2010).

Ambos ER son expresados en el hígado de roedores y otros mamíferos en una cantidad menor en comparación con órganos reproductivos, su cantidad es independiente del sexo, y de la etapa de la vida de los individuos, siendo más altas durante el período perinatal, disminuyendo hasta el inicio de la pubertad y aumento para llegar a pico postpubertad (Shen y Shi, 2015).

Se ha demostrado que el hígado es un órgano blanco importante para los estrógenos, la actividad transcripcional a nivel hepático de los ER está asociada con el ciclo reproductivo y estado nutricional del individuo. Varias líneas de evidencia indican que los estrógenos están implicados en la prevención de depósitos de grasa, reducen la síntesis de lípidos y aumentan el transporte de triglicéridos a nivel hepático (Della-Torre *et al.*, 2016).

Los riñones en las ratas son sensibles a los andrógenos, los cuáles juegan un papel importante en la hipertrofia glomerular y renal, a pesar de que los estrógenos tienen efecto antiandrógeno estos no pueden bloquear todas las consecuencias adversas de los andrógenos en el riñón. Los estrógenos influyen en el crecimiento normal del riñón, ya que el riñón está influenciado por $Er\beta$ (Lane, 2008).

La toxicidad por estrógenos se da en relación con la dosis recibida, los diferentes tipos de estrógenos a los que se exponen los animales, la edad y la sensibilidad de cada animal. Si bien algunos de los animales suelen recuperarse una vez eliminados estos de su cuerpo, de manera frecuente se desarrolla aplasia medular crónica severa e irreversible y el animal muere debido a anemia profunda, hemorragias masivas, trombocitopenia acompañadas de infecciones bacterianas secundarias con cuadros sépticos debido a la neutropenia, toda esta intoxicación se da a nivel de médula ósea (Varela, 1994).

El quitosán ha sido utilizado como excipiente farmacéutico por su capacidad de controlar la liberación de los agentes activos (Singla y Chawla, 2001). Además, en la forma de las estructuras coloidales puede atrapar macromoléculas, siendo un producto biocompatible y biodegradable de baja toxicidad (Miranda-Castro y Lizárraga-Paulín, 2012; Aspden *et al.*, 1997).

Debido a los efectos no deseados producidos por dosis elevadas de estrógenos y a que los fitoestrogenos imitan la actividad de estos en el organismo los objetivos de este trabajo son determinar si el coumestrol llega a riñón e hígado y verificar si su administración a dosis elevadas produce efectos adversos a nivel hepático y renal en los animales sujetos a tratamiento.

Material y Métodos

Ubicación

El trabajo se realizó dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X), ubicada en Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Delegación Coyoacán, C.P. 04960, D.F. México; los animales se mantuvieron en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio Bioterio (UPEAL Bioterio) en el Laboratorio de

Cirugía Experimental y el Laboratorio de Histopatología de la UAM-X se obtuvieron y procesaron las muestras.

Animales

Se utilizaron 30 ratas macho Wistar mayores de 60 días, con un peso de de 250 gramos provenientes del UPEAL bioterio/Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, se mantuvieron dentro del bioterio en condiciones convencionales; con libre acceso de agua y alimento, para cubrir sus necesidades nutricionales, siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Las ratas se mantuvieron en jaulas individuales marcadas de acuerdo al grupo que les corresponda control y tratamiento Quitosán–Coumestrol 800 µg.

Tratamientos

Las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos, 15 animales fueron control, y 15 fueron inyectadas con la combinación de quitosán–coumestrol 800 µg, el cual se colocó a la altura de la cruz en el tejido subcutáneo previa antisepsia de la zona, el cual fue administrado con una jeringa de insulina con aguja calibre 21X32. los animales se alojaron en jaulas individuales durante el transcurso del experimento. A partir de la semana 5 y hasta llegar a la 9 cada semana se sometieron a eutanasia 3 animales de cada grupo para coleccionar las muestras.

Toma de muestras

Las ratas fueron inducidas a anestesia general inhalada con Isoflurano, una vez anestesiadas, se utilizó una jeringa de 5 ml, con la cual se procedió a punción directa al corazón para obtener la mayor cantidad de sangre posible, la cual se depositó en un tubo de ensaye, se esperaron 15 minutos a que se separaran los sólidos sanguíneos del suero y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, el suero se colocó en tubos Eppendorf y se congelaron las muestras hasta su utilización.

Para las muestras de hígado y riñón una vez que se eutanasiaron las ratas, se procedió a retirar el hígado realizando en este diferentes cortes de manera aleatoria los cuales fueron depositados en solución fijadora de formalina buferada al 10%. Los riñones fueron seccionados en dirección sagital y se depositaron en la misma solución fijadora donde permanecieron por 15 días, para después continuar procesar del tejido

por la técnica de inclusión en parafina (Armed Forced Institute of Pathology, 1994).

Se realizaron cortes de tejidos con un micrótomo a un grosor de 3 μm y posteriormente fueron teñidos por medio de la tinción de Hematoxilina de Harris y Eosina, de manera posterior se colocó un cubreobjetos (Armed Forced Institute of Pathology, 1994).

Química sanguínea

El análisis de la química sanguínea se hizo con el aparato VetScan VS2©, se colocaron 100 μl , de suero en un rotor Comprehensive Diagnostic Profile, el cual evalúa los analitos de manera cuantitativa mediante la técnica de espectrofotometría. Fueron determinados fosfatasa alcalina (ALP), alanino aminotransferasa (ALT), nitrógeno ureico (BUN), creatinina (CRE).

Histología de hígado y riñón

La histología se realizó de forma descriptiva, utilizando una laminilla al azar de cada animal y tomando en cuenta 10 campos por laminilla, en ella se compararon los tejidos de los animales tratados con preparaciones de control negativo de animales sanos y control positivo se utilizó para el hígado preparaciones histológicas provenientes de animales con hepatitis linfoplasmocítica, tumefacción celular o hipertrofia de los conductos biliares. En el caso del riñón se comparó con preparaciones histológicas que muestran nefritis, glomerulonefritis, tubulonefrosis, tubulonefritis, glomerulonefritis intersticial y glomerulonefritis membrano proliferativa.

Fluorescencia

Aprovechando la capacidad de autofluorescencia del coumestrol (Serrano *et. al.*, 2008), se observaron laminillas desparafinizadas y sin tinción alguna de hígado y riñón de los animales control, y los tratados con quitosán-coumestrol de 800 μg , se montaron con Vectashield® y se observaron 100 campos al azar utilizando un microscopio confocal invertido excitando las muestras con una longitud de onda de 345 a 370 nm y observando la emisión de la fluorescencia entre 410 a 438 nm; se tomaron imágenes y estas fueron analizadas para comparar su intensidad con la ayuda del programa Zen 2 blue edition (ver 2.0) Carl Zeiss.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en la bioquímica sanguínea fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis; en el caso de la fluorescencia se realizó la prueba de Mann-Whitney y la histopatología se utilizó una prueba de χ^2 .

Resultados

La media grupal de la fosfatasa alcalina (ALP) practicada a los animales de grupo control fue de 192.8 ± 20.1 U/L y para el grupo tratamiento de 191.0 ± 22.95 U/L, para la alaninoaminotransferasa (ALT) para el grupo control fue de 33.0 ± 8.0 U/L, siendo de 39.62 ± 4.11 U/L para el grupo tratado. Por su parte los resultados de la evaluación de los metabolitos renales fueron para el nitrógeno ureico (BUN) en el grupo control 3.213 ± 7.479 mmol/L y para el grupo tratado fue de 6.530 ± 0.601 mmol/L. Para la creatinina (CRE) en el grupo control fue de 33.0 ± 4.8 mmol/L y para el grupo tratado de 28.19 ± 4.35 mmol/L, los resultados por semana se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Análisis semanal de fosfatasa alcalina (ALP), alaninoaminotransferasa (ALT), nitrógeno ureico (BUN) y creatinina (CRE) realizados a animales de grupo control (CT) y de tratamiento de 800 μ g con la combinación quitosán-coumestrol (TX) se muestra la media \pm error estandard.

| Parámetros | Valores de referencia | Semana 5 | | Semana 6 | | Semana 7 | | Semana 8 | | Semana 9 | |
|------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|
| | | CT | TX | CT | TX | CT | TX | CT | TX | CT | TX |
| ALP | 16.0-302.0 U/L | 193 \pm 25 | 157 \pm 25 | 193 \pm 20 | 155 \pm 29 | 193 \pm 20 | 270 \pm 29 | 193 \pm 20 | 154 \pm 23 | 193 \pm 20 | 219 \pm 20 |
| ALT | 20.0-61.0 U/L | 33 \pm 8 | 32 \pm 5 | 33 \pm 8 | 35 \pm 3 | 33 \pm 8 | 49 \pm 5 | 33 \pm 8 | 39 \pm 4 | 33 \pm 8 | 44 \pm 5 |
| BUN | 3.213-7.479 mmol/L | 7.1 \pm 0.5 | 5.8 \pm 0.7 | 7.1 \pm 0.5 | 6.4 \pm 0.9 | 7.1 \pm 0.5 | 7.5 \pm 0.4* | 7.1 \pm 0.5 | 5.3 \pm 0.7 | 7.1 \pm 0.5 | 7.6 \pm 0.55* |
| CRE | 4.42-57.46 mmol/L | 33 \pm 5 | 21 \pm 1 | 33 \pm 5 | 28.3 \pm 2 | 33 \pm 5 | 30 \pm 9 | 33 \pm 5 | 34 \pm 4 | 33 \pm 5 | 28 \pm 4 |

* Desviación del valor de referencia. En todos los analitos $p > 0.05$ prueba Mann-Whitney.

Los resultados de la intensidad de la fluorescencia nos indican lo siguiente:

En el caso de riñón se midió la intensidad de pixeles de las muestras con tratamiento donde se obtuvo una media de 36.33 ± 2.5692 , mientras que en el caso del grupo control se obtuvo una media de 14.7 ± 1.21 , como se muestra en la Figura 1. Se realizó un análisis estadístico de Mann Whitney encontrando diferencia significativa entre ambos grupos $p < 0.001$.

En el hígado se midió también la intensidad de fluorescencia expresada en pixeles de las muestras del grupo tratado obteniendo una media de 62.83 ± 23.96 , siendo para el grupo control de 3.06 ± 1.78 , como se puede observar en la Figura 1. En el análisis estadístico de Mann Whitney presentó diferencia significativa entre el grupo control y el tratamiento $p < 0.001$.

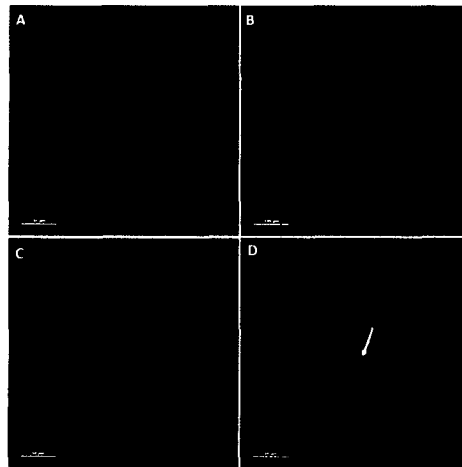


Figura 1. Intensidad de fluorescencia. A) Riñón de los animales sin tratamiento. B) Riñón animales con tratamiento. C) Hígado animales sin tratamiento. D) Hígado animales con tratamiento, la flecha indica señal fluorescente a nivel del espacio porta (arteria hepática, vena porta y canal biliar).

Los cambios encontrados en la evaluación histológica en riñón, tanto en congestión como en tubulonefrosis son leves, todos con un patrón de distribución multifocal como se muestra en la Figura 2. No encontrando diferencias entre los animales del grupo control y los del grupo tratado $p > 0.05$ prueba de χ^2

En lo que respecta a la evaluación histológica en hígado, la mayoría de los cambios encontrados son leves tanto en congestión como en lipidosis, todos con un patrón de distribución multifocal, en cuanto a la tumefacción la mayoría de los cambios también son leves con un patrón de distribución difuso (Figura 2), no se encontraron diferencias significativas entre los animales del grupo control y los del grupo tratado. Congestión y lipidosis $p > 0.05$ prueba de χ^2 , Tumefacción $p > 0.05$ prueba de Kruskal-Wallis.

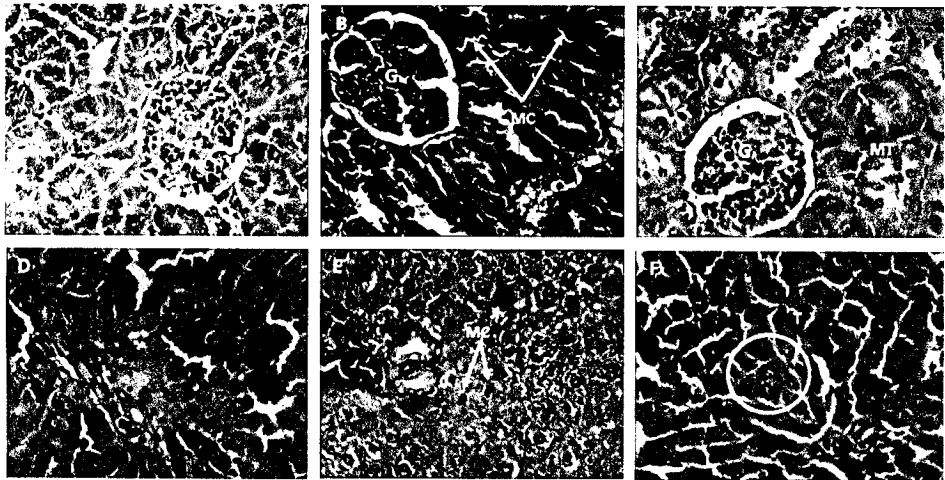


Figura 2.- Se muestran microfotografías con tinción de HE a 40X de aumento. A) Riñón de animales del grupo control, se muestra el glomérulo (G). B) Riñón de animales con tratamiento se muestra congestión leve (MC). C) Riñón de animales con tratamiento se muestra tubulonefrosis leve (MT). D) Hígado de animales del grupo control. E) Hígado de animales tratados con congestión leve (MC). F) Hígado de animales tratados, el círculo muestra una zona con tumefacción leve (T).

Discusión

El hígado es el principal órgano implicado en el metabolismo de sustancias ajenas al organismo incluidos los productos de origen vegetal, por lo que es factible que sea afectado por sustancias que produzcan toxicidad medida en que superen su flexibilidad y capacidad metabólica.

Puede presentar manifestaciones clínicas desde hepatitis aguda o crónica, cuadros de colestasis y lesiones vasculares hasta episodios de insuficiencia hepática aguda; además de la variabilidad en la presentación clínica que caracteriza a la hepatotoxicidad puede fluctuar desde un ligero aumento de las transaminas por lo general asintomático hasta cuadros fulminantes que pueden terminar con la vida del paciente (García-Cortés *et al.*, 2008).

La fosfatasa alcalina es una enzima que hidroliza ésteres de fosfato a pH alcalino, la cual se localiza en la membrana de las células en varios tejidos; no obstante la fosfatasa alcalina del plasma sanguíneo tiene principalmente las aportaciones del hígado, intestino y hueso. Las isoformas hepáticas son dos, una propia de los hepatocitos y otra de la membrana canalicular biliar, la cual ingresa al torrente sanguíneo a través de la vía paracelular; esta enzima se encuentra elevada en cualquier forma de obstrucción del tracto biliar, colestasis biliar, carcinomas metastásicos en hígado y tejido óseo, trastornos de mala absorción (Sandoval *et al.*, 2005); en esta investigación no se observa incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina en ninguno de los dos grupos tratados con respecto al grupo control y los valores de referencia, las diferencias no fueron significativas, lo que demuestra que no existe daño a nivel hepático por la administración de la combinación de quitosán-coumestrol en dosis de 800 µg.

Debido a que la ALT es una enzima citosólica del hepatocito y su aumento en suero refleja una fuga en la permeabilidad de la membrana es comúnmente asociada con la muerte celular, por lo que la ALT se considera como un marcador fiable y sensible de alguna enfermedad hepática (Tejos *et al.*, 2013; Hend, 2015) y dado que la mayoría de las reacciones hepatotóxicas normalmente cursan de una manera asintomática o bien con síntomas no específicos estas pueden descubrirse

por medio de la elevación en los niveles de transaminasas (Tejada-Cifuentes, 2010); el análisis de la literatura muestra que los valores sugeridos por el VetScan® Prep II 2006, son los ideales en la especie utilizada, por lo cual los valores obtenidos en los dos grupos tratados en esta investigación se encuentran dentro de los parámetros de referencia y no muestran cambios entre los animales del grupo control y del tratado, lo cual proporciona evidencia de que no existe toxicidad hepática al utilizar la combinación de quitosán-coumestrol en dosis de 800 µg.

Debido a que los riñones son órganos de excreción altamente vascularizados, es la principal vía de eliminación de compuestos tanto de origen vegetal como de tipo xenobióticos. La concentración de urea comúnmente reportada como Nitrógeno Ureico Sanguíneo (BUN), es un compuesto nitrogenado que se produce en el ciclo hepático de la urea, estos niveles de BUN se utilizan para evaluar la función renal basada en la capacidad del riñón de remover desechos nitrogenados presentes en la sangre; en animales sanos la urea es filtrada por el glomérulo renal y es excretada por la orina, sin embargo cuando el riñón no funciona adecuadamente, la urea no se remueve del plasma, aumentando así los niveles de este metabolito (Mutis-Barreto y Pérez-Jimenez, 2005); De manera general, los resultados obtenidos en este experimento no muestran alteración en cuanto a los niveles de BUN. No obstante se presentaron dos episodios en donde se observó un incremento marginal de los niveles de BUN, las cuales pueden deberse a la exposición a isoflurano al momento de la toma de muestras, ya que este anestésico ocasiona vasodilatación central la cual puede producir hipoperfusión a nivel renal secundaria a hipotensión (Díaz de León-Ponce *et al.*, 2005).

La función renal se puede valorar por la filtración glomerular, la cual se mide por el aclaramiento de creatinina, la cual se deriva del metabolismo de la creatina (anhidro de la creatina) producto de la excreción de la actividad muscular y que circula en la sangre; su eliminación es renal por lo que hay una correlación entre su valor y la función renal; en condiciones ideales la excreción de la creatinina es igual a la producción de la misma; cuando la creatinina plasmática se eleva el proceso de secreción se satura, mostrando entonces una reducción en el filtrado glomerular (Fernández-Fresnedo *et al.*, 2002; Sandoval *et al.*, 2005); en este trabajo la creatinina no mostró cambios con respecto a los valores de referencia, ni diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con tratamiento.

El fenómeno de fluorescencia es dado a través de las moléculas las cuales pueden absorber luz ultravioleta visible para generar un estado de excitación en el cual se van a alterar las interacciones entre los átomos de la molécula; cuando se encuentran en estado excitado las moléculas tienen propiedades diferentes al estado fundamental lo cual da lugar al desarrollo de diversos procesos fotofísicos y fotoquímicos; la fluorescencia es un proceso fotofísico que se define como la propiedad de una molécula para emitir luz cuando es excitada (Hussein, 2015). El coumestrol es un fitoestrógeno con capacidad de fluorescer al estar unido a su receptor, posee alta afinidad a los sitios de unión a hormonas de los receptores estrogénicos tanto del tipo α como β es ideal para detectar receptores estrogénicos en las células (Pérez-Rivero *et al.*, 2014) y en los órganos blanco (De Boer *et al.*, 2004), en este trabajo se observó un aumento en la intensidad de la fluorescencia tanto en riñón como en hígado, entre el grupo control y el tratamiento con la combinación quitosán-coumestrol, lo que sugiere que el coumestrol está llegando a estos órganos y está uniéndose a los receptores estrogénicos presentes en ellos de manera similar a lo que sucede en el testículo de perro donde se ha demostrado por fluorescencia su presencia en el epitelio germinal, asociándolo a la distribución de los receptores estrogénicos (Serrano *et al.*, 2008).

A diferencia de algunos xenoestrógenos como el Bisfenol A, los cuales causan daño oxidativo en hígado y riñones la combinación de quitosán-coumestrol a dosis utilizadas de 800 μg no presenta efectos tóxicos, al no inducir necrosis de hepatocitos ni degeneración grasa del hígado, a nivel renal tampoco se encontró infiltración de células mononucleares. A pesar de que el Bisfenol A y el coumestrol se unen a ER se metabolizan en el hígado y son excretados en la orina; en cambio el coumestrol tiene propiedades antioxidantes, lo que favorece la reducción de la expresión de genes relacionados con el estrés, protegiendo así las células del daño oxidativo (Popa *et al.*, 2014; Hae-In *et al.*, 2012). Los hallazgos encontrados a nivel tisular en este trabajo son leves, y de igual intensidad que los encontrados en los animales del grupo control tanto en hígado como en riñón.

Conclusiones

Se concluye que la administración de coumestrol a una dosis de 800 µg por vía subcutánea en ratas, utilizando al quitosán como vehículo alcanza al torrente sanguíneo llegando a nivel hepático y renal, no produciendo evidencias relacionadas con alteraciones a nivel histológico, ni afectando los parámetros bioquímicos que pudieran evidenciar cambios en el funcionamiento de ambos órganos. Es necesario seguir evaluando esta combinación en lo referente a su cinética de distribución y citotoxicidad.

Agradecimientos

Se agradece al laboratorio de Histopatología así como al bioterio UPEAL de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo. Un agradecimiento también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada al primer autor, para llevar a cabo los estudios de Maestría en Ciencias Agropecuarias.

Referencias

- Adams, N.R. 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of Animal Science* 73(5): 1509-1515.
- Armed Forces Institute of Pathology, 1994. *Laboratory Methods in Histotechnology* American Registry of Pathology. Washington D.C.
- Aslantaş O, Özdemir V, Kiliç S, Babür C. 2005. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. *Veterinary Parasitology* 129: 187-191.
- Aspden, T.J., Mason, J.D. & Jones, N.S. 1997. Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on in vitro and in vivo mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. *J. Pharm. Sci.* 86: 509-513.
- De Boer T, Oijens D, Muntendam A, Meulman E, van Oostijnen M, Ensing K. 2004. Development and validation of fluorescent receptor assays based on the human recombinant estrogen receptor subtypes alpha and beta. *J Pharm Biomed Anal* 2004; 34: 671-679.

Della-Torre S, Mitro N, Fontana R, Gomaraschi M, Favari E, Recordati C, Lolli F, Quagliarini F, Meda C, Ohlsson C, Crestani M, Uhlenhaut NH, Calabresi L, Maggi A. 2016. An Essential Role for Liver ERα in Coupling Hepatic Metabolism to the Reproductive Cycle. *Cell Rep.*15:360-371.

Díaz de León- Ponce M., Díaz de León-Ponce G., Moreno –Santillán A., González-Díaz J. y Briones-Garduño J. 2005. El riesgo del procedimiento anestésico en la función renal. *Revista Mexicana de Anestesiología* Volumen 28, No. 4, octubre-diciembre 2005.

Fernández-Fresnedo G., Francisco A., Rodrigo E., Piñera C., Herráez I., Ruiz J. y Arias M. 2002. Insuficiencia renal «oculta» por valoración de la función renal mediante la creatinina sérica. *Nefrología*. Vol. XXII. Número 2. 2002.

García-Cortés M., Borraz Y., Lucena M., Peláez G., Salmerón J., Diago M., Martínez-Sierra M., Navarro J., Planas R., Soria M., Bruguera M. y Andrade R. 2008. Hepatotoxicidad secundaria a "productos naturales": análisis de los casos notificados al Registro Español de Hepatotoxicidad. *Rev Esp Enferm Dig (Madrid)* Vol. 100. N.º 11, pp. 688-695.

Hae-In Lee, Jin-Hwan Lee, Ki-Hun Park, Dipen Sangurdekar y Woo-Suk Chang. 2012. Effect of Soybean Coumestrol on *Bradyrhizobium japonicum* Nodulation Ability, Biofilm Formation, and Transcriptional Profile. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Apr; 78(8): 2896–2903.

Hend M. 2015. Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. *Tag BMC Complementary and Alternative Medicine* (2015) 15:252.

Hussein S. Síntesis de perilendiimidias con aplicación como biomarcadores fluorescentes, 2015. Tesis para obtener el grado en Farmacia. Universitas Miguel Hernández.

Lane P. 2008. Estrogen Receptors in the Kidney: Lessons from Genetically Altered Mice. *Gender Medicine/Vol. 5, Suppl. A.* S11-S18.

Lenis S., Gutiérrez G. y Tarazona M. 2010. Efectos de los fitoestrógenos en la Reproducción Animal. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 63(2): 5455-5565.

Massei G and Miller L. 2013. Nonsurgical fertility control for managing free-roaming dog populations: A review of products and criteria for field applications. *Theriogenology* 80 829-838. .

Miranda Castro S.P. and Lizárraga Paulín E. 2012. The Complex World of Polysaccharides, Chapter 1: Is Chitosan a New Panacea? Areas of Application, Publisher: InTech, Editors: Desiree Nedra Karunaratne, 1-44.

Morales MA., Varas C., Ibarra L. 2009. Caracterización demográfica de la población de perros de Viña del Mar, Chile. *Arch Med Vet* 41, 89-95.

Mutis Barreto C. y Pérez Jimenez T. 2005. Determinación y análisis de valores de nitrógeno ureico en sangre (BUN), glucosa, creatin kinasa (CK) y ácido láctico pre y post ejercicio en una población de atletas equinos de salto en Bogotá, D.C. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, num. Febrero-Sin mes, pp. 1-28.

Ososki A. y Kennelly E. 2003. Phytoestrogens: a Review of the Present State of Research. *Phytother. Res.* 17, 845-869.

Pal SK. 2005. Parental care in free ranging dogs, *Canis familiaris*. *Applied Animal Behaviour Science* 90; 31-47.

Patisaul, H.B., M. Dindo., P.L. Whitten and L.J. Young. 2001. Soy isoflavone supplements antagonize reproductive behavior and estrogen receptor alpha- and beta-dependent gene expression in the brain. *Endocrinology* 142(7): 2946-2952.

Pérez-Rivero JJ, Martínez-Maya JJ, Pérez-Martínez M, Aguilar-Setién A, García Suarez MD, Serrano H. 2009. Phytoestrogen treatment induces testis alterations in dogs. Potential use in population control. *Vet Res Commun* 33:87-95.

Pérez-Rivero JJ, Pérez-Martínez M, Aguilar-Setién A. 2014. Histometric analysis of vampire bat (*Desmodus rotundus*) testicles treated with coumestrol by oral route, *Journal of Applied Animal Research*, 42:2, 208-212.

Pike, A.C., A.M. Brzozowski., R.E. Hubbard., T. Bonn., A.G. Thorsell., O. Engström., J. Ljunggren., J.A. Gustafsson and M. Carlquist. 1999. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *The EMBO Journal* 18(17): 4608-4618.

Popa D.S., Bolfa P., Kiss B., Vlase L., Pâlinean R., Pop A., Cătoi C., Crisan G. y Loghin F. 2014. Influence of Genista tinctoria L. or methylparaben on subchronic toxicity of bisphenol A in rats. *Biomed Environ Sci.* Feb; 27 (2): 85-96.

Sandoval M., Ayala S., Oré M., Valdivieso L., Loli R., Ricra V. y Huaman O. 2005. Evaluación de la toxicidad hepática y renal aguda y subaguda del látex de *Croton palanostigma* (sangre de grado) en animales de experimentación. *An Fac Med Lima* 2005; 66(2) 119-126.

Serrano H, Pérez-Rivero JJ , Martínez-Maya JJ, Aguilar-Setién A, Pérez-Martínez M, García-Suárez MD. 2008. Fluorescence and immunohistological detection of estrogen receptors in dog testis and epididymis after oral coumestrol administration. *Neuroendocrinology Letters* 29:977-980.

Shen M, Shi H. 2015. Sex Hormones and Their Receptors Regulate Liver Energy Homeostasis. *Int J Endocrinol.* doi: 10.1155/2015/294278.

Singla, A.K., Çhawla, M., 2001. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects—an update. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 1047–1067.

Slater M., Di Nardo A., Pediconi O., Dalla P., Candeloro L., Alessandrini B. y Del Papa S. 2008. Free-roaming dogs and cats in central Italy: Public perceptions of the problem. *Preventive Veterinary Medicine* 84 27–47.

Tejada Cifuentes F. Hepatotoxicidad por fármacos. *REV CLÍN MED FAM* 2010; 3 (3): 177-191.

Tejos R., Padilla O., Pizarro M., Solís N., Arab J., Margozzini P., Miquel J., Riquelme A. y Arrese M. 2013. Niveles séricos de alaninoaminotransferasa en población chilena: análisis de los resultados de la encuesta nacional de salud 2009-2010. *Rev Med Chile*; 141: 909-916.

Varela F. 1994. Toxicidad sobre médula ósea provocada por estrógenos en la especie canina. *Centre Mèdic Veterinari.* Vol. 14, n. 4 pp. 199-214.