

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TÍTULO DE TESIS

*ESTUDIO DE LA NEFROTOXICIDAD CRÓNICA DEL INSECTICIDA
ORGANOFOSFORADO PARATIÓN METÁLICO EN RATA WISTAR.*

AUTOR

VICTOR HUGO FUENTES DELGADO

GRADO A OBTENER

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

COTUTORES

DRA. MA. CONSOLACIÓN MARTÍNEZ SALDAÑA

DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ

ASESOR

DR. JOSÉ LUIS REYES SÁNCHEZ

AGUASCALIENTES, AGS. DICIEMBRE 2011

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

**A.Q.B. VÍCTOR HUGO FUENTES DELGADO
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS MODALIDAD DIRECTA.
P R E S E N T E .**

Estimado (a) alumno (a) Fuentes:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"NEFROTOXICIDAD DEL INSECTICIDA ORGANOFOSFORADO PARATIÓX METÁLICO EN RATA WISTAR"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 5 de diciembre de 2011
"SE LUMEN PROFERRE"
LA DECANO



M. en C. MARTHA CRISTINA GONZÁLEZ DÍAZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES



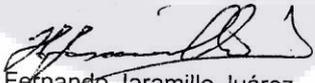
M. en C MARTHA CRISTINA GONSÁLEZ DÍAZ
DECANA DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

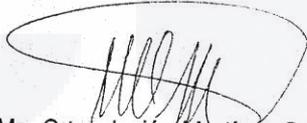
Estimada Maestra González Díaz

Por este conducto nos permitimos comunicarle que el trabajo de tesis doctoral **"Nefrotoxicidad del insecticida organofosforado paratión metílico en rata Wistar"** realizado por el **LAQB Víctor Hugo Fuentes Delgado**, estudiante de la 1° generación del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas modalidad directa, ha sido revisado y corregido por los miembros del Comité Tutorial, quienes están de acuerdo con el contenido. Por ello, cumple con lo establecido en los artículos 162, fracciones I, II y III y artículo 175 fracciones I y II del Reglamento General de Docencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

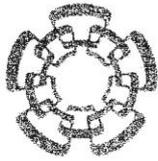
Sin otro particular, aprovechamos la oportunidad para saludarla cordialmente.

Atentamente
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes Ags., 30 de junio de 2011


Dr. Fernando Jaramillo Juárez


Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña

Cotutores



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

Junio 28. 2011

A QUIEN CORRESPONDA

La presente tiene por objeto hacer de su conocimiento que el A.Q.B. Victor Hugo Fuentes Delgado ha terminado con el componente experimental de su tesis doctoral y la escritura de la misma ha sido concluida.

Sin otro particular le reitero la seguridad de mi consideración distinguida.

DR. JOSÉ LUIS REYES SÁNCHEZ

Miembro del Comité Tutorial



Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
Nicolás San Juan No. 1511 Colonia del Valle
Delegación Benito Juárez C.P. 03100
México, D.F.
Tel: 9183-2060 Fax: 9183-2071
www.afmac.org.mx

Expediente: 352

México, D.F. a 12 de agosto de 2011

Dr. Fernando Jaramillo Juárez
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Presente

Estimado doctor Jaramillo:

Tengo el agrado de comunicarle que el artículo perteneciente a la sección **Trabajo Científico** intitulado:

“Hepatotoxicidad subaguda y crónica producida por el plaguicida paratión-metilico en la rata “

de los autores *Victor Hugo Fuentes Delgado, Cindy L. Quezada Aguilera, Ma. Consolación Martínez Saldaña, Fernando Jaramillo Juárez, Ma. Luisa Rodríguez Vázquez, Francisco Jaramillo González, José Luis Reyes Sánchez* ha sido aceptado para su publicación en la *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* en el Vol. 42, No. 3 julio-septiembre 2011.

La Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas está indizada a: Internacional Pharmaceutical Abstracts, Chemical Abstracts, EMBASE de Excerpta Medica, Latindex, Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnología del CONACyT (expediente No. 66688) y a la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, Epaña y Portugal (Redalyc).

Esperando contar nuevamente con material de su autoría, quedo de usted.

Atentamente

Por la superación Técnica y Científica

Dra. Dea Herrera Ruiz
Editora

c.c.p. Dra. Dea Herrera Ruiz Editora RMCF
c.c.p. Archivo AFMAC

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que participaron e hicieron posible la realización de este trabajo de tesis, muchas gracias por su apoyo y enseñanza: cotutores Dra. María consolación Martínez Saldaña y Dr. Fernando Jaramillo Juárez, asesor de tesis Dr. José Luis Reyes Sánchez, sin ustedes no hubiera sido posible.

A quienes participaron en la fase de experimentación: Lic. en C. N. María Luisa Vázquez por su instrucción en el manejo de los animales de experimentación, así como para la obtención y procesamiento de muestras biológicas; TQL Rosa Isela Sandoval Lozano por su apoyo en el aprendizaje de la técnica histológica y tinción de PAS; Biol. Keila Neri Alvarado Estrada por su asesoría para la obtención de imágenes por microscopía confocal en la Universidad autónoma de San Luis Potosí y Dr. José Luis Reyes Sánchez Romero por recibirme en su laboratorio y adiestrarme en la técnica de análisis de expresión genética por RT-PCR en la Universidad Juárez del Estado de Durango.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

DEDICATORIAS

A mis padres, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final.

A mi esposa por su gran apoyo, dedicación y entendimiento cuando salía de casa para ir a clase o de viaje con la finalidad de aprender nuevas técnicas o dar a conocer mi trabajo.

A mis hermanos, tíos, primos, abuelos y amigos. Gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional. Este trabajo es dedicado a ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

RESUMEN

El paratión metílico (PM) es un insecticida organofosforado (IO) que fue utilizado ampliamente en aplicaciones agrícolas y en menor grado en aplicaciones domésticas; actualmente está clasificado por la Agencia de Protección al Ambiente (EPA) con grado de toxicidad de categoría 1 por lo que su uso ha sido prohibido. La toxicidad primaria de este compuesto se debe a la inhibición de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE) generando la acumulación de acetilcolina (ACh) en las sinapsis colinérgicas. La toxicidad crónica de este pesticida ha sido muy poco estudiada, sin embargo existen reportes de alteraciones inmunológicas, genéticas y nefrotoxicidad; no obstante, tanto los mecanismos como las moléculas blanco que son afectadas por este pesticida son desconocidos, por lo que es importante realizar estudios con esta sustancia con el fin de elucidar estas incógnitas. En este trabajo se emplearon ratas Wistar machos (\approx 250 g de peso) las cuales se dividieron en dos grupos: intoxicado y control. El primero recibió 0.56 mg de PM en aceite de maíz, mientras que el segundo solo recibió el vehículo. Muestras de sangre y orina fueron tomadas antes de iniciar los tratamientos y posteriormente una vez a la semana. Al término de la 2^a, 4^a, 6^a y 8^a semana de tratamiento se extrajeron los riñones de los animales de experimentación; mientras que los hígados solamente se obtuvieron al término de la 4 y 6^a semana de intoxicación. Los parámetros evaluados en las muestras fueron: a) en sangre, creatinina y glucosa; b) en orina, flujo urinario, glucosa, creatinina, albumina, fosfatos, proteínas totales y actividad de la γ -glutamyltranspeptidasa; c) en corteza renal, concentración de glutatión reducido (GSH) y actividad de glutatión peroxidada (GPx), análisis por RT-PCR de los genes GAPDH, TNF- α y BAX; además se realizó un estudio histológico de los riñones empleando la tinción con Hematoxilina y Eosina (H/E) y las técnicas de PAS e inmunohistoquímica para la detección de Cl2 y DppIV, mientras que para la evaluación histológica de los hígados se utilizaron la tinción de H/E y la técnica de PAS. Al término de este trabajo se observaron alteraciones estructurales en los hígados de ratas expuestas a este IO, así mismo, se encontraron alteraciones en glomérulos y túbulos renales proximales generando modificaciones bioquímicas, funcionales, moleculares e histológicas; por lo que teniendo en cuenta estos resultados se concluye que el PM genera daño renal al exponer de forma crónica a bajas dosis a ratas Wistar machos adultos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Pesticidas</i>	1
1.2 <i>Clasificación de los pesticidas</i>	1
1.3 <i>Efectos sobre la salud por exposición a plaguicidas</i>	2
1.4 <i>Contaminación del ambiente por pesticidas</i>	4
2. <i>Pesticidas organofosforados (POF)</i>	6
2.1 <i>Mecanismos generales de toxicidad de los POF</i>	7
2.2 <i>Intoxicación con pesticidas organofosforados</i>	9
2.3 <i>Paratión metílico</i>	10
2.3.1 <i>Toxicocinética del PM</i>	12
2.3.1.1 <i>Absorción</i>	12
2.3.1.2 <i>Distribución</i>	13
2.3.1.3 <i>Metabolismo</i>	13
2.3.1.4 <i>Excreción</i>	15
2.3.2 <i>Toxicodinamia</i>	16
2.3.3 <i>Factores que Afectan la Toxicidad del PM</i>	17
2.3.4 <i>Poblaciones con alto riesgo de exposición</i>	18
3. <i>Riñones</i>	19
3.1 <i>La nefrona</i>	19
3.2 <i>Filtración glomerular</i>	20
3.2 <i>Reabsorción tubular</i>	21
3.2.1 <i>Secreción tubular</i>	22
3.3 <i>Nefrotoxicidad</i>	23
3.3.1 <i>Mecanismos de toxicidad renal</i>	23
3.3.2 <i>Sitios de daño en las nefronas</i>	25
3.4 <i>Indicadores de daño renal</i>	27
3.4.1 <i>Proteinuria</i>	27
3.4.2 <i>Microalbuminuria (MA) y Enzimuria</i>	27
3.4.3 <i>Creatinina</i>	28
3.4.4 <i>Glucosa</i>	29
3.4.5 <i>Daño a proteínas de unión intercelular</i>	29
ANTECEDENTES	35
JUSTIFICACIÓN	38
OBJETIVO GENERAL.....	40
OBJETIVOS PARTICULARES	40
HIPÓTESIS.....	40
MATERIALES Y METODOS	41
1. <i>Animales</i>	41
2. <i>Grupos experimentales</i>	41
3. <i>Descripción de las técnicas empleadas</i>	43
3.1 <i>Evaluación estructural de hígado y riñones</i>	43

3.1.1 Tinción con hematoxilina y eosina (H/E)	43
3.1.2 Técnica de PAS	44
3.1.3 Técnica inmunohistoquímica para la detección de Cl2 y DPPIV en los riñones	44
3.2 <i>Evaluación de la función renal</i>	45
3.2.1 Determinación de creatinina en plasma	46
3.2.2 Determinación de microalbuminuria y creatinina en orina.....	47
3.2.3 Determinación de fósforo en orina	47
3.2.4 Actividad de γ -glutamyl-transpetidasa	48
3.2.5 Determinación de proteínas totales	49
3.2.6 Glucosa.....	49
3.2.7 Glutación peroxidada (GPx)	50
3.2.8 Determinación de glutatión reducido (GSH)	51
3.2.9 RT-PCR.....	52
RESULTADOS	54
1. <i>Análisis histológico</i>	54
1.1 <i>Hígado</i>	54
1.2 <i>Riñones</i>	57
2. <i>Inmunohistoquímica</i>	61
3. <i>Análisis de parámetros bioquímicos de función renal y estrés oxidativo en corteza renal</i> . 62	
4. <i>Efectos en el nivel de expresión genética de TNF-α, BAX y BCL2</i>	64
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIÓN	74
ANEXO 1.....	76
ANEXO 2.....	77
ANEXO 3.....	78
GLOSARIO.....	90
BIBLIOGRAFÍA.....	91

INTRODUCCIÓN

1. Pesticidas

Los pesticidas o plaguicidas son sustancias químicas destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados como plagas. Dentro de esta denominación se incluyen productos orientados a matar insectos, hierbas, aves, mamíferos, peces, bacterias y hongos que compiten con los humanos para conseguir alimento, destruyen las siembras y propagan enfermedades. Aunque los pesticidas presentan una relativa toxicidad selectiva para la especie no económica, casi siempre son altamente tóxicos para otras especies que no son consideradas como plagas [Ortega-Ceseña, 1994].

El uso de pesticidas se multiplicó 32 veces de 1950 a 1986 en los países desarrollados, así mismo, los países en vías de desarrollo también los han empleado cada vez más en sus actividades agrícolas y en la actualidad consumen la cuarta parte de este tipo de productos manufacturados en el mundo, debido a su ayuda para incrementar la producción de alimentos y luchar en contra de enfermedades transmitidas por insectos u otros parásitos humanos como el tifus o la malaria. En México, el mercado de plaguicidas ha registrado un constante aumento: en 1960 se vendieron 14 mil toneladas; en 1977, 22 mil; en 1983, 34 mil, y en 1986, alrededor de 60 mil. Los insecticidas ocuparon en promedio el mayor porcentaje del mercado (51%), seguidos por los herbicidas (31%) y los fungicidas (15%). Los plaguicidas que se han utilizado en nuestro país pertenecen a diversos grupos, dentro de los cuales destacan: organoclorados (OC), organofosforados (OP), carbamatos, piretroides, triazinas, etc. [Piña-Guzman y col., 2006; Ortega-Ceseña, 1994].

1.2 Clasificación de los pesticidas

Existen diversos criterios para clasificar a estos compuestos, por ejemplo [Córdoba D., 2001]:

- a) **Según el organismo que eliminan:** herbicidas, insecticidas, acaricidas, fungicidas, roenticidas, molusquicidas y lampreicidas.

- b) **Destino de aplicación:** fitosanitario, destinados para sanidad vegetal o el control de vegetales; ganadero, empleados en animales o en actividades relacionadas con su explotación; usados en industria alimentaria, destinados a tratamientos de productos o dispositivos relacionados con la producción de alimentos; ambientales, para el saneamiento de locales u otros establecimientos públicos o privados.
- c) **Higiene personal:** aquellos preparados útiles para la aplicación directa sobre el hombre.
- d) **Domésticos:** preparados aplicados en viviendas o locales por personas no especializadas.
- e) **Según su formulación y presentación:** gases o gases licuados, fumigantes y aerosoles, polvos con diámetro de partícula inferior a 50µm, sólidos, líquidos y tabletas.
- f) **Composición química:** compuestos arsenicales, carbamatos, derivados de la cumarina, dinitrocompuestos, organoclorados, organofosforados, organometálicos, piretroides, triazinas y tiocarbamatos.
- g) **En función de su toxicidad:** de baja peligrosidad, peligrosos y altamente tóxicos.

1.3 Efectos sobre la salud por exposición a plaguicidas

Los pesticidas representan un riesgo para la salud y el ambiente. Si acaban con las plagas, es porque son sustancias tóxicas, por lo que su uso excesivo e inapropiado puede causar daños en la salud de los agricultores o poblaciones relacionadas [Castro R. y col., 2005; de la Iglesia Huerta y Delgado Cobo, 2000; Ortega-Ceseña y col., 1994].

Estos compuestos han sido asociados con diversos efectos tóxicos: cancerígenos, teratógenos, mutagénicos, espermatogénicos, fetotóxicos, neurotóxicos, nefrotóxicos o una combinación de varios de estos, tanto en seres humanos como en otras especies. Según la Academia Nacional de Ciencias de los EUA, solo se ha caracterizado el espectro toxicológico del 10% de los ingredientes activos comercializados de plaguicidas, para el 52% es incompleta y para los 38% restantes no hay información. Esta situación es crítica para conocer el efecto toxicológico sobre los humanos, ya que estos agentes constituyen un

riesgo para la salud a corto, mediano o largo plazo [Piña-Guzmán y col., 2006; Castro R. y col., 2005].

Los efectos tóxicos experimentados en los seres expuestos dependen del tipo de pesticida, la dosis, la vía y el tiempo de exposición. Las consecuencias agudas están asociadas a accidentes donde una sola dosis es suficiente para desarrollar signos y síntomas. En México, las intoxicaciones agudas por exposición laboral se producen por el uso de ropa o equipo inadecuado, escasa preparación del trabajador para cumplir las normas correspondientes y falta de supervisión experta durante actividades en las cuales la personas emplean estos compuestos, así como la toxicidad de los insecticidas utilizados, que algunas veces ya han sido prohibidos por los países desarrollados. Algunos de los puntos de exposición laboral y no laboral que poseen los humanos hacia este tipo de sustancias se mencionan en la tabla 1 [Durán-Nah y col., 2000].

Laboral	No laboral
Fabricación	Ingestión intencionada o accidental.
Formulación	Riesgo vivienda (almacenamiento, ropa trabajo, jardines caseros).
Transporte	Contaminación de suelos.
Almacenamiento	Contaminación de aguas.
Ventas Aplicación	Contaminación alimentaria: a) de la cadena trófica. b) no respetar plazos de seguridad. Contaminación atmosférica.
Trabajos agrícolas en zonas próximas	Utilización de envases vacíos de plaguicidas para otros usos.

Tabla 1. Tipos de exposición a los plaguicidas [de la Iglesia Huerta y Delgado Cobo, 2000]

Los efectos tóxicos crónicos como cáncer, leucemia, necrosis del hígado, malformaciones congénitas, neuropatías periféricas, malestar general, cefaleas persistentes y diversos tipos de dolor, se deben a exposiciones repetidas, a dosis bajas y tiempos prolongados, donde los síntomas y signos aparecen después de un largo tiempo (hasta años)

de la exposición al pesticida, dificultando su detección, a demás, dado que la biotransformación de algunos pesticidas es relativamente lenta, se generan efectos acumulativos en las personas expuestas. Particularmente, algunos efectos tóxicos que se han reportado en la población expuesta crónicamente a plaguicidas organofosforados incluyen: problemas de la piel, leucemia, linfoma no Hodgkin, aberraciones cromosómicas, alteraciones del funcionamiento hepático, aumento en la mortalidad y presencia de sintomatología general e inespecífica con niveles de colinesterasa normales o disminuidos dentro de los límites normales. [*Palacios-Nava y col., 1999*].

Con el aumento del uso de plaguicidas crecieron significativamente los accidentes y enfermedades asociadas. Según datos de la OMS, anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a los plaguicidas. De ese total, más de un millón de afectados pertenecen a países en desarrollo, en los cuales pueden ocurrir hasta veinte mil muertes anuales [*Fenske y col., 2000*].

1.4 Contaminación del ambiente por pesticidas

La contaminación es la presencia en el ambiente de cualquier agente físico, químico o biológico, o bien, la combinación de varios de estos agentes en lugares, formas y concentraciones tales que sean nocivos para la salud, para la vida vegetal, animal o humana, o impidan el uso normal de las propiedades y lugares de recreación y goce de los mismos. Los tipos de contaminantes pueden ser clasificados de diversas maneras, por ejemplo: de acuerdo al medio que contaminan (suelo, agua o aire), o según el origen de los contaminantes, es decir, si son naturales o antropogénicos. La contaminación natural se da por diversos fenómenos que se presentan normalmente en la naturaleza, tal es el caso de las emisiones volcánicas o la contaminación de pozos de agua profundos con arsénico (aguas fósiles). La contaminación antropogénica es generada por las diversas actividades humanas como la industria, uso de automóviles, asentamientos humanos que generan enormes cantidades de basura. Otra fuente de contaminación antropogénica muy importante es la actividad agrícola, la cual aumenta la salinidad, altera el pH del suelo, incrementa el consumo y la contaminación de agua, debido generalmente al uso de sustancias químicas que ayudan al agricultor a acrecentar la cosecha para satisfacer la alta demanda de alimentos. En este contexto, uno de los factores que ha ayudado a los agricultores a

satisfacer la demanda de grandes cantidades de alimentos es el descubrimiento y aplicación de los plaguicidas o xenobióticos que eliminan plagas u organismos considerados nocivos para la cosecha [*Smallwood y Green, 1981*].

Aunque los pesticidas han sido diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, su uso genera innumerables efectos indeseados, como la creación de organismos resistentes, la persistencia ambiental de residuos tóxicos y la contaminación de recursos hídricos con degradación de la flora y la fauna. Para lograr controles efectivos, evitando el desarrollo de resistencia en la especie a combatir se requiere incrementar las cantidades necesarias del pesticida o sustituirlo por agentes más tóxicos, lo cual es un problema, sobre todo para compuestos recalcitrantes. Los pesticidas organoclorados son un ejemplo de xenobióticos que persisten en el ambiente, pues permanecen en los suelos sin degradación significativa hasta 30 años después de su aplicación. La permanencia del pesticida favorece su incorporación a las cadenas tróficas y la acumulación en los tejidos grasos de animales y humanos (biomagnificación) [*Hodgson y Levi, 1997*].

Un medio o ecosistema muy importante que puede ser contaminado por pesticidas con relativa facilidad es el agua, esto a través de dos vías: a) directa, por la aplicación de pesticidas en los cuerpos de agua, por lavado de envases o equipos y por descarga de remanentes y residuos; b) indirecta, ocasionada por la lixiviación o infiltración de productos, caída por desniveles y por contaminación de suelos. Las aguas contaminadas expanden el tóxico a la flora y fauna generando la muerte de las especies expuestas, el aumento de la intoxicación humana y la probable contaminación de los mantos acuíferos.

Asimismo, la aplicación sistemática de plaguicidas altera los equilibrios existentes en las cadenas tróficas normales, al causar la desaparición o disminución de los enemigos naturales de distintas plagas, de organismos degradadores de materia orgánica e incorporadores de nitrógeno y de otras especies vitales para el ambiente. El empobrecimiento de la biodiversidad puede conducir a la proliferación de las especies antagónicas de las extinguidas, provocando nuevos desequilibrios ecológicos y nuevas plagas [*Hodgson y Levi, 1997*].

2. Pesticidas organofosforados (POF)

Químicamente son ésteres del ácido fosfórico y sus homólogos tiofosfórico y ditiofosfórico. Estos compuestos deben su carácter de pesticida principalmente al enlace fosfo-éster [Barr y Angerer J., 2006].

En la figura 1, la fórmula “a” representa al ácido fosfórico y la “b” a los derivados organofosforados. Los grupos sustituyentes en la molécula del ácido fosfórico pueden fijarse de manera directa o a través de un oxígeno al átomo de fósforo. En la estructura organofosforada los grupos B y B' corresponden a radicales alquilo o al oxidrilo (O-alquil) y radicales aril o ariloxi (O-arilo), respectivamente y se denominan grupos básicos; X constituye el grupo ácido que generalmente es un residuo de ácido orgánico o inorgánico, como diferentes grupos alquilo, alcoxi, arilo, tioles, etc. VI es un átomo del sexto grupo de la tabla periódica, usualmente oxígeno o azufre que se une al fósforo por un enlace doble. El grupo sustituyente en X es el más importante, ya que de éste dependen las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas del compuesto [Barr y Angerer, 2006; Hodgson y Levi, 1997].

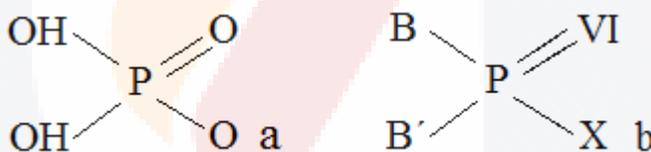


Figura 1. Estructura básica de un compuesto organofosforados. a) ácido fosfórico, b) derivado organofosforado

Los POF son ampliamente utilizados en la agricultura y como agentes de control para plagas domésticas. En ambientes abiertos (regiones agrícolas) no son persistentes, ya que son degradados por acción natural y por algunos microorganismos; sin embargo, cuando son usados a puerta cerrada (en casas o bodegas) estos compuestos pueden permanecer estables por periodos de tiempo muy extensos [Fenske y col., 2000; Piña-Guzman, 1999].

Algunos de los POF más comúnmente utilizados son: paratión etílico, malatión, paratión metílico, octo-metil-pirofosfato (OMPA), fenitrotión, ronnel, dimetoato, triclorfon, fentión y demetón. La porción fosfato, tio o ditiofosfato de las moléculas de estos

compuestos les imparten polaridad, por lo tanto, tienen diferentes grados de liposolubilidad [Hodgson y Levi, 1997].

Este tipo de pesticidas se pueden presentar como líquidos o sólidos, pero la mayoría de ellos vienen en forma de líquidos volátiles. Al respecto, su volatilidad es muy variable y aumenta con la temperatura, con lo cual se disminuye su acción residual al evaporarse y dispersándose fácilmente en el ambiente, sin embargo, desde el punto de vista toxicológico esta propiedad de volatilizarse es muy importante debido a que les permite ingresar rápidamente al organismo por vía respiratoria [Barr y Angerer J., 2006].

2.1 Mecanismos generales de toxicidad de los POF

La toxicidad en el humano y en otras especies animales puede darse por diversos mecanismos y en distintos órganos [Quina Li, 2007; Barr y Angere., 2006; Piña-Guzman, 2006; Chambres and Oppenheimer, 2004; Yélamos y col., 1992; IPCS, 1986]:

* **Acción directa sobre varios órganos y sistemas:** hígado, corazón, riñón, pulmón y sistema nervioso central.

* **Inhibición irreversible de la acetilcolinesterasa (AChE):** al ser inhibida deja de hidrolizar a la acetilcolina (ACh), permitiendo su acumulación en las sinapsis colinérgicas generando aumento de la duración e intensidad de la acción estimulante de este neurotransmisor sobre los receptores muscarínicos y nicotínicos provocando el cuadro típico de la intoxicación colinérgica caracterizada por los siguientes signos síntomas: rinorrea, salivación, lacrimación, taquicardia, dolor de cabeza, alteraciones respiratorias, convulsiones y muerte. La intensidad de estos síntomas depende del porcentaje de inhibición de la AChE (Tabla 2).

* **Neurotoxicidad retardada:** Los efectos neuropáticos retardados se pueden presentar en los seres humanos de 3 a 4 semanas después de la intoxicación aguda con algunos organofosforados. Los primeros síntomas son sensoriales (hormigueo y quemadura) y luego aparecen debilidad y ataxia en los miembros inferiores, pudiendo progresar a parálisis acentuada y, en casos graves, comprometer los miembros superiores. La recuperación es lenta y rara vez completa en los adultos, aunque en los niños se presenta un cuadro clínico

menos grave. El primer paso esencial para el inicio de los efectos neuropáticos retardados es la fosforilación de una enzima llamada esterasa neurotóxica.

% AChE inhibida	Nivel de Intoxicación	Síntomas clínicos	Pronóstico
50-60	Ligero	Debilidad, dolor de cabeza, vértigos, náuseas, salivación, lagrimeo, miosis y espasmo bronquial moderado.	Recuperación en 1-3 días
60-90	Moderado	Debilidad brusca, alteraciones visuales, exceso de salivación, sudoración, vómitos, diarrea, bradicardia, hipertensión, temblor de las manos y cabeza, alteración de la marcha, miosis, dolor torácico y cianosis de las membranas mucosas.	Recuperación en 1-2 semanas
90-100	Severo	Temblor brusco, convulsiones generalizadas, alteraciones psíquicas, cianosis intensa, edema de pulmón y coma.	Muerte por fallo respiratoria o cardíaco

Tabla 2. Porcentaje de inhibición AChE, severidad y pronóstico de la intoxicación por exposición aguda a POF [de la Iglesia y Delgado, 2000].

* **Genotoxicidad y estrés oxidativo:** Generada principalmente por los derivados alquilados de los organofosforados y por sus propiedades fosforilantes. Producen diferentes tipos de lesiones al DNA en los espermatozoides que incluyen: ruptura de cadenas sencillas y dobles, uniones cruzadas, aberraciones cromosómicas, oxidación de bases nitrogenadas y alteración de lípidos de membranas celulares y proteínas.

* **Inmunotoxicidad:** Los organofosforados pueden afectar los mecanismos de la respuesta inmune incluyendo la producción de anticuerpos y de interleucina 2, proliferación de linfocitos T, decremento de células CD5⁺ e incremento de células CD26⁺, aumento de autoanticuerpos, inhibición de las células asesinas naturales (NK), linfocina activadora de células asesinas (LAK) y disminución de la actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL). Se ha demostrado que los pesticidas organofosforados disminuyen la actividad de las CNK, CTL y LAK por los siguientes posibles mecanismos: inhibición de la degranulación del citoplasma de estas células por la inhibición de la actividad de las granzimas, por decremento del nivel de perforinas, granzimas y granulosinas citosólicas; por la inhibición de la transcripción de RNAm que codifica para las perforinas, granzima A y granulosina;

inhibición de la vía del ligando FAS y por la inducción de la apoptosis de células del sistema inmune.

***Alteraciones en la memoria:** La exposición crónica a los POF puede generar afección de la memoria y la concentración, desorientación, depresión severa, irritabilidad, confusión, dificultad para hablar, tiempos de reacción retardados e insomnio, entre otros.

2.2 Intoxicación con pesticidas organofosforados

Las intoxicaciones por insecticidas organofosforados son frecuentes durante los procesos de fumigación; Yélamos y col. (1992) reportaron en 187 personas expuestas a organofosforados por vía cutánea, respiratoria o digestiva que los síntomas más presentados fueron miosis, sialorrea y sudoración; mientras que las complicaciones más frecuentes incluyeron insuficiencia respiratoria, bronconeumonía y alteraciones hemodinámicas; Sin embargo, en este estudio se reportaron más síntomas y complicaciones que son mencionados en la Tabla 3.

Síntomas	Tipos de complicaciones
<i>Muscarínicos</i>	<i>Pulmonares</i>
Miosis, sialorrea, sudoración, broncorrea, bradicardia, hipotensión, vómito y diarrea	Insuficiencia respiratoria, distrés respiratorio y bronconeumonía
<i>Nicotínicos</i>	<i>Neurológicos</i>
Temblor/fasciculaciones Debilidad/paresia	Cuadro psicótico, ACVA y neurotoxicidad retardada
<i>Sistema nervioso central</i>	<i>Digestivas</i>
Estupor Coma Convulsiones Agitación Parálisis respiratoria	Insuficiencia hepática y pancreatitis aguda
	Cardiocirculatorias
	Inestabilidad hemodinámica, bloqueo AV completo, taquicardia supraventricular e isquemia miocárdica
	<i>Renales</i>
	Insuficiencia renal aguda Fallecimiento

Tabla 3. Intoxicaciones por insecticidas organofosforados. Sintomatología aguda y complicaciones [Yélamos y col., 1992].

En otro grupo de trabajadores expuestos a POF se observó un aumento en la frecuencia de aneuploidías espermáticas y un incremento de la fragmentación del DNA espermático. El riesgo de daño genético durante la espermatogénesis depende de distintas variables que incluyen la duración de la exposición y el estado de la espermatogénesis durante la exposición. La etapa meiótica es la más sensible a los agentes genotóxicos. Los espermatozoides poseen membranas ricas en ácidos grasos insaturados, y no cuentan con enzimas antioxidantes citoplasmáticas, condición que los hace altamente sensibles a la acción oxidativa de muchas sustancias [Piña-Guzman, 2006].

2.3 Paratión metílico

El paratión metílico (PM) es un insecticida organofosforado que ha sido usado mundialmente como alternativa para el DDT y otros pesticidas orgánicos clorados, lamentablemente, este pesticida no se degrada rápidamente, en aguas naturales a 20 °C y pH 7.4 tiene una vida media hidrolítica de 180 días y su metabolito con mayor toxicidad denominado paraoxón metílico (PO), tiene una vida media similar de 144 días provocando toxicidad en el ambiente (Tabla 4). En insectos y mamíferos, los pesticidas organofosforados deben su toxicidad primaria a la potente inhibición que producen sobre la AChE [Eyer y col., 2003; Finkelstein y col., 1988; Eigenberg y col., 1983].

Organismo afectado	DL50 y CL50
Peces	Casi todas las especies de peces de agua dulce y salada tienen CL ₅₀ comprendidas entre 6 y 25 mg/l, siendo pocas las especies con una sensibilidad importante al PM (IPCS, 1993).
Invertebrados acuáticos	Sumamente tóxico para los invertebrados acuáticos, estando comprendidas casi todas las CL ₅₀ entre <1 µg/l y unos 40 µg/l (IPCS, 1993).
Aves	Tóxico para las aves (DL ₅₀ aguda, vía oral, 3 a 8 mg/kg de peso). La DL ₅₀ vía alimentos oscila entre 70 y 680 mg/kg de alimento consumido.
Abejas	Es tóxico para las abejas (DL ₅₀ , 0,17 µg/abeja) (IPCS, 1993).

Tabla 4. Ecotoxicidad del PM [de la Iglesia y Delgado, 2000]

Este compuesto tiene la capacidad de fosforilar el grupo hidroxilo de las serinas presentes en el sitio activo de la AChE, inactivándola irreversiblemente y generando la

acumulación de acetilcolina (ACh) en las sinapsis colinérgicas (Figura 2). Como resultado de la acumulación de este neurotransmisor en las uniones neuromusculares, la despolarización del músculo esquelético es persistente provocando debilidad y fasciculación. Además, hay alteración de la transmisión nerviosa en el sistema nervioso central y periférico. La AChE también puede encontrarse en los eritrocitos, sin embargo su función en estas células es desconocida, aunque se cree que ayuda a mantener la permeabilidad de la membrana celular [Edwards y Tchounwou, 2005].

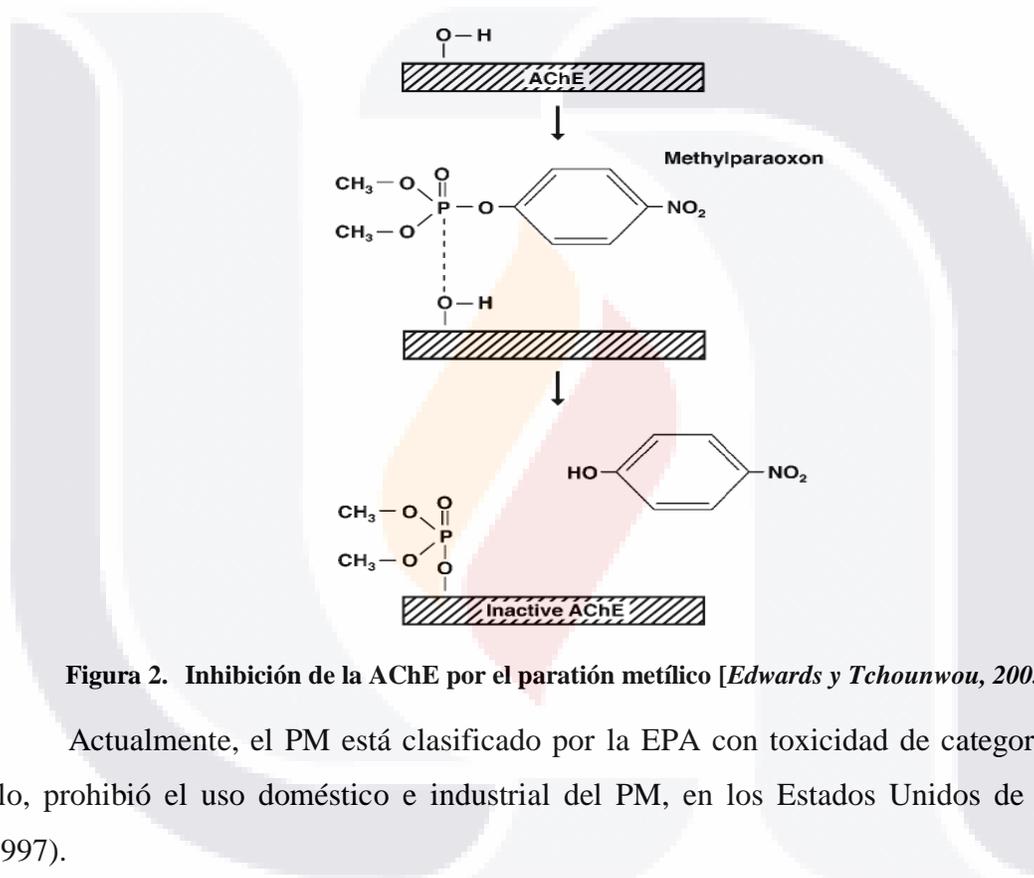


Figura 2. Inhibición de la AChE por el paratión metílico [Edwards y Tchounwou, 2005]

Actualmente, el PM está clasificado por la EPA con toxicidad de categoría 1, por ello, prohibió el uso doméstico e industrial del PM, en los Estados Unidos de América (1997).

Cuando este pesticida organofosforado se emplea de acuerdo a las instrucciones del fabricante, es degradado por la luz solar y bacterias que se encuentran en el suelo y el agua, y los trabajadores pueden reingresar al campo después de dos días de la aplicación, por lo que en países tercermundistas es usado para el control de gorgojos y otros insectos parecidos que afectan a los cereales como, cebada, maíz, sorgo, soya y trigo, así como en girasoles, algodón y alfalfa. Algunas características fisicoquímicas del PM se mencionan en la tabla 5 [Edwards y Tchounwou, 2005; Hryhorczuk y col., 2002; Rubin y col., 2002].

Propiedad	Característica
Sinónimo Peso molecular Color Estado físico Punto de fusión Densidad/peso específico Olor	Dimetil-nitrofenil fosforotionato 263.23 Blanco Sólido 37-38°C 1.36 Ajo o huevo podrido
Solubilidad	
En agua Constante de Henry's	50 mg/L 1.0×10^{-7} a 25 °C
Nombres comerciales	Azofos, Folidol M, Penntox MS, Unidol, Wolfatox, etc.
Tipos de preparados	Polvos, concentrado emulsionable, líquido ULV, polvos humectables. Las concentraciones varían desde el 1,5 % para los polvos hasta el 75 % para los EC, siendo un 50 % de éstos un preparado común.

Tabla 5. Características fisicoquímicas y presentaciones comerciales del PM [de la Iglesia y Delgado, 2000].

2.3.1 Toxicocinética del PM

2.3.1.1 Absorción

Debido a que es un compuesto liposoluble la absorción del PM ocurre a través del tracto gastrointestinal, tracto respiratorio y la piel (Tabla 6). En el humano, como resultado de una exposición laboral (contacto durante el transporte, formulación y aplicación) las principales rutas de contacto con este compuesto generalmente son las vías dérmica y aérea. El tiempo que tarda el PM en ser absorbido puede variar dependiendo de la vía de contacto, en conejos dosificados oralmente con 3 mg/Kg de PM disuelto en aceite de maíz, se observó que la fase de absorción se completó de 6-12 minutos [Edwards y Tchounwou, 2005; Eyer y col., 2003].

Tipo de toxicidad	DL50
Aguda	Vía dérmica: DL ₅₀ : 40-300 mg/Kg en diferentes especies de experimentación. Inhalación: CL ₅₀ : 34-320 mg/m ³ , 1 a 4 horas de exposición (ratas y ratones). Vía oral: DL ₅₀ en ratas es de 14 mg/Kg y 24 mg/Kg para machos y hembras respectivamente.
Subcrónica	El valor de la DSEO es de 1,1 mg/kg de peso corporal/día en ratas (vía oral) y de 10 mg/kg de peso corporal/día en conejos (vía dérmica).
Crónica	En un estudio con ratas se observaron daños en la retina y el nervio ciático con dosis elevadas (50 mg/kg en la alimentación).

Tabla 6. Estudios de toxicidad de PM con animales de laboratorio y sistemas *in Vitro* [de la Iglesia y Delgado, 2000].

2.3.1.2 Distribución

Por sus características hidrofóbicas, después de una hora de la exposición al PM, se pueden encontrar altas cantidades en hígado y riñón, horas o días posteriores se almacena una gran concentración del compuesto químico en tejido adiposo. En estudios de exposición dérmica, se ha observado que después de 12 horas, el tejido adiposo presenta la mayor cantidad de PM, seguido por los riñones, bazo, corazón, hígado, cerebro, placenta y tejidos fetales. En el caso del paraoxón (metabolito bioactivo del PM) su distribución muestra características muy similares a las del PM. [Edwards y Tchounwou, 2005; Abbas y col, 1996; Braeckman y col, 1983; Eigenberg, 1983]. Sin embargo aunque este xenotóxico tiende a acumularse en tejidos con alto contenido de lípidos por su carácter hidrofóbico también puede unirse a proteínas plasmáticas. Varios trabajos reportan la unión del 80-95% del PM absorbido a proteínas plasmática (dependiendo del modelo animal empleado); mientras que para el paraoxón debido a que es más hidrosoluble presenta menor unión a este tipo de proteínas [Edwards y Tchounwou, 2005; Abbas y col, 1996; Braeckman y col, 1983 y Eigenberg, 1983].

2.3.1.3 Metabolismo

El metabolismo de compuestos que funcionan como anticolinesterasa ocurre principalmente en el hígado de los vertebrados, seguido de los pulmones, cerebro, riñones e intestino, por lo que son tóxicos incluso en animales hepatectomizados. La acción directa del PM puede ser más peligrosa por inhalación que por ingesta, dado que estos químicos son rápidamente biotransformados; sin embargo, exposiciones repetidas por cualquiera vía, pueden provocar la inhibición acumulativa de AChE y por tanto muerte en pocos días. El

PM puede desarrollar una mayor potencia anticolinesterasa, es decir, mayor actividad inhibitoria de la AChE al experimentar un paso de desulfurización oxidativa. Este paso tóxico efectuado por distintas isoformas del CYP450 y otras flavinmonoxigenasas es generado principalmente en el hígado y los riñones de vertebrados y en el tracto digestivo en los invertebrados. Durante este proceso, un átomo de oxígeno reemplaza al átomo de azufre del PM, creando un primer intermediario, el cual posteriormente forma al paraoxón (Figura 3). Algunas otras rutas metabólicas menos comunes observadas en hígado humano obtenidos *post mortem* forman compuestos mono-metilados, o por medio de una nitroreducción crean al aminoparatión y acetamidoparatión [Eyer y col., 2003; Soranno y Sultatos, 1992; Finkelstein y col., 1988; Eigenberg y col., 1983].

Actualmente, por estudios de toxicocinéticos se sabe que el PM es eliminado mayoritariamente por los riñones en la orina, demostrando que su metabolismo está sujeto principalmente a reacciones de fase uno, además en estudios de microsomas hepáticos humanos, expresión de cDNA y análisis de isoformas de CYP450, se reportó que la desulfuración del PM que origina al paraoxón es generada por diversas isoformas de CYP450, dentro de las que destacan el CYP1A2 cuando la concentración de PM es menor a 10 $\mu\text{mol/L}$, el CYP2B6 a concentraciones intermedias, y el CYP3A4 a concentraciones de 10-250 $\mu\text{mol/L}$ [Eyer y col., 2003].

La reacción de desulfuración en la cual se libera azufre produce un intermediario altamente electrofílico que tiene la capacidad de inhibir a las isoformas del CYP450 uniéndose a las serinas presentes en el sitio activo de estas proteínas. Se ha observado que esta reacción suicida (aún en concentraciones de 10 $\mu\text{mol/L}$ de PM) puede inhibir del 50-70% del CYP3A4, CYP2C9 y CYP1A2 en 10 minutos [Eyer y col., 2003; Soranno y Sultatos, 1992].

A demás de la biotransformación del PM por las isoformas del CYP450, por hidrólisis tanto del PM como del paraoxón por distintas hidrolasas se obtienen los siguientes metabolitos considerados no tóxicos: ácido metilfosfórico (AMF), ácido dimetilfosfórico (ADMF), ácido dimetil-tiofosfórico (ADMTF) y p-Nitrofenol (pNp); además este último puede ser oxigenado para formar al 4-nitrocatecol (Figura 3) [Eyer y col., 2003; Soranno y Sultatos, 1992].

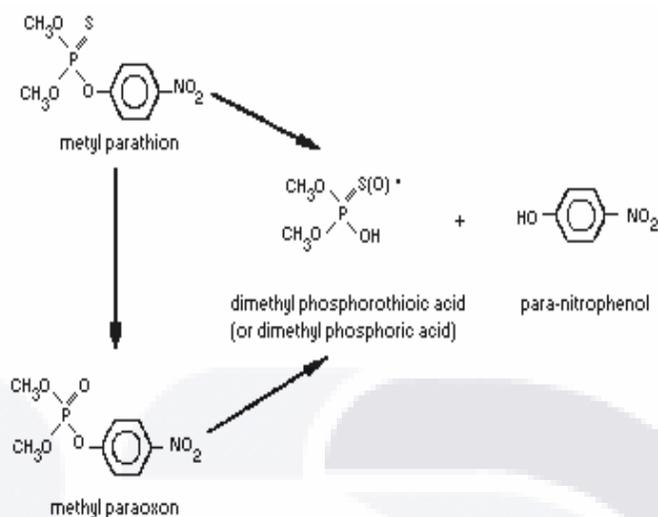


Figura 3. Biotransformación del PM [Eyer y col, 2003]

2.3.1.4 Excreción

Como ya se mencionó anteriormente los metabolitos del PM son excretados por los riñones en la orina mediante un proceso de secreción tubular, para lo cual emplean los transportadores de aniones orgánicos presentes en las células de los túbulos renales proximales denominados OAT1 y OAT3, que son intercambiadores de α -cetoglutarato por aniones orgánicos (AO) en la membrana basal de las células tubulares proximales y OAT4 y OATv1 en el polo apical de las mismas células (Figura 4) [Eyer y col., 2003].

La eliminación del PM y de su metabolito bioactivo paraoxón en pacientes envenenados, depende de la vida media de ambos, las cuales son de 30-56 h. y de 3-30 minutos respectivamente (dependiendo del modelo de experimentación). En humanos, la administración oral experimental de PM ha mostrado una excreción urinaria de pNp correspondiente al 70% del PM ingerido, por lo que este metabolito es empleado como marcador de exposición este pesticida, sin embargo, debe considerarse que la tasa de excreción urinaria del pNp y de sus conjugados, después de una exposición dérmica tiene un comportamiento rítmico diurno, a demás de que ésta excreción esta correlacionada con la temperatura ambiental (al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de absorción en piel y el depósito del PM en tejido graso). Sumado a lo anterior, existen variaciones circadianas en la biotransformación oxidativa del PM en el riñón. Se ha reportado retraso en la absorción de PM en el tracto gastrointestinal en personas envenenadas con altas

cantidades de este compuesto, generando fluctuaciones en la concentración plasmática de PM; este retraso puede tener explicaciones múltiples como por ejemplo: alteración de la absorción por el empleo de carbón activado durante el lavado gástrico, absorción retardada ocasionada por el solvente empleado en la formulación ingerida (aceites minerales, cetonas y compuestos aromáticos) y por parálisis gastrointestinal debida a una sobre atropinización por el tratamiento en contra de la intoxicación. Todos estos factores pueden modificar la tasa de eliminación del PM y sus metabolitos, por lo que deben de ser tomados en cuenta [Eyer y col., 2003; Abbas y col, 1996; Braeckman y col, 1983].

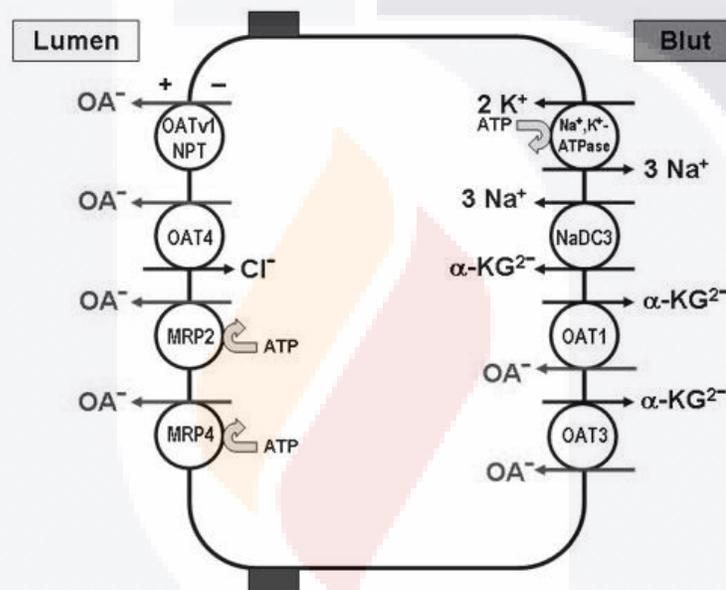


Figura 4. Secreción de aniones orgánicos en las células tubulares proximales [Eyer y col., 2003].

2.3.2 Toxicodinamia

Una vez absorbido y distribuido tanto el PM como el paraoxón tienen la capacidad de generar diversos efectos nocivos, por ejemplo, Eigenberg D. A. y col. (1983), propusieron que algunos de las consecuencias producidas por este pesticida en personas envenenadas se debían a la alteración de la corteza cerebral; más tarde Filkenstein y col. (1988) reportaron que este compuesto inhibe la actividad de la AChE en varias regiones del cerebro, sobretodo en la capa molecular del cerebelo y en el núcleo dentado y en menor grado en el ganglio basal y la materia gris del encéfalo. Luego, en 1992 Soranno y Sultatos reportaron en ratones expuestos a PM-[S³²] una amplia distribución de este pesticida en hipotálamo y

el bulbo olfatorio, seguido de la corteza cerebral, sin embargo, tomando en cuenta la masa relativa de estas regiones, determinaron que el orden decreciente de la concentración de PM en las diferentes zonas del encéfalo era la siguiente: corteza cerebral, hipotálamo y bulbo olfatorio.

El grado variable de inhibición de AChE por este compuesto organofosforados se debe a la presencia de varias isoformas de esta enzima, las cuales son afectadas diferencialmente, provocando algunos de los síntomas que experimentan las personas envenenadas con PM, como por ejemplo: incoordinación de movimientos, ataxia y alteración del habla [Eyer y col., 2003].

2.3.3 Factores que Afectan la Toxicidad del PM

Los pájaros y mamíferos son los más frecuentemente expuestos a diferentes clases de pesticidas a través de la ingestión de agua, semillas, follaje, etc. Estos residuos tienen la capacidad de modificar la respuesta del organismo a un determinado pesticida; además existen otros factores que pueden hacer variar la respuesta tóxica de un organismo ante un pesticida. A continuación se mencionan algunos de estos [Hryhorczuk y col., 2002; Hodgson y Levi, 1997]:

*** Interacción química e inducción enzimática.**

La exposición previa a organoclorados puede incrementar o disminuir la toxicidad del PM. En estudios con roedores se observó que al ser pre-tratados con pesticidas clorados, se incrementó la actividad hepática, disminuyendo la sensibilidad al PM. Por el contrario, cuando se usó DDE, la sensibilidad a dosis muy bajas de paratión incrementó significativamente. La inducción de las enzimas que se emplean para el metabolismo del PM se da por la exposición a sustancias que son metabolizadas por reacciones de desulfuración y diarilación, como por ejemplo, el fenobarbital, que induce varias isoformas del CYP450, esterasas y carboxilesterasas.

***Metabolitos ambientales del PM:**

La estabilidad del PM en el agua y los metabolitos generados por su degradación en el suelo constituyen una fuente de exposición que establece la necesidad de estudios para determinar las exposiciones ambientales (tabla 7). Es relevante la validación de las técnicas

analíticas, para la detección del compuesto *per se* y sus metabolitos. En el suelo el principal metabolito del PM que se genera como resultado de la capacidad de reducción de levaduras es el aminoparatión y el pNp que es producido por la hidrólisis química y capacidad hidrolítica de bacterias del suelo, a pH de 6.1-7.4.

Muestra	Vida media (días)	Constante de fotólisis
Agua de lago	25.6	2.71
Agua de río	24.6	2.82
Agua marina	27.3	2.54
Agua superficial	27.4	2.52
Agua destilada	35.4	1.96
Arcilla arenosa con marga	11.2	6.18
Arcilla con marga	5.6	12.39
Marga arenosa	9.1	7.58

Tabla 7. Vida media (días) y constantes de fotólisis del PM en muestras de agua y suelo [de la iglesia, Delgado 2000]

*** Temperatura.**

Otro factor importante que modifica la respuesta tóxica al PM es la temperatura. En codornices adultas se ha demostrado que una exposición continua a temperaturas tanto altas (37°C), o bajas (4°C) por 14 días, incrementa la toxicidad de este POF en exposiciones agudas.

2.3.4 Poblaciones con alto riesgo de exposición

De acuerdo a los criterios de la EPA (1986), se considera personal de alto riesgo para las intoxicaciones con PM a las personas con cuadros clínicos de glaucoma, enfermedades cardiovasculares, hepáticas, renales o anormalidades en el sistema nervioso central. La EPA (1999) estableció como límites máximo permisible en agua las siguientes concentraciones: 0.3 mg/L para 1-10 días de exposición en niños, 0.03 mg/L para tiempos de exposición mayores a 10 días en niños, y 0.002 mg/L para una exposición crónica durante toda la expectativa de vida de un adulto. Inicialmente, la OSHA propuso un Valor Límite Umbral (TLV) para la exposición laboral a PM de 0.2 mg/m³ por 8 horas de trabajo diario. Se recomienda que los trabajadores no se expongan a este pesticida a concentraciones mayores a 0.2 mg/m³ por 10 hrs. o que trabajen más de 40 hrs a la semana en contacto con este pesticida. La organización mundial de la salud ha aceptado una ingesta diaria de PM de

0.003 mg/kg de peso corporal, basándose en el Nivel de Exposición Máximo en el Cual no se Observan Efectos Adversos (NOAEL) de 5 mg/kg, el cual fue obtenido de estudios combinados en humanos [*de la Iglesia y Delgado 2000*].

3. Riñones

Los riñones son un par de órganos con forma de haba, ubicados por detrás del peritoneo en la pared abdominal posterior. En el humano cada riñón mide aproximadamente 11 x 5 x 3 cm, y pesa alrededor de 150 g. La región cóncava se denomina hilio renal y por ella ingresa la arteria renal y salen la vena renal y los conductos urinarios (pelvis renal). Cada riñón está cubierto por una capa de tejido conectivo denso denominado capsula. Internamente presenta un estroma de tejido conectivo laxo reticular que presenta una alta vascularización y terminales nerviosas. El parénquima renal está formado por la nefrona y los túbulos colectores [*Marieb, 2005; Guyton 1984*].

Los riñones participan de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal. Entre otras funciones, contribuyen a mantener constante la composición del medio interno excretando los productos de desecho del metabolismo celular (como la urea y la creatinina) y eliminando a los xenobióticos. Además, participan en la regulación del volumen de los líquidos corporales, del equilibrio ácido-base, del contenido de electrolitos y de la presión arterial. Tienen también función endocrina, con la secreción de eritropoyetina, vitamina D, prostaglandinas y renina [*Marieb, 2005; Guyton 1984*].

3.1 La nefrona

Es la unidad funcional del riñón. Cada riñón contiene aproximadamente 1 millón de nefronas constituidas por los siguientes elementos [*Guyton 1984; Marieb, 2005*]:

1) Corpúsculo renal. Constituido por los glomérulos y la cápsula de Bowman. La cápsula de Bowman está formada por una hoja parietal y visceral que limitan el espacio que recibe el filtrado glomerular. El glomérulo es una red de capilares fenestrados que surgen de una arteriola aferente, cubiertos por la hoja visceral de la cápsula de Bowman (podocitos y células mesangiales). La pared de los capilares glomerulares y los podocitos constituyen la barrera de filtración glomerular. La función del glomérulo es realizar el ultrafiltrado del plasma a partir del cual se formará la orina (filtrado glomerular).

2) Sistema tubular. Integrado por el túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y túbulo colector. Cada segmento es estructural y funcionalmente distinto, y en términos generales modifican la composición química y el volumen del fluido tubular para formar la orina. Existen 2 poblaciones de nefronas: corticales y yuxtaglomerulares. Las corticales tienen sus glomérulos en la corteza externa y poseen asas de Henle que descienden hasta la medula externa. Las nefronas yuxtaglomerulares tienen glomérulos que se encuentran cerca del borde corticomedular, y tienen asas de Henle largas que descienden profundamente en la medula interna y las papilas renales.

3.2 Filtración glomerular

Como antes se señaló, una de las principales funciones de los riñones es la formación de orina que permite la eliminación de desechos metabólicos y mantener el equilibrio hidroelectrolítico. Para esto, se forma un ultrafiltrado del plasma en los capilares glomerulares que pasa al sistema tubular y se modifica para formar la orina. La filtración glomerular se produce por el gradiente de presión hidrostática que hay entre la cápsula de Bowman y los capilares glomerulares. En los capilares hay más presión que en la cápsula de Bowman debido a que está “abierta” en el polo urinario. Esto permite la filtración de manera constante [Jaramillo y col, 2006; Marieb, 2005].

La barrera de filtración glomerular está formada por el endotelio capilar que presenta poros con un diámetro de ≈ 80 Amstrongs, una lámina basal compuesta por proteoglicanos y glicoproteínas y los pedicelos de los podocitos que abrazan las asas capilares limitando las hendiduras de filtración. Los poros mencionados permiten el paso de solutos con tamaño molecular por debajo de 80 Amstrongs, sin embargo, las proteínas del plasma no se filtran libremente. La albúmina, aunque tiene un tamaño de 60 Amstrongs, no filtra a través de estos poros, ya que posee una gran cantidad de grupos aniónicos, que le confieren una carga negativa, igual que los residuos de ácido hialurónico de los proteoglicanos presentes en la lámina basal de los capilares, generando un fenómeno de repulsión eléctrica [Jaramillo y col, 1989; Guyton, 1984].

-Presión oncótica.

Esta fuerza depende de la concentración de sustancias con propiedades coloidales como la albúmina. A medida que filtra la sangre, el plasma se concentra y, con esto, la presión

oncótica aumenta. Esta presión es menor en el inicio del capilar que al final del mismo. La presión oncótica es una fuerza que se opone a la filtración, debido a que cuando se incrementa, la retención de agua en el plasma es mayor [Marieb E. N., 2005; Guyton, 1984].

-Presión efectiva de filtración (PEF).

La PEF está determinada por el gradiente de presión hidrostática entre el capilar glomerular y la cápsula de Bowman. Se debe tener en cuenta que la presión oncótica se opone a la salida de agua del capilar glomerular. Como no se filtran proteínas, la presión oncótica de la cápsula de Bowman es casi nula. Para determinar la tasa de filtración es necesario conocer la PEF, la cual se puede determinar según la siguiente ecuación:

$$PEF = PH_{\text{capilar glom}} - PH_{\text{caps bowm}} - P_{\text{co cap glom}}$$

La tasa de filtración será obtenida al multiplicar la PEF por el coeficiente de filtración de la sustancia a determinar. El coeficiente de filtración es diferente para cada sustancia según sus características físico-químicas. Cuando se modifica la presión arterial sistémica, la filtración no varía. El riñón compensa activamente la presión arterial [Jaramillo y col, 2006; Guyton, 1984].

3.2 Reabsorción tubular

Al ingresar el filtrado glomerular en los túbulos renales se inicia el proceso de reabsorción, mediante el cual el agua y algunas sustancias disueltas en ella difunden o son transportadas activamente de la luz tubular a la sangre (capilares peritubulares), en los diferentes segmentos de las nefronas. Así, a medida que la solución tubular se va concentrando se establece un gradiente de concentración y se reabsorben también los xenobióticos que pueden atravesar pasivamente las membranas de las células tubulares [Jaramillo y col, 2006; Guyton, 1984].

Mediante el proceso de reabsorción, gran parte del volumen de agua y solutos filtrados por el glomérulo son reabsorbidos en el túbulo renal. De lo contrario, el volumen diario de orina excretada podría llegar a 160 L/día. En el túbulo proximal se reabsorbe del 65 al 70% del filtrado glomerular por una reabsorción activa de sodio que arrastra de forma pasiva al agua. Además de sodio y agua, en este segmento se reabsorbe bicarbonato, glucosa y aminoácidos filtrados por el glomérulo. En el asa de Henle se reabsorbe un 15%

del agua y un 25% del cloruro sódico y filtrados, de tal forma que el contenido tubular a la salida de este segmento es hipoosmótico respecto al plasma (contiene menos concentración de solutos). Finalmente, en el túbulo distal, además de secretarse potasio e hidrogeniones (estos últimos contribuyen a la acidificación de la orina), se reabsorben fracciones variables del 10% de sodio y 15% de agua restantes del filtrado glomerular [*Jaramillo y col, 2006; Guyton, 1984*].

En las células tubulares, el transporte de sustancias puede efectuarse por mecanismos activos o pasivos. En el primer caso el proceso consume energía, en el segundo no, efectuándose por el gradiente de potencial químico o electroquímico. Sin embargo la creación de este gradiente, puede precisar un transporte activo previo. Por ejemplo, la reabsorción activa de sodio por las células del túbulo renal, crea un gradiente osmótico que induce la reabsorción pasiva de agua y urea. Por estos mecanismos, la mayor parte del agua y sustancias disueltas que se filtran en el glomérulo son reabsorbidas y pasan a los capilares peritubulares y de nuevo al torrente sanguíneo. Así como existe la capacidad de reabsorber sustancias, el túbulo renal también es capaz de secretarlas pasándolas desde el torrente sanguíneo a la luz tubular [*Marieb, 2005; Guyton, 1984*].

Mediante estas funciones, reguladas por mecanismos hemodinámicos y hormonales, el riñón produce un volumen de orina de entre 500 y 2000 mL al día, con pH ácido (puede oscilar entre 5 y 8) y con densidad de 1.010 a 1.030. Estas variables, así como la concentración de los diversos solutos, variarán en función de las necesidades del organismo [*Marieb, 2005; Guyton, 1984*].

3.2.1 Secreción tubular

En la eliminación renal de compuestos endógenos y de xenobióticos participan mecanismos de secreción que contribuyen a desechar esos compuestos del organismo. La secreción se realiza mediante procesos de transporte activo localizados en el túbulo proximal de las nefronas y, para ello, las células proximales expresan proteínas transportadoras o acarreadoras con especificidad para diversos sustratos. Estas proteínas utilizan la energía derivada de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP) para realizar su función. De esta manera, la secreción tubular activa se define como “el transporte de una sustancia desde los

capilares peritubulares y el espacio basolateral hasta la luz de los túbulos renales” [Jaramillo y col, 2006].

Con base en la naturaleza química del sustrato transportado, los sistemas de secreción tubular han sido clasificados como acarreadores de ácidos orgánicos (aniones) y acarreadores de bases orgánicas (cationes). El uso de algunas técnicas de la biología molecular ha permitido caracterizar la estructura y la función de diversas proteínas transportadoras en los riñones [Jaramillo y col, 2006].

3.3 Nefrotoxicidad

Algunos tóxicos afectan la integridad renal produciendo diferentes grados de toxicidad. La respuesta a la acción tóxica varía desde aberraciones bioquímicas imperceptibles hasta necrosis que llevan a la muerte celular. Los xenobióticos pueden actuar en sitios específicos de las nefronas y afectar de manera selectiva la estructura o función de las células renales. El daño selectivo es un proceso complejo que puede ser atribuido a varias causas: diferencias en el flujo sanguíneo regional, transporte y acumulación de los xenobióticos en las células, reactividad de las moléculas blanco, equilibrio de reacciones de bioactivación-destoxificación, metabolismo energético y la eficacia de los mecanismos de regeneración y reparación celular [Jaramillo, 2006].

3.3.1 Mecanismos de toxicidad renal

Las sustancias tóxicas pueden dañar a las células renales por diferentes mecanismos como los siguientes [Jaramillo, 2006]:

a) Estrés oxidativo y sustancias alquilantes. Algunos xenobióticos son biotransformados en intermediarios reactivos (agentes alquilantes) capaces de producir daño celular. Los metabolitos con deficiencia de electrones se unen covalentemente a compuestos nucleofílicos de las células, como proteínas y lípidos. Esto interfiere la actividad biológica de las macromoléculas. Algunas sustancias pueden inducir estrés oxidativo al aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas últimas pueden producir daño tóxico por mecanismos como: peroxidación de lípidos, inactivación de enzimas por oxidación de grupos sulfidrilos o amino de estas proteínas, despolimerización de polisacáridos y por rotura de cromosomas y filamentos de ADN.

b) Volumen celular y homeostasis de iones. Estos procesos son necesarios para un buen funcionamiento de la reabsorción en las células epiteliales tubulares. Algunos tóxicos pueden alterar el volumen de agua y la concentración intracelular de iones al interactuar con la membrana plasmática y aumentar su permeabilidad a iones o eliminar la producción de energía. La pérdida de ATP inhibe la función de los transportadores que acarrean iones a través de la membrana; cuando disminuye el ATP, disminuye la actividad de la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ , generando la salida de iones de K^+ , entrada de Na^+ y Cl^- , conllevando a la tumefacción y lisis celular.

c) Citoesqueleto y polaridad celular. Algunas sustancias dañan la integridad de la membrana plasmática por la pérdida del borde en cepillo, formación de vesículas y alteración de la polaridad. Esto puede ser debido a cambios inducidos por los xenobióticos en los componentes del citoesqueleto y por interacciones entre éste y la membrana, o por alteraciones del metabolismo energético, o de la homeostasis de Ca^{+2} y fosfolípidos.

d) Mitocondrias y lisosomas. Algunos xenobióticos alteran la función o la estructura de las mitocondrias, modificando con ello los procesos celulares que dependen del ATP. A su vez, los lisosomas son el blanco de sustancias que inducen daño celular al romper su membrana y liberar la enzimas y diversos componentes almacenados en estas estructuras. La liberación de proteasas hacia el citosol degrada sustratos, como proteínas de membrana y del citoesqueleto, lo que puede conducir a la muerte celular.

e) Fosfolipasas. Se ha sugerido que la activación de la fosfolipasa A_2 (PLA_2), familia de enzimas que hidrolizan el enlace acilo de los fosfolípidos y generan ácido araquidónico y lisofosfolípidos, participa en el daño celular por varios mecanismos. Los lisofosfolípidos son tóxicos para las células porque alteran la permeabilidad de la membrana y desacoplan la respiración mitocondrial.

f) Endonucleasas. Se ha postulado que su activación participa en la muerte celular. Después de la isquemia renal ha sido observada la formación de estructuras escalonadas en el DNA, un marcador de activación de endonucleasas, lo que se ha relacionado con necrosis celular en los riñones isquémicos de ratas y en segmentos de túbulos proximales de nefronas aisladas, luego de un estado de hipoxia.

g) Alteración o destrucción de proteínas de unión intercelular. Esto afecta la permeabilidad selectiva de las células renales.

h) Genotoxicidad: refiere a la capacidad de algunas sustancias para causar un daño en el material genético (mutaciones), originando múltiples alteraciones que dependen del o de los genes afectados. Agentes mutágenos de gran importancia son aquellos que modifiquen o alteren el ciclo celular y/o el proceso apoptótico; ejemplos de este último proceso son los genes BAX y BCL2. BAX pertenece a la familia de genes tipo BCL2 y codifica para una proteína proapoptótica llamada bax, que en las células sanas de mamíferos se encuentra en el citosol y que al iniciarse la apoptosis es sometida a un cambio conformacional para permeabilizar la membrana mitocondrial externa y liberar al Citocromo c conllevando a la activación de las caspasas. Otro gen estrechamente relacionado con la apoptosis y la inflamación de los tejidos dañados es el TNF- α o Factor de Necrosis Tumoral alfa, el cual es una citocina que estimula la fase aguda de la reacción inflamatoria; químicamente es un glicopéptido formado por 185 aminoácidos, que procede de un propéptido de 212 aminoácidos, cuya liberación produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, conduciendo al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B y promoción de la apoptosis celular [Aguillón J. y col, 2002].

Existen diferentes razones por las cuales los riñones son blanco fácil de ciertos tóxicos: 1) debido a la reabsorción del 99% del agua filtrada, el tóxico puede alcanzar en el riñón concentraciones 100 veces mayores que en la sangre, 2) los riñones reciben aproximadamente 1160 ml/min de sangre (25% del gasto cardíaco) y, debido a esta gran perfusión, una sustancia tóxica en la sangre llegará con facilidad y en cantidades altas a los riñones y 3) las células renales proximales bioactivan varios xenobióticos en los segmentos S2 y S3 debido a que expresan diversas isoformas del CYP 450.

3.3.2 Sitios de daño en las nefronas

a) Daño en los glomérulos.

La presión arterial impulsa la salida del agua plasmática y sustancias disueltas en ella, por las fenestraciones de las células endoteliales de los capilares glomerulares, las cuales

alcanzan la membrana basal glomerular. Esta membrana constituye la barrera principal que determina lo que puede pasar o no a formar parte del ultrafiltrado glomerular. En efecto, la carga polianiónica de la membrana basal glomerular es un filtro electrostático altamente selectivo, ya que las cargas negativas repelen a las macromoléculas plasmáticas que tienen cargas negativas y favorecen el paso de moléculas neutras o cargadas positivamente.

En el desarrollo de los procesos inflamatorios de los glomérulos participan de forma relevante los mecanismos inmunológicos. En este contexto, los tóxicos pueden funcionar como haptenos al fijarse, mediante interacciones electrostáticas, a las cargas aniónicas de los capilares glomerulares, desencadenando la formación de anticuerpos (Ac). Esto conduce a la formación de depósitos inmunitarios dentro de los glomérulos y al daño de este tejido.

La mayoría de las lesiones inflamatorias de los glomérulos se describen en función de sus características histológicas y se engloban bajo el término de glomerulonefritis (GN). Las manifestaciones de las GN varían desde una forma quiescente que no evoluciona, o lo hace muy lentamente, hasta las GN que progresan rápidamente que en semanas pueden provocar un daño irreversible de los riñones.

b) Daño en túbulos proximales.

Sitio dañado más frecuentemente por los agentes tóxicos. Esto se debe a la acumulación selectiva de las sustancias químicas en estos segmentos de la nefrona. En efecto, la secreción de aniones y cationes orgánicos y el transporte celular de metales pesados y de sustancias conjugadas con glutatión permite su acumulación en las células proximales.

c) Daño en el asa de Henle, túbulos distales y colectores.

El daño inducido por los tóxicos en las estructuras más alejadas de los túbulos es poco frecuente. En estos sitios los cambios funcionales se manifiestan principalmente como alteraciones del transporte de sodio y de la capacidad de concentración y acidificación de la orina [*Jaramillo, 2006*].

3.4 Indicadores de daño renal

3.4.1 Proteinuria

La determinación de proteinuria es un viejo marcador de disfunción de la barrera de filtración glomerular y, por lo tanto, se considera patognomónico de enfermedad glomerular, además en los últimos años, ha tomado importancia como marcador de daño tubulointersticial y endotelial [Kachuchuru y col, 2007; Userpater e Inserta, 2004].

3.4.2 Microalbuminuria (MA) y Enzimuria

Descrita hace casi 40 años por Harry Keen (Londres) quien encontró que las pérdidas urinarias de albúmina, por debajo del rango de proteinuria, eran relevantes en la historia natural de la nefropatía diabética temprana. La MA es definida por la presencia de albúmina en orina en un rango entre 20 y 200 mg/L o la excreción urinaria de 30 a 300 mg en 24 horas. Muchas veces, en casos de MA anormal también se ha reportado filtración glomerular (TFG) levemente reducida (60-89 mL/min) siendo asociada con riesgo aumentado para enfermedad cardiovascular (ECV). Adicionalmente a lo anterior, concentraciones de albúmina en la orina entre 30 y 300 mg/dL han sido relacionadas con una respuesta vascular anormal y con la aparición de aterosclerosis [Kachuchuru y col, 2007; Özkurt y col, 2007; Userpater e Inserta, 2004].

Por lo anterior, la microalbuminuria es un signo de daño endotelial, renal, cardiovascular y aterosclerosis, sin embargo, en estudios epidemiológicos de poblaciones no diabéticas se ha observado que la prevalencia de microalbuminuria positiva es variable según el criterio de selección, la situación geográfica, la raza y/o la presencia de hipertensión arterial [Özkurt y col, 2007; Zhimei, 2007; Userpater e Inserta, 2004].

La detección de MA permite la identificación temprana de nefropatía incipiente y en forma más relevante predice el desarrollo de proteinuria clínica y de aumento de mortalidad. [Özkurt y col, 2007].

Enzimas y proteínas de bajo peso molecular medidas en la orina han sido usadas como marcadores tempranos de nefrotoxicidad, para detectar pequeños cambios en la función de las células epiteliales tubulares en diversas condiciones patológicas. El incremento de la enzimuria o de la presencia de sustancias de bajo peso molecular en la

orina se puede deber a un daño agudo o crónico de las células tubulares, lo que induce el escape hacia la luz tubular de enzimas o proteínas de bajo peso molecular. Las proteínas de bajo peso molecular son libremente filtradas a través del capilar glomerular y reabsorbidas por las células del túbulo proximal. Cuando la reabsorción no ocurre, o es insuficiente por sobrecarga (aumento del pasaje transglomerular), o por daño funcional o estructural de las células tubulares (efecto tóxico), las microproteínas son excretadas en cantidades anormales en la orina. Es así que las microglobulinas α -1 y β -2 (proteínas de bajo peso molecular) pueden ser utilizadas como marcadores de disfunción de las células del túbulo proximal [Userpater e Inserta, 2004].

3.4.3 Creatinina

La creatinina es un compuesto generado a partir de la degradación de la creatina, la cual es un nutriente útil para los músculos. Es un producto de desecho del metabolismo muscular producido por el cuerpo en una tasa muy constante y excretado en la orina. La medición de la creatinina es la manera más simple de monitorear la función de los riñones. Es filtrada principalmente por los glomérulos aunque una cantidad pequeña es secretada activamente. Hay una cierta reabsorción tubular de la creatinina, pero esta es compensada por la secreción tubular, la cual puede ser inhibida por algunos fármacos como la cimetidina, el probenecid y el trimetoprim. Si la filtración glomerular es deficiente aumentan los niveles de creatinina en la sangre. Este efecto es usado como indicador de la función renal. Una creatinina y un BUN más altos de lo normal también pueden ser indicativos de deshidratación cuando el cociente de BUN a creatinina es anormal, con niveles de BUN elevándose más alto que los niveles de creatinina. Los hombres tienden a tener niveles más altos de creatinina porque tienen músculos esqueléticos más grandes que los de las mujeres. Es importante remarcar que el ejercicio severo y una dieta alta en proteínas pueden aumentar la excreción de creatinina [Cíceiro y col., 1999].

El incremento de los niveles de creatinina en la sangre solamente es observado cuando hay un daño marcado en las nefronas, por lo tanto, esta prueba no es conveniente para detectar estados tempranos de enfermedad del riñón. Un indicador mejor de función renal es la depuración de creatinina, ya que es interpretada como una medida de la tasa de filtración glomerular, que puede ser calculada usando la concentración de creatinina en

plasma y orina recolectada durante 24 h., teniendo en cuenta las siguientes variables: sexo, edad, peso y raza [Cíceiro y col., 1999].

Los valores normales de creatinina en la sangre en humanos son aproximadamente 0,6 a 1,2 mg/dL en los varones adultos y 0,5 a 1,1 mg/dL en las mujeres adultas [Cíceiro y col., 1999].

3.4.4 Glucosa

La determinación de glucosa en sangre (glucemia) y orina (glucosuria) son útiles para el diagnóstico de numerosas enfermedades, de hecho son necesarias, una vez diagnosticada la diabetes, para controlar la dosis de insulina que se debe administrar para tratarla. En condiciones normales, la concentración de glucosa en la orina debe ser muy baja o inexistente, pero cuando su concentración en la sangre supera un determinado límite, empieza a ser eliminada a través de la orina y cuanto más cantidad de glucosa haya en la sangre, más se eliminará por la orina. Además, en la glucosuria intervienen otros factores como las funciones renal y vesical y la edad del paciente. [Navarro, 1995].

Los métodos para medir la glucosa en la orina pueden ser específicos o inespecíficos. Los primeros emplean la glucosa oxidasa para su determinación y los segundos usan el sulfato de cobre (reactivo de Benedict) como agente reductor y, por lo tanto, reaccionan como glucosa los monosacáridos y algunos medicamentos (ácido nalidíxico, ácido paraminosalicílico, ácido ascórbico, penicilamina, las sulfamidas, etc.). [Navarro, 1995].

3.4.5 Daño a proteínas de unión intercelular

Las células de todos los tejidos están unidas entre sí por proteínas que difieren en nombre, composición y función. Las uniones intercelulares pueden clasificarse en tres grupos funcionales: uniones estrechas, uniones de anclaje y uniones comunicantes.

- Uniones estrechas.

Las uniones estrechas son los contactos más íntimos entre las células adyacentes de un tejido, incluyendo al tejido renal. Estas uniones previenen la difusión de moléculas entre células adyacentes (hermeticidad de las uniones estrechas) y la migración lateral de las

proteínas y lípidos de membrana, generando así un dominio apical y un dominio basal. Los cambios en la hermeticidad de las uniones estrechas son cruciales en la función de los organismos superiores, debido a que es a través de los epitelios que el organismo intercambia sustancias con su medio. La hermeticidad de las uniones estrechas varía ampliamente de un epitelio a otro: la alta permeabilidad de las uniones estrechas en los segmentos proximales de la nefrona permite que, en esta porción, el transporte paracelular sea alto, en cambio, en la vejiga urinaria la baja permeabilidad de las uniones estrechas permite almacenar la orina e impedir el paso de agua, electrolitos y moléculas como urea y amoníaco en el torrente sanguíneo, a través de la ruta paracelular. Debido a estas importantes funciones de las uniones estrechas, el daño a este nivel derivado de la exposición a un xenobiótico, puede comprometer gravemente el funcionamiento de los riñones. La primera proteína descubierta de las uniones estrechas fue la ZO-1 y en el año 2000 ya se conocían 30 proteínas más. Actualmente, se han caracterizado otras familias de proteínas llamadas en conjunto ocludinas y claudinas, las cuales establecen interacciones con las ZO y con las proteínas del citoesqueleto, como los filamentos de actina [Alan y col., 2003].

- Claudinas.

La primera proteína de unión estrecha denominada claudina fue descubierta en 1990 y su primera isoforma la descubrieron Tusokita y (1998). Para el año 2006, ya se conocían al menos 24 isoformas de la familia de las claudinas: todas ellas son proteínas de 20 a 27 kDa con 4 dominios transmembranales, dos bucles extracelulares y una pequeña cola intracelular con terminación COOH [Balkovetz, 2006].

Todas las isoformas de estas proteínas poseen una distribución claramente tejido y segmento-específica (tabla 8), por lo que su propiedad para regular el tránsito intercelular de solutos difiere entre cada órgano y entre cada segmento del mismo tejido [Alan y col., 2003].

Debido a la gran importancia que tienen este tipo de proteínas en el tejido renal, varios investigadores se han dado a la tarea de revisar el daño renal a este nivel cuando se expone a organismos a ciertos xenotóxicos, sin embargo aún no se ha elucidado el mecanismo de acción tóxica de los mismos. Algunos iones metálicos que han sido

estudiados a la fecha y que se sabe que genera daño renal al alterar la estructura y función de las claudinas son el plomo y el cadmio. Esto ha sido demostrado en células en cultivo MDCK, e incluso en ratas hembra expuestas a cadmio, las cuales expresan una alteración de las claudinas 2 y 5 que se localizan en túbulo proximal [Jacquillet y col., 2007; Walter y col., 2007].

No. de Claudina	Localización tubular
1	T. distal y t. colector
2	T. proximal
3	T. proximal, asa de Henle y t. colector
4	T. proximal y t. colector
5	Ninguno
6	T. colector de recién nacido
7	T. proximal
8	T. proximal y asa de Henle

Tabla 8. Distribución tubular de claudinas [Reyes y col 2002].

Pero no solo los iones metálicos pueden generar daño o alteración de estas proteínas, Valthor Asgrimsson y colaboradores (2006) observaron que al aplicar acitromicina en células MDCK se alteró la expresión de las claudinas 1 y 4, ocludina y JAM-A.

4. Hígado.

El hígado es uno de los órganos más grandes del cuerpo humano, localizado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, por debajo del diafragma. Este órgano recibe sangre de la arteria hepática y de la vena porta que proviene del estómago y los intestinos. Al ser el primer órgano que recibe los nutrientes y xenotóxico provenientes del sistema digestivo, su capacidad de biotransformar estos compuestos es de vital importancia. El hígado lleva a cabo múltiples reacciones metabólicas para el mantenimiento de la homeostasis y el estado de salud general; además, es responsable de la conversión, almacenamiento y posterior liberación a la sangre de aminoácidos, lípidos, vitaminas, carbohidratos. Adicionalmente, la tasa de biotransformación hepática de xenobióticos convierte sustancia hidrofóbicas en derivados hidrosolubles que pueden ser excretados en orina o la bilis. De esta manera, el hígado funciona como un filtro de la sangre, removiendo nutrientes, productos anabólicos, catabólicos y toxinas [Jaramillo-Juárez y col 2006].

La vulnerabilidad del hígado a los agentes tóxicos se explica por su irrigación sanguínea y su gran capacidad para biotransformar xenotóxicos. El acceso directo de los hepatocitos a las sustancias tóxicas provenientes del sistema gastrointestinal junto a la elevada expresión de enzimas metabolizantes de estas células genera una tasa alta de conversión a metabolitos inactivos (detoxificación), sin embargo también produce moléculas tóxicas (bioactivación), a menudo intermediarios altamente reactivos, los cuales pueden conllevar a la muerte celular. Además las interacciones entre diferentes células en el hígado como hepatocitos, células de Kupffer y células endoteliales, pueden incrementar el efecto tóxico mediante los mecanismos de la respuesta inmune mediada por citocinas. El daño hepático aparece finalmente cuando los agentes tóxicos están presentes durante un periodo de tiempo determinado y en concentraciones suficientemente altas que rebasan la capacidad defensiva y de regeneración de éste órgano [Jaramillo-Juárez y col., 2006].

4.1 Organización estructural y funcional.

El hígado histológicamente se organiza en estructuras hexagonales llamadas lobulillos, los cuales en su centro poseen una rama de la vena hepática denominada vena centrolobulillar. En los vértices externos de varios lobulillos se encuentra una triada o tracto portal, constituido por una rama de la vena porta, una rama de la arteria hepática y un conducto biliar, acompañados de nervios y vasos linfáticos. El parénquima hepático está formado por cordones de hepatocitos que se disponen radialmente en torno a la vena centrolubulillar, los cuales reciben el flujo de sangre proveniente de los vasos sanguíneos portales mediante vasos sinusoides (Figura 5). Los nutrientes y xenobióticos entran en contacto con los hepatocitos mediante fenestraciones presentes en el endotelio vascular, de la misma forma los productos del desecho metabólico y las proteínas sintetizadas por los hepatocitos son secretados a los capilares para su drenaje a las venas centrolobulillares tributarias de las venas hepáticas y de allí a la circulación sistémica [Jaramillo-Juárez y col 2006; Ross y Pawlina, 2006].

Los lobulillos hepáticos se dividen en tres zonas: centrolobulillar, media y periportal. Sin embargo en este concepto de organización, la periferia de los lobulillos no está claramente definida, debido a la anastomosis sinusoidal entre lobulillos adyacentes, por lo que cada vena centrolobulillar es abastecida por varias vénulas portales. Por esta razón y

por diferencias regionales en oxigenación, funciones metabólicas y respuestas a diversas enfermedades, se propuso un concepto de acinos para definir la unidad funcional del hígado. Un acino hepático es una unidad sin periferia morfológica definida, su eje es el tracto portal, circunscribiendo la periferia por una línea imaginaria que conecta a las venas centrolobulillares. El acino también se divide en tres zonas de hepatocitos con diferentes niveles de oxigenación y función metabólica: Zona 1 altamente oxigenada y se encuentra más cercana al tracto portal; Zona 2 con oxigenación media y se localiza entre el tracto portal y la vena centrolobulillar; Zona 3 la menos oxigenada y la más cercana a la vena centrolobulillar [Jaramillo-Juárez y col 2006; Ross y Pawlina, 2006].

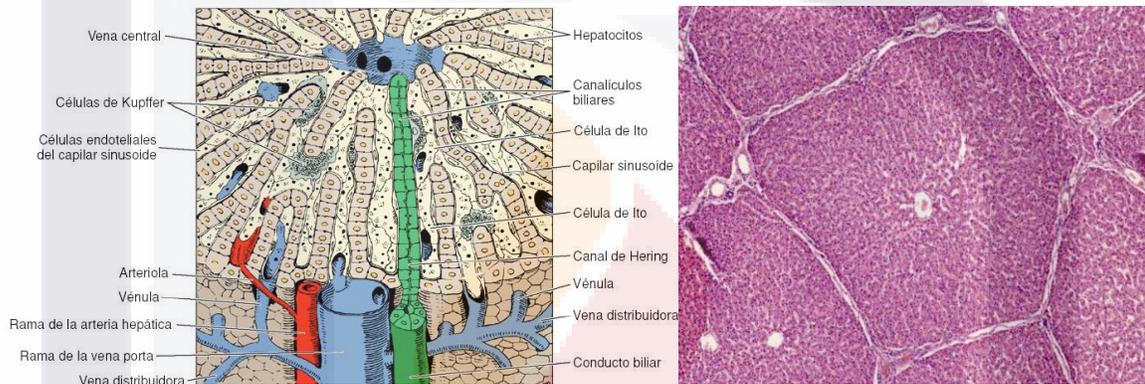


Figura 5. Organización estructural del hígado en lobulillos hepáticos

4.2 Mecanismos de daño hepático.

Los hepatocitos presentan mayor susceptibilidad al daño por algunos xenobióticos principalmente por ser el hígado el primer órgano de choque, por su alto gasto sanguíneo y su gran capacidad metabólica, de biotransformación y bioactivación de compuestos lesivos [Jaramillo-Juárez y col 2006].

La toxicidad ante un agente químico se presenta cuando el tóxico final, ya sea el xenobiótico original o un metabolito generado por su biotransformación, reacciona con su molécula blanco, o bien, altera el microambiente biológico en el cual operan las células, desencadenando una serie de eventos que conllevan a la disminución o daño celular a diversos niveles. Durante el daño hepático, ya sea agudo o crónico, los hepatocitos se exponen a cantidades elevadas de citocinas, bilis y compuestos oxidantes provocando la muerte de estas células. Sin embargo las células hepáticas poseen varios mecanismos protectores, que van desde sistemas de reparación del daño o inactivación de tóxicos como

las Glutación s-transferasas, superóxido dismutasa (SOD), agentes antioxidantes como el glutación (GSH), vitaminas E y C, y las enzimas de biotransformación tipo I y II que desactivas a los tóxicos. El balance entre los mecanismos de daño y protección definirá el resultado de toxicidad o salud [Jaramillo-Juárez y col 2006].

El hígado posee un alto contenido de citocromo P450 (enzima con gran número de isoformas) que puede generar compuestos electrofílicos capaces de generar toxicidad, necrosis celular y cáncer. Estos metabolitos son inestables y reaccionan generalmente *in situ* en el órgano que los produce, por lo que el hígado es gravemente afectado por estas reacciones [Jaramillo-Juárez y col 2006].

Uno de los mecanismos principales de daño al hepatocito radica en la bioactivación o formación de metabolitos reactivos o radicales libres a partir de los agentes hepatotóxicos, tales como el CCl₄, acetaminofeno, diclofenaco, tamoxifen, PM, etc. Uno de los efectos causados por los radicales libres es la peroxidación de lípidos desencadenando múltiples disfunciones celulares como disfunción de la fluidez de la membrana citoplásmica, alteraciones mitocondriales, afección de la actividad del citocromo P450 y de la glucosa 6-fosfatasa en el Retículo Endoplásmico Liso (REL), ruptura de la membrana de los lisosomas con liberación de sus enzimas. Tres de los patrones de daño hepático más comunes son los siguientes [Jaramillo-Juárez y col 2006]:

- a) **Esteatosis:** también conocida como degeneración grasa, generada por el alto abastecimiento de ácidos grasos del hígado, interferencia con el ciclo de los triglicéridos, incremento en la síntesis o esterificación de ácidos grasos, disminución de la oxidación de ácidos grasos, disminución en la síntesis de apoproteínas, etc.
- b) **Muerte celular por necrosis:** caracterizada por el edema celular, ruptura de su membrana citoplásmica y salida de los componentes celulares, desintegración del núcleo y la atracción de células del sistema inmune.
- c) **Fibrosis:** Causado por la muerte celular vía apoptosis o necrosis, produciendo cicatrización con aparición de abundantes fibras de colágeno I conduciendo a la pérdida de la función del hígado.

ANTECEDENTES

Como ya se mencionó en la introducción los principales efectos adversos provocados por el PM se deben a la inhibición de la AChE y de otras proteasas de serina como algunos factores de la coagulación sanguínea y colinesterasas plasmáticas, los seres vivos intoxicados puede desarrollar más patologías, por ejemplo, de Beer y col. (1980) reportaron en muestras histológicas de hígado, pulmón, riñón y bazo obtenidas *post mortem* de una mujer envenenada con PM lo siguiente: congestión capilar y de espacios alveolares con gran cantidad de material eosinofílico, vacuolización de los hepatocitos ocasionada por un cambio graso centrolobular e infiltración de linfocitos en los espacios portales, nefrosclerosis benigna, congestión de los capilares glomerulares y medulares, edema en células tubulares proximal y presencia de material granular amorfo en la luz del túbulo; mientras que en el bazo observaron congestión de la pulpa roja, con pequeñas hemorragias abundantes. Algunos otros daños reportados en humanos incluyen: lesiones en músculo esquelético, inflamación tardía del endotelio vascular (después de 9 días de la intoxicación aguda), congestión de la mucosa del esófago, petequias hemorrágicas esofágicas y edema pulmonar (en exposición aérea) [Eyer y col., 2003; de Beer y col., 1980].

Además de las lesiones orgánicas y tisulares antes mencionadas también se ha identificado intercambio de cromátides hermanas en linfocitos, alteración de la estabilidad y conformación del ADN [de la Iglesia y Delgado, 2000]. Piña-Guzmán y col. (2006), demostraron que este compuesto produce daño en el DNA del epitelio germinal del ratón, después de una dosis única, en las células del epidídimo e incluso en espermatozoides maduros. Además, en estudios adicionales hechos por los mismos autores describen alteraciones en la viabilidad espermática así como en su motilidad y morfología.

Actualmente no existen estudios suficientes sobre toxicidad crónica causada por el PM, debido a que su toxicidad relativamente alta permite que pequeñas dosis conlleven a daños inmediatos de forma aguda. Además existen pocos reportes sobre la toxicidad de este compuesto sobre el riñón; sin embargo, Jaramillo-Juárez y col. (1989) demostraron en el riñón de crías de ratas Wistar expuestas a paratión etílico durante el desarrollo prenatal, disminución de actividad de la ATPasa dependiente de Mg^{+2} , mientras que la ATPasa dependiente de Na^{+} y K^{+} , glutatión-s-transferasa y esterasas del mismo órgano no fueron

afectadas, concluyendo que este pesticida al ser administrado en ratas preñadas altera selectivamente la ATPasa dependiente de Mg^{+2} en la descendencia de las ratas expuestas in útero.

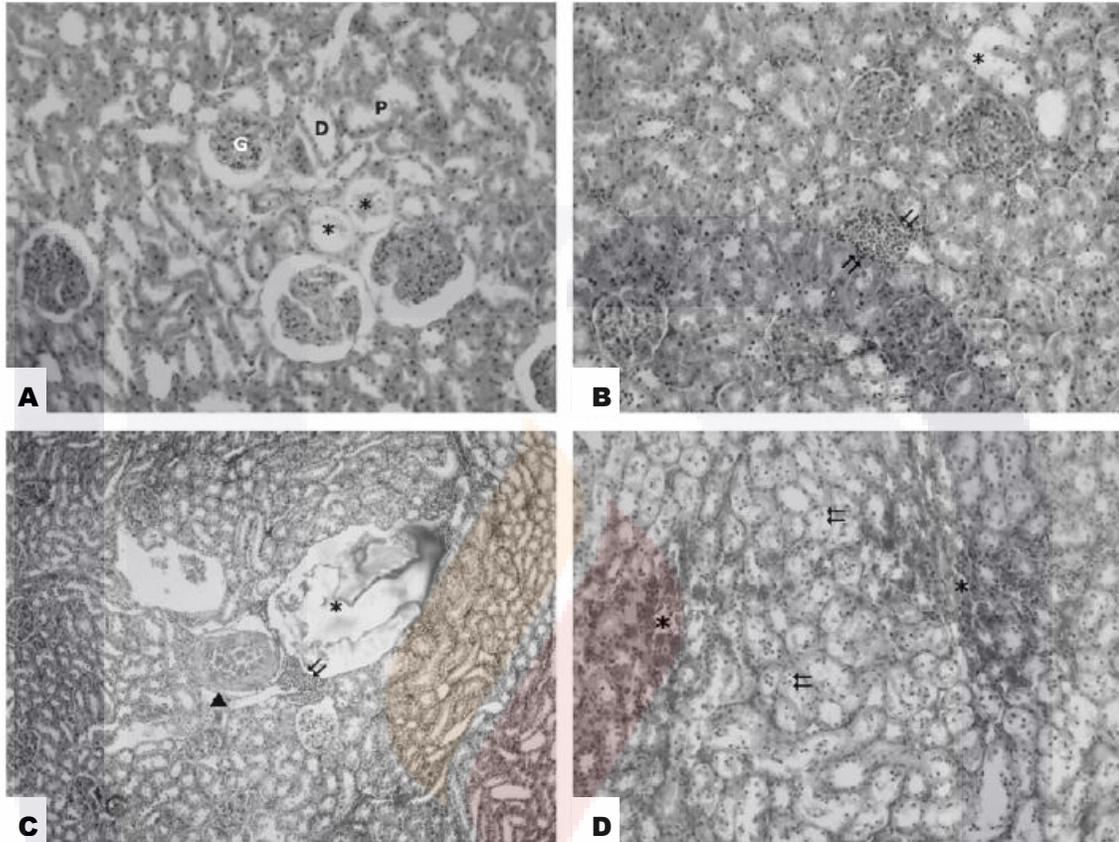


Figura 6. Tratamiento por 4 semanas con paratión metílico (200X). B) Tratamiento por 4 semanas con paratión metílico y vitaminas C y E (160X). C) Tratamiento por 7 semanas con paratión metílico (140X). D) Tratamiento por 7 semanas con paratión metílico y vitaminas C y E (140X). Atrofia glomerular (G), dilatación vascular, calcificaciones y necrosis (*), infiltración de células inflamatorias y degeneración tubular (flechas) y edema (triángulos).

Por otra parte, Dikshith y col. (1978) reportaron en ratas machos expuestos por 90 días a PM y lindano, lesiones histológicas y bioquímicas en hígado, testículo, y en menor grado en riñón. A su vez, Kalender y col. (2007) demostraron daño renal en ratas Wistar expuestas por vía oral a PM durante 7 semanas, señalando las siguientes alteraciones: dilatación de la cápsula de Bowman y atrofia glomerular a las 4 semanas de exposición (Figura 6b), edema y necrosis con infiltración de células inflamatorias en el tratamiento de 7 semanas (Figura 6d). En un grupo tratado con PM y vitamina C durante 4 semanas reportaron: infiltrado de células inflamatorias en el espacio intersticial y algunos túbulos

dilatados, calcificación, degeneración tubular y una leve infiltración de células inflamatorias (Figura 6c). Así mismo, registraron incremento de malondialdehído (MDA) en las muestras al término de la 4^a y 7^a semanas de exposición a PM, por lo que concluyeron que el este agente causa daño al riñón por estrés oxidativo, el cual se produce por la acción de los radicales libres sobre distintas células. Un radical libre (RL) es una molécula o átomo que contiene electrones no apareados. Estos agentes químicos tienen en uno de sus orbitales externos solo un electrón que los hace inestables y altamente reactivos. Aunque el nivel de estabilidad varía, los RL más reactivos son los derivados de oxígeno, que poseen una vida media que varía de nanosegundos a milisegundos. Los RL pueden actuar como oxidantes (robando un electrón) o como reductores (donando el electrón no apareado), característica que les permite producir reacciones en cadena [Castillo y col., 2003].

JUSTIFICACIÓN

El uso de pesticidas se ha incrementado en gran medida desde 1950 en países desarrollados y en vías de desarrollo. En México, en 1960 se comercializaron 14 mil toneladas; en 1977, 22 mil; en 1983, 34 mil y en 1986 alrededor de 60 mil, de las cuales el 51% eran insecticidas y, de este porcentaje, los organofosforados fueron usados con mayor frecuencia [Ortega-Ceseña y col., 1994].

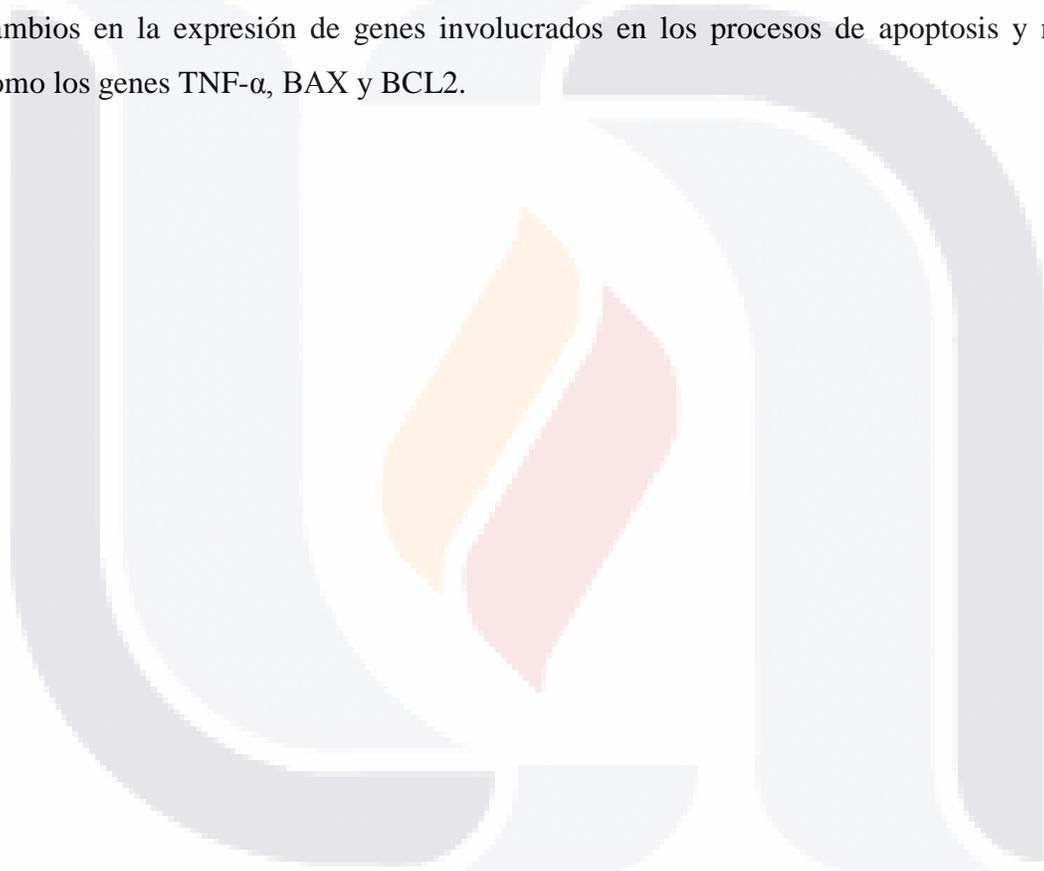
Con el aumento del uso de plaguicidas, se ha incrementado la aparición de enfermedades y alteraciones en el humano asociadas a la exposición a estos, como efectos cancerígenos, teratógenos, mutagénicos, espermatogénicos, fetotóxicos, neurotóxicos, nefrotóxicos o una combinación de varios [EPA; Ortega-Ceseña y col., 1994].

Dentro de los pesticidas organofosforados ampliamente usados en zonas agrícolas es el paratión metílico, y se han reportado muchos casos de intoxicaciones laborales generadas por este insecticida debido principalmente a su DL_{50} y su liposolubilidad que le permite ser absorbido por vía pulmonar, oral y cutánea. Aunque los efectos observados durante intoxicaciones agudas son derivados de la inhibición de AChE, también es capaz de producir alteraciones en la histoarquitectura renal de ratas Wistar expuestas crónicamente a pequeñas concentraciones; no obstante, este tipo de daño no ha sido debidamente estudiado y descrito. En humanos el daño crónico sobre los riñones por exposición a PM podría conducir a Enfermedad Renal Crónica o Insuficiencia Renal Crónica (ERC o IRC), provocando limitación y reducción progresiva de la función renal, alterando la homeostasis de líquidos del organismo conduciendo finalmente a la muerte. La IRC avanza lenta y progresivamente, con etapas iniciales asintomáticas, sin embargo cuando la función renal es inferior a la décima parte de la función normal los efectos a la salud son evidentes. Este tipo de enfermedades generan grandes gastos para la sociedad y la familia involucrada, por lo que es de vital importancia identificar los factores que aumenten el índice de la enfermedad y abolirlos [Narayana y col 2006; Florentín, 2001; Valenzuela y col., 1996].

Un factor que contribuye a la exposición al PM, es la presencia de este plaguicida en muestras de suelo, agua y alimentos de consumo humano. Con ello, la magnitud del contacto de algunas comunidades hacia este plaguicida (principalmente comunidades cercanas a zonas agrícolas) es considerablemente grande, aumentando el riesgo de presentar

nefropatías, principalmente en niños y adultos mayores, que son los sujetos más sensibles de la población.

Aunque en la actualidad es conocido que la exposición crónica a bajas concentraciones de PM causa efectos nefrotóxicos y estrés oxidativo, el mecanismo y las moléculas blanco de este xenotóxico permanecen desconocidas. Es importante estudiar si el PM es capaz de generar estrés oxidativo en los riñones como el Cd y Pb, alterando la estructura de claudinas, conduciendo al desarrollo de neuropatías como IRC, así como cambios en la expresión de genes involucrados en los procesos de apoptosis y necrosis como los genes TNF- α , BAX y BCL2.



OBJETIVO GENERAL

Analizar las alteraciones estructurales subagudas en el hígado y la nefrotoxicidad crónica causada por el insecticida organofosforado paratión metílico en ratas Wistar machos adultos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Determinar las alteraciones histológicas en el hígado de ratas Wistar machos causadas por exposición subaguda a paratión metílico.
- b) Analizar en los riñones de ratas Wistar machos expuestos crónicamente a paratión metílico:
 - 1) La arquitectura histológica.
 - 2) La distribución de la proteína de unión intercelular Claudina 2 (Cl2).
 - 3) Las alteraciones bioquímicas y funcionales.
 - 4) La expresión de los genes GAPDH, TNF- α , BCL2 y BAX

HIPÓTESIS

La exposición subaguda de ratas Wistar machos a paratión metílico, en concentraciones bajas, produce alteraciones estructurales en el hígado, así mismo, la exposición crónica a este pesticida, ocasiona daño en los riñones que se refleja en alteraciones de parámetros bioquímicos, moleculares e histológicos.

MATERIALES Y METODOS

1. Animales

Ratas Wistar machos (\approx 250 g de peso) fueron colocados en jaulas metálicas con cama de serrín, alimento y agua *ad libitum*, con ciclos de 12 h de luz/oscuridad y a temperatura ambiente, tratadas según la Guía de Principios en el Uso de Animales en Toxicología [Kalender y col., 2007; Narayana y col., 2006].

2. Grupos experimentales

Los animales de experimentación fueron divididos en dos grupos: a) Grupo intoxicado, al que se le administró, por vía oral, cada tercer día, 0.56 mg/Kg de PM disuelto en aceite de maíz (1/25 de la DL50 oral), durante 8 semanas (Imagen 1 A-C); b) Grupo control, que recibió aceite de maíz en volúmenes equivalentes a los del grupo intoxicado del mismo modo y tiempo.

Las ratas de cada grupo fueron colocadas en jaulas metabólicas para colectar orina de 24 h, además, se extrajeron muestras de sangre por punción de la arteria caudal. La obtención de muestras de sangre y orina se llevó a cabo una vez antes de iniciar los tratamientos y cada 7 días después de haberlos iniciado (Imagen 1 D-I). Al término de la 4^a y 6^a semana de tratamiento los hígados de las ratas fueron extraídos con previo lavado *in situ* empleando solución salina 0.9% adicionada con 2g procaína y 1 ml de heparina de 5000 UI por litro de solución, inyectada con bomba de perfusión Modelo 475, No de serie 3033, marca New England Medical Instruments INC. (NEMI); enseguida los órganos fueron fijados con formol neutro 10.0%. Al culminar la 2^a, 4^a, 6^a y 8^a semana de intoxicación, los riñones de los animales de experimentación fueron extraídos con previo lavado *in situ* usando la solución antes mencionada (Imagen 1 J-L). Posteriormente uno de los riñones fue fijado en formol neutro 10.0 % para histología; el segundo fue seccionado en dos partes iguales, una de ellas se fijó y preservó en nitrógeno líquido para inmunodetección de CL2 y DPPIV, mientras que la parte restante se colocó en trizol para análisis de expresión genética [Kalender y col., 2007].



Imagen 1. A-C: Determinación del peso de los animales para cálculo de la dosis y administración oral del paratión metílico. D-F: Obtención de muestra de orina (24 hrs) en jaulas metabólicas para la evaluación de parámetros bioquímicos. G-I: Obtención de muestra de sangre por punción de arteria caudal para la determinación de creatinina en plasma. J-L: Lavado *in situ por* perfusión de la solución lavadora para obtención de los riñones e hígado.

3. Descripción de las técnicas empleadas

3.1 Evaluación estructural de hígado y riñones

Los hígados y riñones de las ratas fijados en formol al 10.0% fueron procesados mediante la técnica histológica por inclusión en parafina, la cual consiste en deshidratar los órganos haciéndolos pasar por alcoholes en concentraciones crecientes (1 lavado en agua destilada, 1 lavado en alcohol al 80%, 2 en alcohol al 96%, 3 en alcohol absoluto, 1 alcohol-xilol), posteriormente se aclaran los tejidos en 2 baños de xilol y se infiltran con parafina fundida empleando 2 baños mas; todo el proceso se llevó a cabo en el Histoquinet marca Leica, modelo TP1020, USA. Al término de este proceso se elaboraron bloques de parafina con cada una de las muestras de los riñones e hígados empleando el centro de inclusión marca Leica, modelo EG1150C, USA. Posteriormente se realizaron cortes de 4-5 μm de espesor empleando el microtomo Leica modelo RM 2125RT, USA, los cuales fueron teñidos con las técnicas de hematoxilina y eosina (H/E) y ácido periódico de Schiff (PAS). La observación de estas preparaciones se realizó empleando el microscopio binocular compuesto de campo claro marca Leica, modelo ATC 2000, USA. Para determinar las alteraciones en la arquitectura histológica se revisó en su totalidad las preparaciones procedentes de los hígados y riñones de cada rata (3 cortes por portaobjeto y 4 repeticiones por grupo de experimentación) [*Proper E.B y col., 1994*].

3.1.1 Tinción con hematoxilina y eosina (H/E)

Los cortes de los tejidos fueron desparafinados empleando 2 baños de xilol durante 5 minutos c/u y posteriormente hidratados en baños de 2 minutos con alcoholes a las siguientes concentraciones: 100, 96 y 70 %. Posteriormente, se sumergieron en agua destilada durante 2 minutos; transcurrido este tiempo, las laminillas fueron teñidas con hematoxilina durante 3 minutos, posteriormente se colocaron en alcohol ácido por 4 segundos y se neutralizaron con carbonato de litio durante 4 segundos; inmediatamente después, se lavaron empleando agua corriente por 10 min. Al término de este tiempo, las laminillas se contratiñeron con eosina durante 2 minutos, se deshidrataron usando dos baños de alcohol al 70%, 2 baños de alcohol al 96% y 2 baños en alcohol al 100 %, durante

2 minutos cada uno; por último se emplearon dos baños de xilol de 5 minutos c/u. Las preparaciones fueron montadas en entellan [*Proper E.B y col., 1994*].

3.1.2 Técnica de PAS

Para esta técnica los cortes se desparafinaron y rehidrataron de la misma manera que para la tinción de H/E, para posteriormente ser colocados en el reactivo de Shift durante 15 minutos, transcurrido este tiempo, se lavaron con varios cambios de agua corriente durante 2 minutos, posteriormente se contrastaron con hematoxilina durante 3 minutos y se lavaron bajo chorro de agua durante 5 minutos. En seguida, los cortes se diferenciaron en alcohol ácido (2 baños rápidos) y se lavaron bajo chorro de agua por 5 minutos; transcurrido este tiempo, las preparaciones se sumergieron en agua amoniacal (un baño rápido) y se lavaron bajo chorro de agua por 10 minutos. Al término de lo anterior, los cortes fueron preparados para ser montados con entellan de la misma manera que en la tinción H/E [*Proper y col., 1994*].

3.1.3 Técnica inmunohistoquímica para la detección de Cl2 y DPPIV en los riñones

Para la evaluación de la distribución de la proteína de unión intercelular Claudina 2 (Cl2), se utilizó la técnica de inmunomarcaje de fluorescencia y microscopía confocal.

Cortes de 4-6 μm de las muestras de riñones fijadas y almacenadas en nitrógeno líquido fueron elaborados en el criostato Leica modelo CM15105, Germany, trabajando en temperaturas de -23° a -25° C. Los cortes fueron adheridos a portaobjetos recubiertos con silano 2% (3-aminopropilil trietoxisilano, marca sigma-aldrich, No de catA3648-100ml) y almacenados en congelación (-24° a -26° C) hasta su empleo.

Al momento de utilizarse los cortes fueron atemperados durante 30 min., fijados con etanol absoluto por 5 minutos a 4° C (en refrigeración) y permeabilizados con acetona pura durante 40 segundos a 0° C en congelador; en seguida fueron hidratados con PBS + Calcio (1 mM) por 5 minutos a temperatura ambiente y transferidos a una solución de triton X-100 al 0.2% (en PBS + Ca^{+2} 1 mM), también durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se lavaron dos veces con PBS + Ca^{+2} 1 mM durante 5 minutos

c/u y se llevó a cabo el bloqueo de sitios inespecíficos empleando una solución de albúmina sérica bovina 0.5% (BSA) libre de IgG's (marca Reasearch Organics, No de catalogo 1331A Lot Y75041, USA) disuelta en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. El volumen aplicado a cada corte fue de 100-125 μ l. Al término del bloqueo, se retiró la BSA y los cortes fueron incubados durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda con 30-35 μ l de la siguiente mezcla de anticuerpos primarios: conejo anti-CI2 (Zymed, No de cat 51-6100, lote 473411A, USA) y ratón anti-DPPiV de rata (AbD Serotec, No de cat MCA924R, Bach No 1105, USA), en dilución 1:50 y 1:150 respectivamente. Transcurrido este tiempo, las laminillas fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos con PBS + Ca⁺² 1 mM, con la finalidad de eliminar el exceso de los anticuerpos primarios, posteriormente se incubaron durante 2 hrs. a temperatura ambiente en cámara húmeda con la mezcla de los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 cabra anti-conejo (Invitrogen, Molecular Probes, No de cat A11008, Lote 467052, USA) y Alexa Fluor 594 burro anti-ratón Ig G (H +L) (Invitrogen, Molecular Probes, No de cat A21203, Lote 56568A, USA), cada uno en dilución 1:150. Al término de esta incubación, las preparaciones se lavaron 3 veces con PBS + Ca²⁺ 1 mM durante 5 min c/u para eliminar el exceso de anticuerpos y por último, se montaron con glicerol al 30% diluido en PBS + Ca⁺² 1 mM y se sellaron con barniz de uñas. Para el análisis de estas preparaciones se utilizó el microscopio confocal invertido Leica modelo DMI 4000B con el software Leica Mycrosistem LAS-AF.

3.2 Evaluación de la función renal

Los parámetros valorados fueron:

- a) En orina: creatinina, microalbuminuria, fosfatos, proteínas totales, γ -glutamyltranspeptidasa y glucosa.
- b) En sangre: creatinina y glucosa.
- c) En corteza renal:
 - o Bioquímicos: Concentración de glutatión (GSH) y actividad de glutatión peroxidada (GPx).
 - o Moleculares: Expresión de los genes GAPDH, TNF- α , BAX y BCL2.

En la tabla 9 se enumeran las técnicas empleadas para realizar el análisis de muestras de orina colectada durante 24 h.

Parámetro	Método empleado
Creatinina en plasma	Método colorimétrico de Wiener Lab (2000).
Microalbuminuria y creatinina en orina	Tira reactiva marca Bayer
Fósforo	Método colorimétrico de Sumner (1944)
Actividad de γ -glutamyltranspeptidasa (TPG)	Goldbarg <i>et al</i> (1960).
Proteínas totales	Lowry <i>et al</i> (1951)
Glucosa	Método de Winer Lab (2000)
Glutación peroxidada (GPx)	Kit de Sigma-Aldrich
Glutación (GSH)	Hissin P. J. y Filf F. (1975)

Tabla 94. Metodología empleada.

3.2.1 Determinación de creatinina en plasma

Se empleó el método cinético a 500 nm, sin despolimerización, en el cual la creatinina contenida en la orina o sangre se hace reaccionar con una solución de picrato alcalino (reacción de Jaffe), produciendo un color rojo. La velocidad de esta reacción es una medida de la concentración de creatinina en la muestra, debido a que se comporta como una reacción cinética de primer orden [Winer Lab, 2000].

Para realizar este método se elaboró una solución de picrato alcalino, producto de mezclar ácido pícrico 41.4 mmol/L con el reactivo alcalino carbonato/NaOH pH 12.7 en una proporción 1:1; es importante preparar un volumen suficiente de esta solución para determinar la concentración de creatinina en todas las muestras por duplicado, incluyendo blanco y estándar [Winer Lab, 2000].

Una vez elaborada la solución de trabajo y calibrado a cero el espectrofotómetro a 500nm (Espectrofotómetro UV-Vis, marca Varian, Australia) empleando el blanco (solución de picrato alcalino) se colocó 1ml de la solución de trabajo en cada tubo de ensayo, posteriormente se agregó 0.2 ml del estándar o muestra disparando al mismo tiempo un cronómetro y agitando vigorosamente, inmediatamente después se coló la mezcla en la cubeta espectrofotométrica. Se registró la absorbancia de la mezcla a los 30 segundos y 5 minutos [Winer Lab, 2000].

Para calcular la concentración de creatinina se emplearon las siguientes fórmulas:

$$1. \text{ Creatinina en suero mg/ml} = (D2-D1) \times f$$

$$f = (20\text{mg/ml}) / (S2-S1)$$

$$2. \text{ Creatinina en orina} = [(D2-D1) / (S2-S1)] \times V$$

V = Volumen de la diuresis expresado en L/24hrs

Donde:

S1 = Abs del estándar a los 30 s.

S2 = Abs del estándar a los 5 min.

D1= Abs de la muestra a los 30 s.

D2 = Abs de la muestra a los 5 min.

3.2.2 Determinación de microalbuminuria y creatinina en orina

El método empleado fue el de tirilla reactiva de Bayer, Clinitek. La tirilla provista por Bayer se sumergió en la orina por un instante, se sacó y eliminó el exceso de muestra empleando una gasa, se dejó reaccionar por 30 segundos y se introdujo en el equipo de lectura Clinitek 50 el cual determinó la concentración de albúmina y creatinina en la muestra.

3.2.3 Determinación de fósforo en orina

La técnica empleada fue la de Sumner J.B. (1944), la cual usa sulfato ferrosos como agente reductor, ya que al agregarse en exceso, reduce al ácido fosfomolibdico en pocos segundos produciendo una reacción estable y que no sufre interferencias por la presencia de hasta 10ml de ácido tricloroacético al 10%, a demás, la cantidad de ácido sulfúrico que es necesario agregar para evitar la formación de color por la reducción del ácido molibdico es menor, evitando la hidrólisis de algunos esteres lábiles al H₂SO₄.

Para realizar esta técnica se prepararon las siguientes soluciones: solución estándar de KH₂PO₄, molibdato de amonio al 6.6%, ácido sulfúrico 7.5N y sulfato de hierro (5g de FeSO₄-7H₂O en 50ml de agua destilada, más 1ml de ácido sulfúrico 7.5N).

Con la solución de KH₂PO₄, se elaboró una curva estándar de fósforo partiendo de una disolución que contenía 10 Pi/ml, obtenida al agregar 0.0219g de KH₂PO₄ en un matraz volumétrico de 500 ml, aforado con agua destilada. De la solución anterior se colocó en 4 tubos de ensayo 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ml respectivamente, los cuales correspondían a 5, 10, 15 y 20 µg de Pi, ajustando a un volumen de 2.88ml con agua bidestilada. Subsecuentemente, a cada tubo se le agregó 0.4 ml de molibdato de amonio 6.6%, 0.4 ml de ácido sulfúrico 7.5 N y 0.32 ml de sulfato de hierro al 10% obteniendo un volumen final de 4 ml; esta mezcla se incubó durante 5 minutos, para posteriormente determinar su absorbancia a 700nm en

espectrofotómetro UV/Visible antes descrito. La misma metodología fue empleada para el procesamiento de las muestras problemas [Sumner J.B., 1944].

Para calcular la concentración de fósforo se emplearon las siguientes fórmulas:

$$\mu\text{g/ml Pi} = (\text{Abs}) \times (1/m)$$

$$m = (Y2-Y1)/(X2-X1)$$

Donde:

Y1 = Absorbancia obtenida por 5 μg de Pi/ml.

Y2 = Absorbancia obtenida por 20 μg de Pi/ml.

X1 = concentración de Pi/ml en el primer tubo de ensayo.

X2 = concentración de Pi/ml en el último tubo de ensayo.

3.2.4 Actividad de γ -glutamyl-transpetidasa

La determinación de la actividad de esta enzima se realizó colocando en tubos de ensayos (los necesarios para procesar cada muestra, blanco y estándar) 830 μl del amortiguador Tris-HCL pH 9.0, 100 μl de Glicil-glicina 200 mmol, 50 μl de γ -Glutamyl-pNa. El espectrofotómetro fue calibrado a cero con el blanco a 405 nm (mezcla anterior). Posteriormente, se agregaron 20 μl de orina y al mismo tiempo se disparó un cronómetro, se agitó y colocó la mezcla en una cubeta espectrofotométrica, 30 segundos después de iniciada la reacción se obtuvo el primer valor de absorbancia, prosiguiendo la incubación durante 2 minutos más, registrando la absorbancia cada minuto para obtener el incremento promedio de esta [Goldbarg y col., 1960].

Para calcular la actividad de esta enzima se emplearon las formulas mencionadas a continuación:

$$\text{Actividad (nmol/ml)} = [(D2-D1) - (S2-S1)] / \text{Coeficiente de extinción de pNa}$$

Donde:

D1 = Absorbancia a 405 nm después de 30 seg. de la muestra problema.

D2 = Absorbancia a 405 nm después de 1.5 minutos de la muestra problema.

S1 = Absorbancia a 405 nm después de 30 seg. del estándar.

S2 = Absorbancia a 405 nm después de 1.5 minutos del estándar.

Coeficiente de extinción de pNa = 9.9 nmol/ml.

“**Nota:** para el cálculo correcto de actividad de γ -glutamyltranspetidasa es necesario expresarla como nmol de pNa/min/mg de proteína”.

3.2.5 Determinación de proteínas totales

Esta técnica necesitó la elaboración de una solución A, que contiene 20g de Na₂CO₃, 4g de NaOH y 0.2g de tartrato de sodio en un 1L de solución; una solución B que contiene 0.5g de sulfato cúprico en 100ml de agua bidestilada y una solución C, que se prepara con 50ml de solución A mas 1ml de la solución B; es importante preparar solo la cantidad de solución C necesaria para procesar todas las muestras, ya que esta es útil solo el día que es preparada [Lowry y col.,1951].

Para determinar la concentración de proteínas en las muestras se realizó una curva patrón, empleando albúmina sérica bobina 0.1% (BSA), colocando 1ml de la solución C en 5 tubos de ensayo, que contenían 0.0, 6.0, 15.0, 35.0 y 50.0 µl de BSA, 0.1ml del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, se agitó e incubó por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se obtuvieron las absorbancias en espectrofotómetro a 750 nm. Las muestras problemas se trataron con el mismo procedimiento por duplicado [Lowry y col.,1951].

Para obtener la cantidad de proteínas en las muestras se usaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Proteínas (mg/ml)} = (1/m) \times (\text{Abs de muestra})$$

$$m = (Y2-Y1) / (X2-X1)$$

Donde:

m = pendiente obtenida de la curva estándar.

Y1 = Absorbancia obtenida por la menor cantidad de µl de la solución de albúmina.

Y2 = Absorbancia obtenida por la muestra con mayor cantidad de µl de la solución de albúmina.

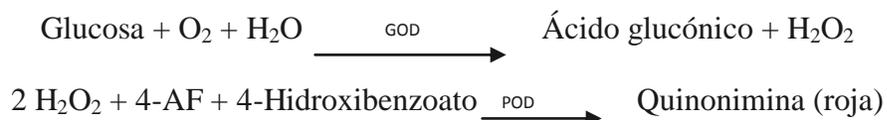
X1 = menor concentración de albúmina.

X2 = mayor concentración de albúmina.

3.2.6 Glucosa

Para la medición de este parámetro se empleó la técnica enzimática de Winner Lab (2000) que utiliza los siguientes reactivos: glucosa oxidasa (GOD), peroxidasa (POD) 4-aminofenazona (4-AF) y buffer fosfatos adicionado con 4-Hdroxibenzoato.

Las reacciones que catalizan dichos reactivos es la siguiente:



En tubos de ensayo marcados como estándar, blanco y problemas se colocaron: 10 µl de la solución patrón y 1000 µl de la solución de trabajo que contiene los reactivos antes mencionados; en el tubo marcado como blanco se colocaron 10 µl de agua destilada y 1000 µl de la solución de trabajo; en los tubos marcados como problemas se colocaron 10 µl de muestra y 1000 µl de la solución de trabajo. Los tubos con las mezclas se agitaron e incubaron a temperatura ambiente durante 25 minutos y se determinó la absorbancia a 505 nm calibrando a cero el espectrofotómetro con la solución de trabajo [Winer lab, 2000].

Cálculo de concentración de glucosa en las muestras:

$$\text{Glucosa (g/L)} = D * f$$

$$f = 1.00 \text{ g/L} / S$$

Donde:

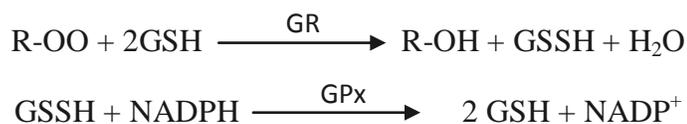
D = Absorbancia de la muestra problema.

S = Absorbancia del estándar.

3.2.7 Glutación peroxidada (GPx)

La GPx provee un mecanismo para la destoxicación de peróxidos en las células vivas catalizando la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de una amplia variedad de peróxidos orgánicos (R-OOH) a sus correspondientes alcoholes estables (R-OH) y agua, usando al glutatión celular como agente reductor [Sigma Aldrich, 2007].

El kit empleado para la cuantificación de la actividad de esta enzima usa un método indirecto basado en la reacción de oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSH) catalizada por la GPx, la cual esta acoplada al reciclaje de GSSH a GSH empleando glutatión reductasa y NADPH (β-Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato, Reducido) [Sigma Aldrich, 2007].



Preparación de las muestras: 250 mg de corteza renal fueron homogenizados con 3.75 ml de Buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 8.0 empleando un motor de velocidad controlada para homogenizar (marca Arrow Engineering Co. Inc., modelo JR4000, hecho en U.S.A.), se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 minutos en centrífuga refrigerada (Doupont, modelo Sorvall RT6000) para obtener el sobrenadante, el cual fue diluido en proporción 1:10 empleando el Buffer de fosfatos 0.1 M pH 8.0 para poder obtener decrementos de absorbancia que dentro del rango lineal (0.032-0.13 por minuto), equivalentes a 0.005-0.02 U/ml [Sigma Aldrich, 2007].

Para realizar la reacción se colocaron en una cuba espectrofotométrica de cuarzo 235 μ l del Buffer de ensayo, 12.5 μ l de NADPH (elaborado al momento de su uso), 10 μ l de la muestra diluida 1:10 y 2.5 μ l de *ter*-butil-hidroperóxido (*t*-Bu-OOH) 30 mM para iniciar la reacción; inmediatamente después se disparó un cronómetro, se agitó suavemente por inversión, se midieron y registraron las absorbancias a 340 nm a los 15 segundos y 1 minuto con 15 segundos después de haber sido iniciada la reacción. Los controles positivos se realizaron empleando un estándar de GPx elaborado al momento de usarse, disolviendo el contenido de un vial con 100 U/ml de GPx (No. Cat. G6137) en 1 ml del buffer de ensayo, posteriormente se preparó una dilución a 0.25 U/ml con el buffer de ensayo adicionado con IgG 1mg/ml (No. de Cat. 14506) y DTT 1mM (No. de Cat. D0632). Los volúmenes empleados para cada reacción y la fórmula usada para calcular la actividad de GPx se muestran en el Anexo 1

3.2.8 Determinación de glutati3n reducido (GSH)

Como ya se mencion3 anteriormente el GSH es la mol3cula celular antioxidante por excelencia, por lo que su presencia y concentraci3n en los diferentes 3rganos es muy importante para protegerlos en contra de los efectos deletreos ocasionados por los radicales libres [Hissin and Hilf, 1976]

La t3cnica empleada para esta determinaci3n fue la de Hissin and Hilf (1997) y las muestras fueron 250 mg de corteza renal homogenizados con 3.75 ml de Buffer de fosfato de sodio 0.1 M + 0.005 M de EDTA pH 8.0 y 1 ml de HPO₃ y se centrifugaron a 10000 rpm en centrífuga refrigerada durante 30 minutos para obtener el sobrenadante.

Para realizar la reacción se colocaron en un tubo de ensayo 0.5 ml de sobrenadante, 4.5 de Buffer de fosfato de sodio 0.1 M + 0.005 M de EDTA pH 8.0 y se agitó en vortex (Vortex-Genie 2, modelo G560, hecho en U.S.A.). En otro tubo de ensayo se colocaron 100 µl de la dilución anterior, 1.8 ml del Buffer de fosfato de sodio 0.1 M + 0.005 M de EDTA pH 8.0 y 100 µl de O-Ftaldehído (OPT); se mezcló en vortex nuevamente y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Trascurrido este tiempo se determinó la fluorescencia emitida por las mezclas en cuba espectrofotométrica de cuarzo con longitudes de onda de emisión y activación de 420y 350 nm respectivamente en espectrofluorometro (Perkin-Elmer spectrofluorometer, modelo LS50B, U.K.) [*Hissin and Hilf, 1976*].

La concentración de GSH se obtuvo empleando una curva patrón con concentraciones de 0.0 a 5.0 µg de GSH, en intervalo de 0.5 µg. Por regresión lineal de los datos de fluorescencia obtenidos se obtuvo la fórmula que se muestra en la gráfica del Anexo 2 [*Hissin and Hilf, 1976*].

3.2.9 RT-PCR

Para la extracción de RNA 100 mg de corteza renal de cada muestra fueron homogenizados con 1ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) empleando un homogenizador de vidrio estéril, se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min. en centrífuga refrigerada; posteriormente se separó el sobrenadante y se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitaron fuertemente en vortex durante 1 min. y se incubó durante 10 min, para ser nuevamente centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos. Al término de la centrifugación se separó el sobrenadante, al cual se le agregaron 50 µl de isopropanol, se agitó nuevamente y se incubó durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 10 min., se descartó el sobrenadante y al precipitado se le agregaron 450 µl de isopropanol, se agitó por inversión y se dejó reposar durante 30 minutos a -20°C, nuevamente se centrifugó a 13000 rpm por 15 min., se decantado el sobrenadante y al material remanente (RNA) se mezcló con 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min. Nuevamente, el sobrenadante fue decantado y el material remanente fue secado a temperatura ambiente durante 5-10 min. sobre una toalla de papel e inmediatamente después se agregaron 40 µl de agua destilada estéril para resuspender la pastilla de RNA [*Salazar-Montes y col. 2000*].

La cuantificación de RNA en las muestras se obtuvo por la técnica espectrofotométrica, para obtener la relación Abs 260nm/Abs 280 nm.

Para realizar la prueba RT-PCR, se emplearon 12.5 µl de buffer TAE 1x, 0.5 µl del iniciador en sentido, 0.5 µl del iniciador en antisentido, 0,5 µl de Taq Polimerasa, volumen de RNA en el que se contenga 1 µg de ácidos nucleicos y agua destilada suficiente para ajustar el volumen a 25 µl. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 40 ciclos cada uno con incubación durante 1 min. a 90 °C, 1 min. a 60 °C , y 1.5 min a 72 °C y con una extensión final a 72 °C durante 5 min [Salazar-Montes y col. 2000].

El material amplificado se analizó empleando electroforesis en gel de agarosa 2% (0.6 g de agarosa en 30 ml de amortiguador TAE 1x), colocando en un pozo el marcador de tamaño molecular de 50 pb (Promega GA52A, USA) (1.5 µl del marcador + 6 µl de TAE 1x + 2µl del colorante de carga marca Promega Blue orange 6x G190A, USA), y en los siguientes pozos se colocaron las muestras de RNA (10 µl de la solución de RNA + 2 µl de colorante de carga). Una vez cargadas todas las muestras se aplicó una corriente de 110 volts durante 30 min. Por último el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 15 minutos, se lavó en agua destilada durante 3-5 minutos y se examinó en transiluminador con luz UV [Salazar-Montes y col. 2000].

RESULTADOS

1. Análisis histológico

1.1 Hígado

La estructura histológica de hígados de animales control no presentó alteraciones en su arquitectura (Imagen 2A y 3A). Los hígados de ratas que recibieron el tratamiento subagudo durante 4 semanas con PM mostraron en el área centrolobulillar, hepatocitos con vacuolización citoplásmica (Imagen 2B, y 3B). El tratamiento subagudo con PM durante 6 semanas presentó menor vacuolización citoplásmica de hepatocitos (Imagen 2C y 3C).

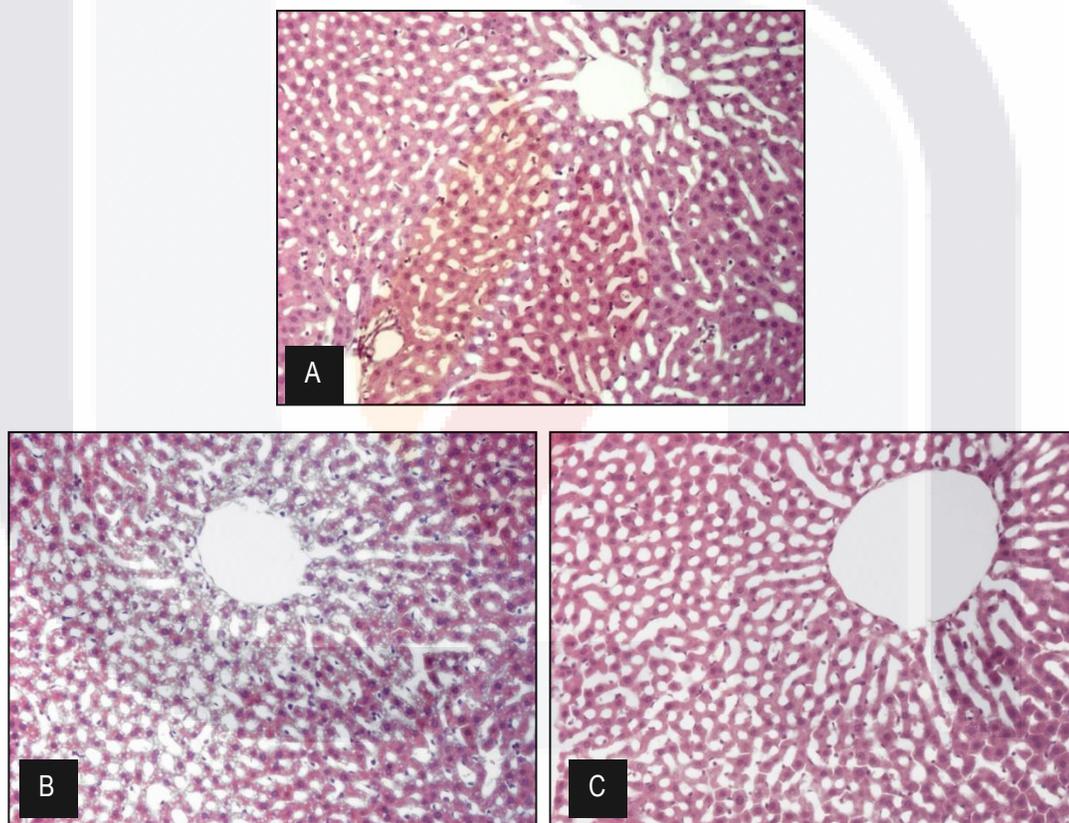


Imagen 2. Cortes de hígado de rata Wistar machos adultos, grupos control e intoxicado. A) Hígado control. B) En la intoxicación con PM durante 4 semanas se observa disminución del volumen celular y abundante vacuolización citoplásmica, predominantemente en el área centrolobulillar. C) Efecto de la intoxicación con PM durante 6 semanas, se observa volumen celular disminuido y menor vacuolización citoplásmica. 100 AT/Tinción H/E.

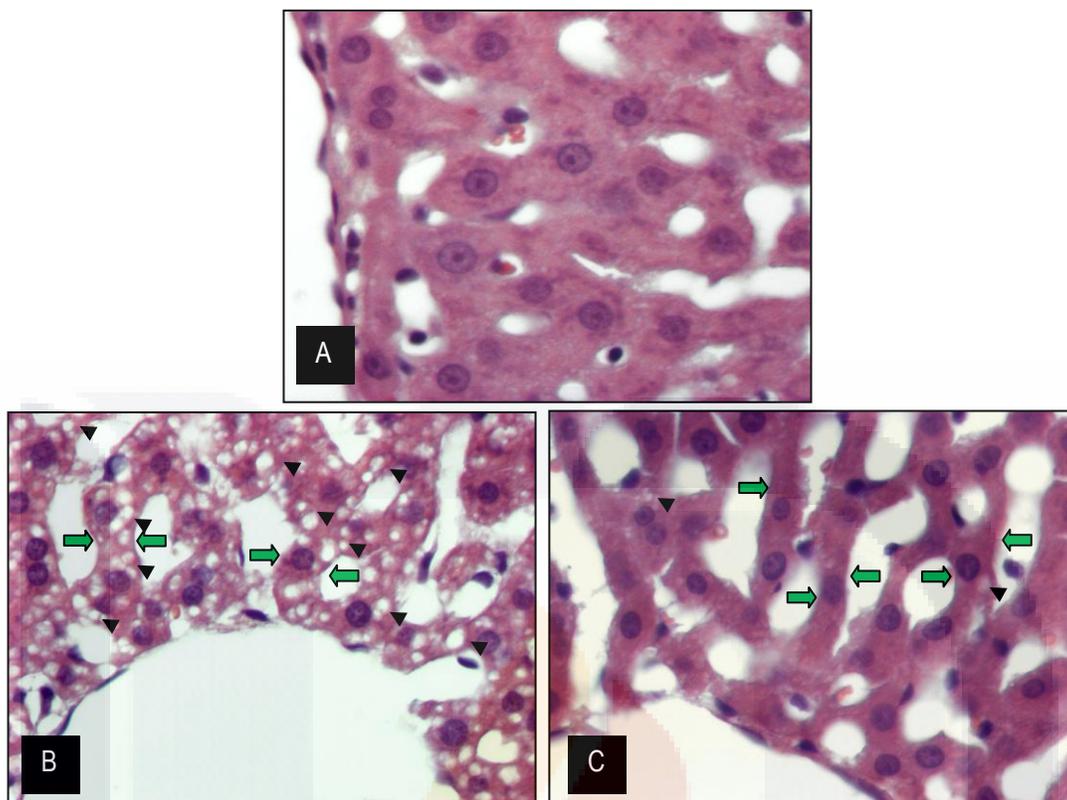


Imagen 3. Cortes de hígado de rata Wistar machos adultos, grupos control e intoxicado. A) Hígado control. B) Efecto de la intoxicación con PM durante 4 semanas. C) Efecto de la intoxicación con PM durante 6 semanas. Señalamientos: disminución del volumen celular (➡), vacuolización citoplásmica en área centrolobulillar (▼). 400 AT/Tinción H/E.

En el análisis histológico de los hígados se utilizó la técnica histoquímica de PAS para evaluar presencia de glucógeno en el citoplasma de los hepatocitos, donde la intensidad de coloración es proporcional a la cantidad de carbohidratos presentes. Los hígados de ratas del grupo control teñidos con esta técnica, mostraron hepatocitos con una alta intensidad de reacción (Imagen 4A y 5A), sin embargo, en los hepatocitos de los animales tratados con PM durante 4 semanas, se observó una disminución de la intensidad de coloración (Imagen 4B y 5B). En el tratamiento con PM durante 6 semanas, se observaron hepatocitos con una restitución parcial en la intensidad de coloración (Imagen 4C y 5C).

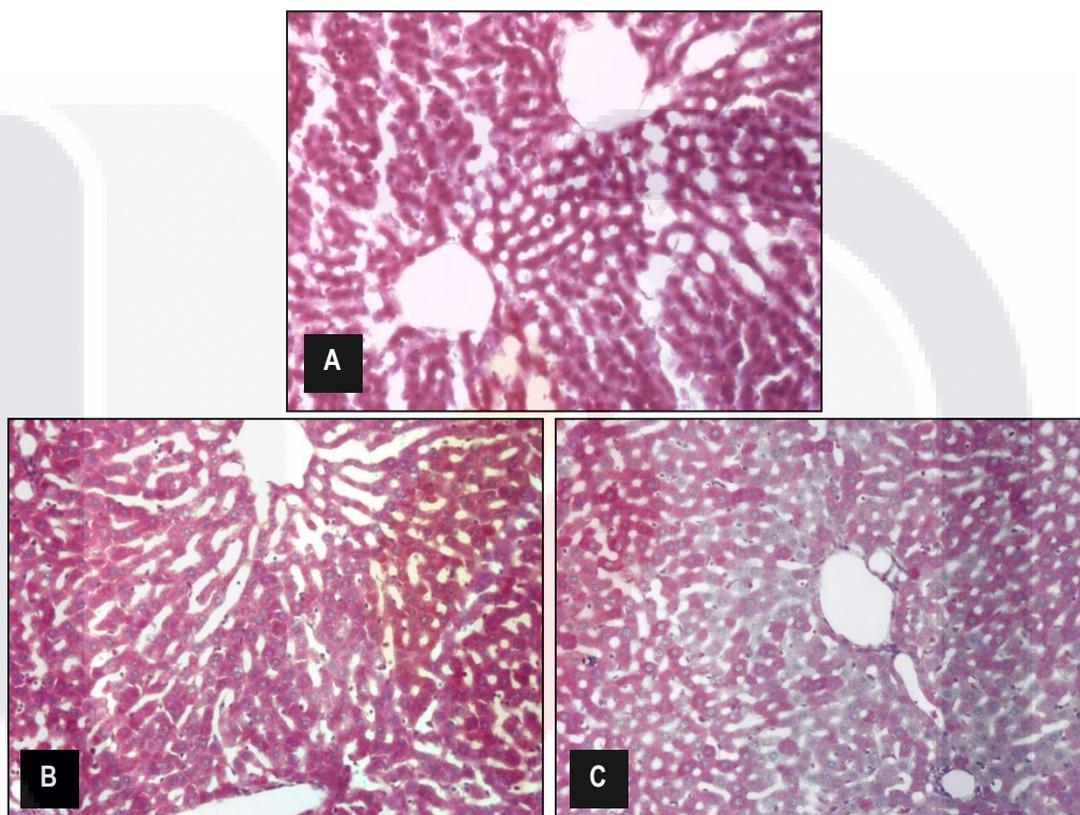


Imagen 4. Cortes de hígado de rata Wistar machos adultos, grupos control e intoxicado. A) Hígado control. B) Efecto de la exposición a PM durante 4 semanas, se observa disminución de reacción de PAS. C) Efecto de la exposición a PM durante 6 semanas, se observa menor intensidad de la reacción de PAS con respecto al tratamiento anterior y edema celular. **100 AT/Tinción de PAS.**

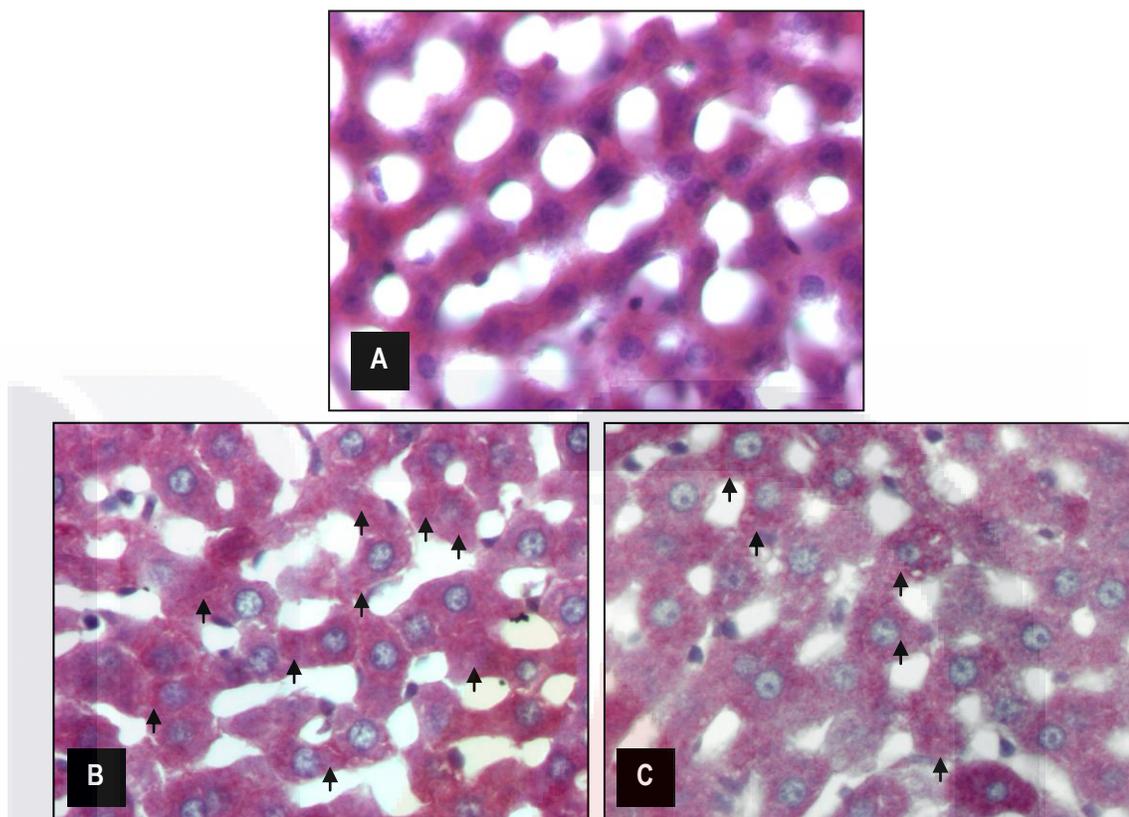


Imagen 5. Cortes de hígado de rata Wistar machos adultos, grupos control e intoxicado. A) Hígado control. **B)** Efecto de la exposición a PM durante 4 semanas, se observa disminución de reacción de PAS y gránulos citoplásmicos PAS positivos (↑). **C)** Efecto de la exposición a PM durante 6 semanas, se observa mayor disminución de reacción de PAS y gránulos citoplásmicos PAS positivos (↑). 400 AT/Tinción de PAS.

1.2 Riñones

Se realizó el análisis histológico de los riñones con la tinción con H/E para todos los tratamientos estudiados. Los principales hallazgos se muestran en la imagen 6 (Imagen 6A, 6B, 6C y 6D). Durante este examen no se observaron alteraciones en la arquitectura de los riñones de ratas control. En los riñones de ratas expuestas a PM se observaron los siguientes cambios histológicos con respecto a los controles: 1) En la exposición durante 2 semanas se identificó células tubulares proximales con edema y vacuolización citoplásmica. 2) En el tratamiento durante 4 semanas se observó edema de las células del túbulo proximal, incremento del patrón de vacuolización con respecto al tratamiento anterior y pérdida de la membrana del borde en cepillo. 3) En las ratas expuestas durante 6 semanas, permaneció el edema celular y la pérdida del borde en cepillo de las células del

túbulo proximal, mientras el patrón de vacuolización citoplásmica que disminuyó con respecto al tratamiento anterior. 4) En el tratamiento con PM durante 8 semanas se identificó una tendencia a la restitución del volumen celular, la vacuolización citoplásmica y del borde en cepillo, sin embargo no llegan a igualar al grupo control.

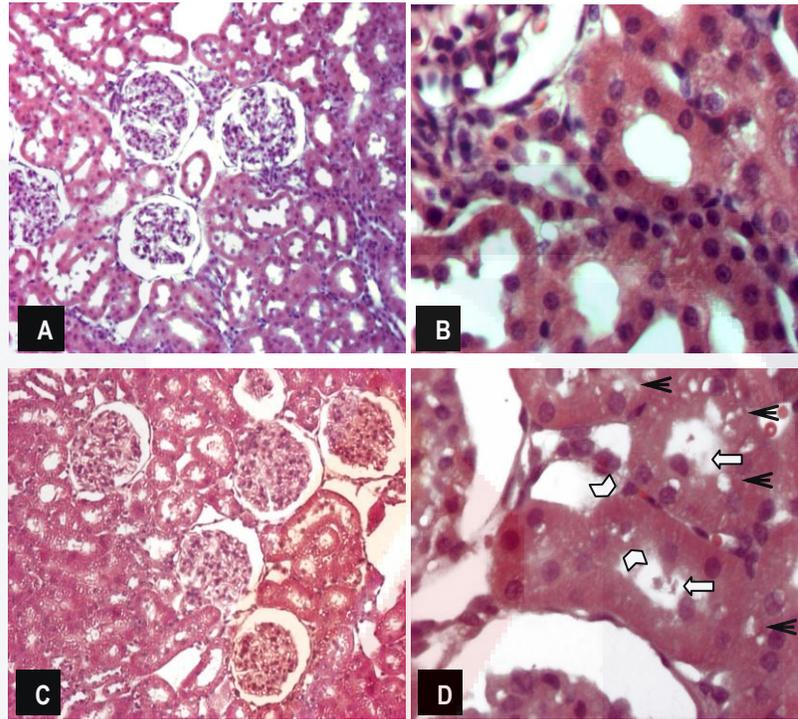


Imagen 6. Cortes de riñón (H/E). A) Grupo control 100AT. B) Grupo control, 400AT. C) Tratamiento con PM durante 4 semanas, 100 AT: D) Tratamiento con PM durante 4 semanas, 400 AT. Células tubulares con edema (↗), vacuolización citoplásmica (⬛) y pérdida de la membrana del borde en cepillo (↔).

En el análisis histológico de los riñones de ratas control de las preparaciones teñidas con la técnica de PAS no se observaron alteraciones en su arquitectura (Imagen 8A). En los riñones de ratas expuestas a PM se observaron los siguientes cambios estructurales con relación a los controles: a) En la exposición durante 2 semanas a este pesticida, se presentó en las células tubulares proximales edema, granulaciones citoplásmicas PAS+ (glucógeno) y pérdida de la membrana del borde en cepillo (imagen 7A y 8B); b) en la intoxicación durante 4 semanas permanece la pérdida de la membrana del borde en cepillo, se incremento el edema, disminuyó el patrón de granulación y se observó vacuolización citoplásmica con respecto al tratamiento anterior, adicionalmente en los glomérulos se identificó incremento del número de células mesangiales con engrosamiento de la

membrana basal de los capilares glomerulares y del epitelio de la cápsula de Bowman (Imagen 7B y 8C); c) en los riñones de ratas intoxicadas durante 6 semanas, en el túbulo proximal y el corpúsculo renal permanecieron los cambios morfológicos descritos, con una disminución del patrón de granulación y de la vacuolización celular, (Imagen 7C y 8D); d) en el tratamiento durante 8 semanas, se mantuvieron los cambios del corpúsculo renal y en las células tubulares disminuye la vacuolización y el edema celular con restablecimiento parcial del borde en cepillo, sin embargo se observó un incremento de granulaciones citoplásmicas con respecto al tratamiento anterior (Imagen 7D y 8E).

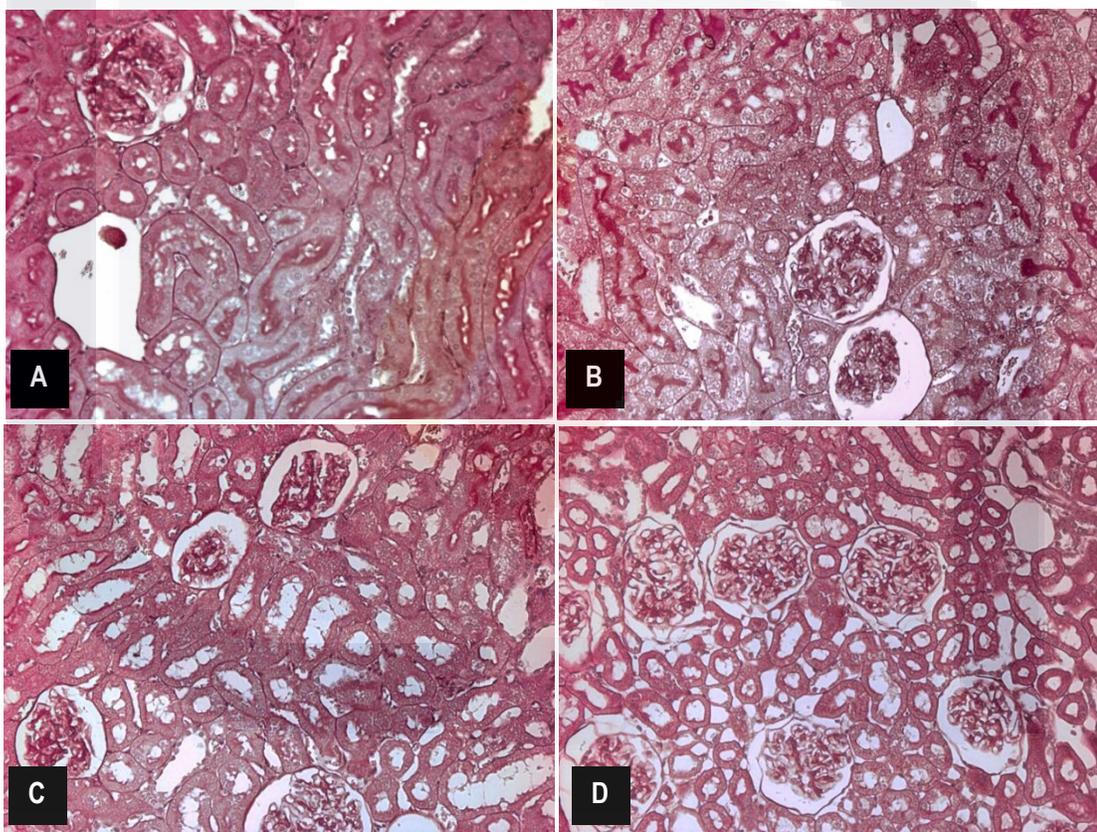


Imagen 7. Cortes de riñón de ratas Wistar machos adultos intoxicados con PM. A) Tratamiento de 2 semanas con PM; B) Tratamiento de 4 semanas con PM; C) Tratamiento de 6 semanas con PM; D) Tratamiento de 8 semanas con PM. 100 AT/Tinción de PAS.

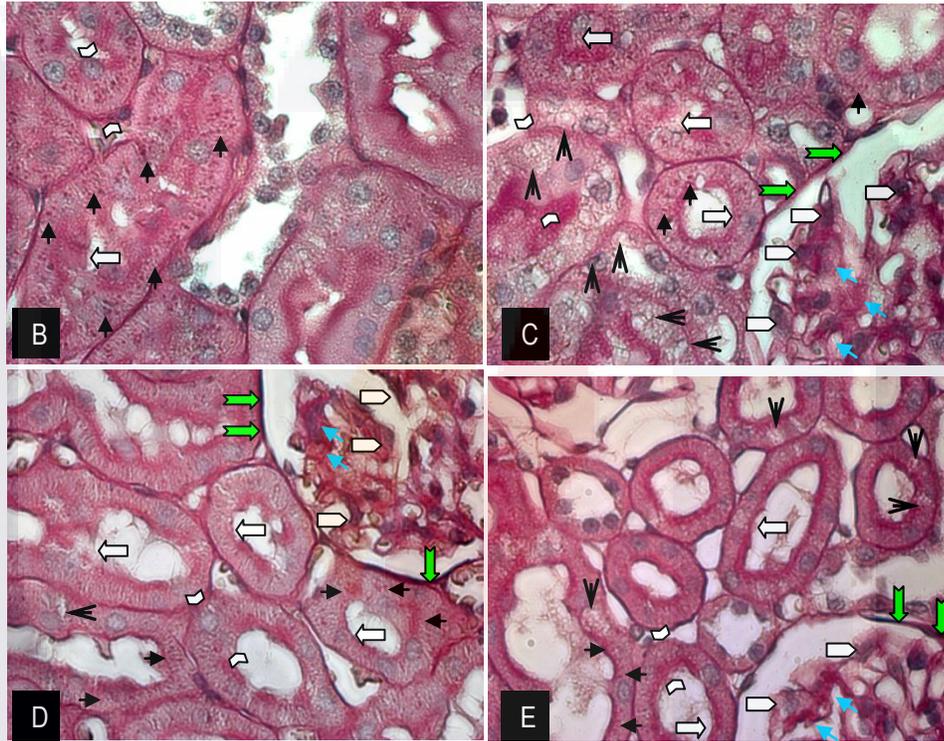
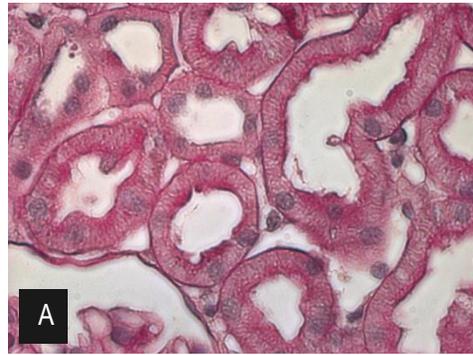


Imagen 8 A-E. Cortes de riñón de ratas Wistar machos adultos control e intoxicados con PM. A) Corte de riñón control. B) Tratamiento de 2 semanas con PM. C) Tratamiento de 4 semanas con PM. D) Tratamiento durante 6 semanas con PM. E) Tratamiento durante 8 semanas con PM. Señalamientos: edema de células tubulares (↗), granulaciones citoplásmicas PAS+ (▲), pérdida del borde en cepillo del las células tubulares proximales (↔), vacuolización citoplásmica (◀), células mesangiales (□), engrosamiento de la membrana basal capilar (♣) y engrosamiento de la cápsula de Bowman (➡). 400 AT/Tinción de PAS.

2. Inmunohistoquímica

En el estudio de inmunofluorescencia se utilizó un doble marcaje para detección de Cl2 y DppIV. El inmunomarcaje de Cl2 se observó de color verde y el de DppIV en color rojo. En los riñones de ratas control se observó en las células tubulares proximales marcaje para Cl2 principalmente en el borde basolateral y en la membrana del borde en cepillo para DppIV (Imagen 9 A-D). Los riñones de ratas expuestas crónicamente a PM mostraron: a) en el tratamiento durante 2 semanas incremento de marca para Cl2 en el borde basal (Imagen 9A'); b) en la exposición durante 4 semanas se incrementó el marcaje de Cl2 en el borde basal y adicionalmente se presentó en el citoplasma celular, así mismo, disminuyó el marcaje para DppIV en la membrana del borde en cepillo con respecto al tratamiento anterior (Imagen 9B'); c) en el tratamiento de 6 semanas, se incrementó el marcaje citoplásmico para Cl2 y disminuyó aún más el marcaje para DppIV (Imagen 9C'); d) en la exposición durante 8 semanas a este pesticida se observó una restitución parcial en del marcaje para Cl2 y DppIV con respecto al control, sin embargo no lo llega a igualar (Imagen 9D').

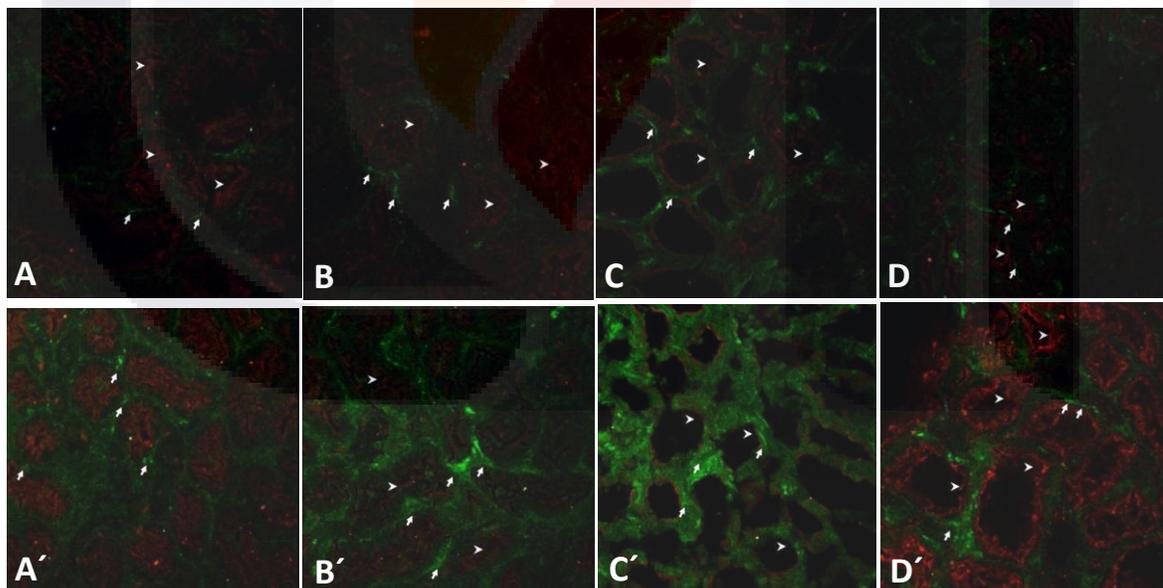


Imagen 9. Inmunodetección de Cl 2 y DPPIV en riñones de ratas Wistar machos adultos, 400 AT. A-D Grupo control de 2-8 semanas de tratamiento respectivamente. **A'-D'** Grupo intoxicado con PM de 2-8 semanas respectivamente. Las flechas (↗) indican la marca de Claudina 2 (CL2) con el fluorocromo Alexa fluor 488 (color verde). La punta de flecha (↘) indica la marca para la enzima del borde en cepillo dipeptidil peptidasa IV (DppIV) con Alexa fluor 595 (color rojo).

3. Análisis de parámetros bioquímicos de función renal y estrés oxidativo en corteza renal.

El análisis de muestras de orina y sangre de las ratas del grupo control no mostraron alteraciones estadísticamente significativas para ningún parámetro bioquímico y/o de función renal, sin embargo, la concentración de GSH en corteza renal mostró un incremento significativo de la 4^a-8^a semana de tratamiento.

La exposición de los animales de experimentación a PM generó efectos en los siguientes parámetros:

a) Flujo urinario, concentración plasmática y urinaria de creatinina.

Se observó una disminución significativa del flujo urinario de la 2^a-8^a semana de tratamiento ($p < 0.05$) conforme se incrementó el tiempo de exposición al PM (Figura 6A). La concentración plasmática de creatinina mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) únicamente en la 1^a y 2^a semana de tratamiento (Figura 6B). En la depuración de creatinina sólo se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) durante la 3^a semana de intoxicación (Figura 6C). No se observaron cambios significativos ($p < 0.05$) en la concentración urinaria de creatinina (Figura 6D).

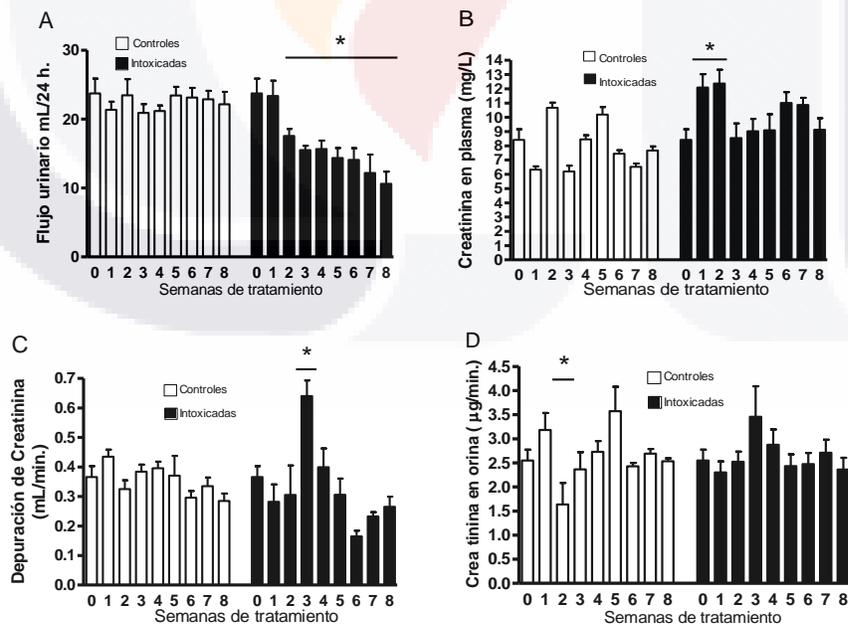


Figura 6. Efectos de la exposición crónica de ratas Wistar machos sobre el flujo urinario (A), concentración de creatinina en plasma (B), depuración de creatinina (C) y concentración de creatinina en orina (D). Las barras representan el valor promedio, * $p < 0.05$ y $\bar{\gamma}$ al ES (error estándar).

b) Concentración plasmática de glucosa, masa excretada de glucosa y fosfatos en orina.

La concentración plasmática de glucosa se incrementó significativamente ($p < 0.05$) de la 1^a-8^a semana de intoxicación, mientras que la masa excretada de glucosa en orina tuvo un incremento significativo ($p < 0.05$) de la 2^a - 8^a semana de experimentación (Figura 7A y 7B). La masa excretada de fosfatos mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) únicamente en la 7^a semana de intoxicación (Figura 7C).

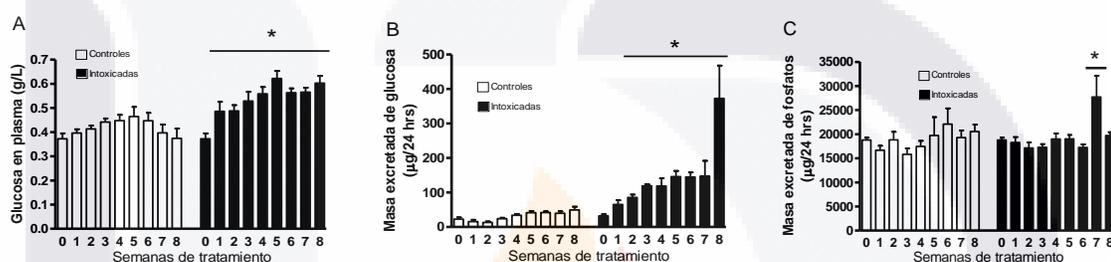


Figura 7. Efectos de la exposición crónica de ratas Wistar machos sobre la concentración de glucosa en plasma (A), masa excretada de glucosa (B) y masa excretada de fosfatos (C). Las barras representan el valor promedio, * $p < 0.05$ y $\bar{\Gamma}$ al ES (error estándar).

c) Actividad urinaria de γ -glutamiltanspeptidasa, concentración de GSH y actividad de GPx en corteza renal.

En las ratas del grupo control y tratadas con PM se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en la concentración de GSH en corteza renal de la 4^a-8^a semana de tratamiento (Figura 8A). No obstante, el incremento observado fue menor en las ratas expuestas a PM (Figura 8A). La actividad de GPx en corteza renal se incrementó de forma significativa ($p < 0.05$) en la 6^a y 8^a semana de tratamiento con PM con respecto al grupo control (Figura 8B). En la actividad urinaria de γ -glutamiltanspeptidasa se observó un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) durante las tres primeras semanas de exposición a PM, presentado una actividad semejante al control en la 4^a, 5^a y 6^a semana, con un repunte de la actividad en la 7^a semana de tratamiento (Figura 8C).

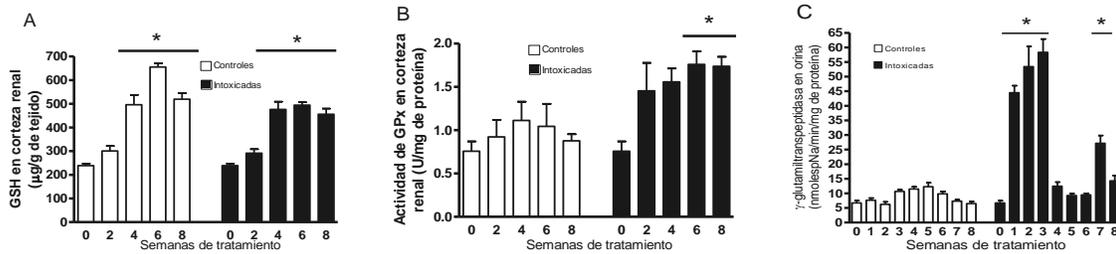


Figura 8. Efectos de la exposición crónica de ratas Wistar machos sobre la concentración en corteza renal de Glutación (GSH) (A), actividad en corteza renal de GPx (B) y actividad urinaria de la enzima γ -glutamiltanspeptidasa (C). Las barras representan el valor promedio, * $p < 0.05$ y \perp al ES (error estándar).

d) Masa excretada de proteínas totales y albúmina en orina.

Durante el experimento la masa excretada de proteínas totales en orina no mostró alteraciones estadísticamente significativas (Figura 9A), sin embargo, en la excreción urinaria de albúmina (Figura 9B) se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en la 7^a semana de intoxicación.

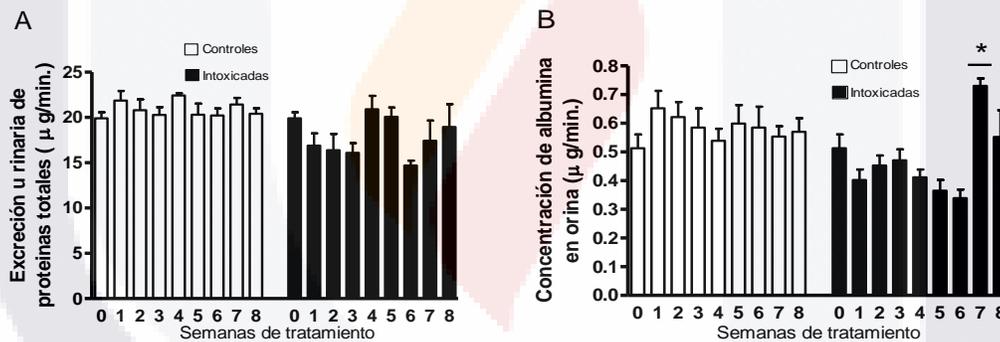


Figura 9. Efectos de la exposición crónica de ratas Wistar machos sobre la excreción urinaria de proteínas totales (A) y concentración de albúmina en orina (B). Las barras representan el valor promedio, * $p < 0.05$ y \perp al ES (error estándar).

4. Efectos en el nivel de expresión genética de TNF- α , BAX y BCL2.

En el análisis de la expresión genética de la corteza renal de los animales control no existieron alteraciones de los genes estudiados; a demás, no se observó modificación en la expresión del gen constitutivo GAPDH en ninguno de los grupos estudiados indicando que la calidad y concentración del material genético fue adecuado para su análisis y comparación entre grupos (Imagen 10A).

El tratamiento con PM generó inhibición de la expresión genética de TNF- α durante las primeras cuatro semanas de intoxicación, con tendencia a restablecer su nivel de expresión en las últimas semanas del tratamiento, sin embargo no logra el nivel de expresión del grupo control (Imagen 10B). De forma similar, la expresión de BAX es inhibida durante las primeras 2 semanas de tratamiento, con restablecimiento parcial de su expresión de la 4^a a la 8^a semana (Imagen 10C). No se obtuvo producto de amplificación para el gen BCL2 con los iniciadores utilizados (Imagen 10D).

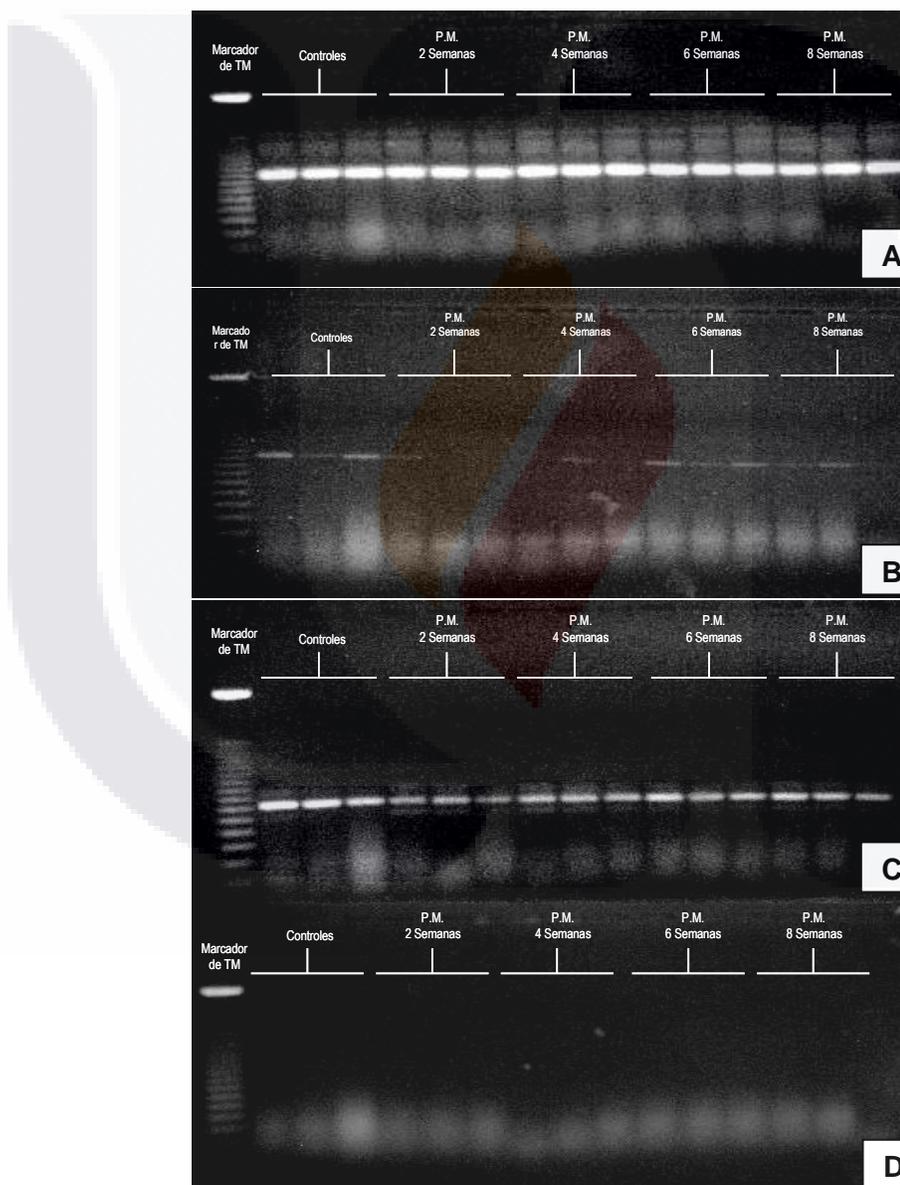


Imagen 10. Análisis de expresión genética por RT-PCR de muestras de corteza renal de ratas Wistar machos adultos, grupos control e intoxicado con PM. a) Expresión del gen constitutivo GAPDH. b) Expresión de TNF- α . c) Expresión de BAX. d) Expresión de BCL2.

DISCUSIÓN

Aunque la toxicidad aguda del PM ha sido bien caracterizada, existen pocos reportes sobre los efectos en la salud por la exposición subaguda y crónica a este pesticida, por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar las alteraciones histológicas causadas por exposición subaguda a PM en el hígado de ratas Wistar machos, así como analizar los efectos en la función renal por la exposición crónica a este pesticida.

En este trabajo, la exposición de ratas durante 4 y 6 semanas a PM provocó degeneración grasa centrolobulillar en el tejido hepático, con mayor abundancia en la 4ª semana de experimentación. Este efecto nocivo del PM sobre el hígado se puede relacionar con su acción inhibitoria de algunas esterasas que poseen serina en su sitio activo, como la colinesterasa plasmática (PCE) y la hidroximetil-glutaril-coenzima A-reductasa (HMG-CoA), enzima que regula la síntesis de colesterol. Ha sido reportado que la PCE aumenta en un gran número de pacientes con hiperlipoproteinemia y se ha postulado que un incremento en la actividad de esta enzima aumenta a su vez la tasa de secreción de lipoproteínas [Cucuiaunu y col., 1968; Cucuiaunu y col., 1975]. En el estudio de microscopía electrónica elaborada por Salim S. y col. (2004) se reportó que la exposición aguda de ratas Wistar al plaguicida organofosforado metamidofos produce los siguientes cambios estructurales en los hepatocitos: incremento en la densidad del contenido de cromatina del núcleo y vacuolización del citoplasma relacionada con la destrucción de la matriz mitocondrial; además en algunas células el contenido de lípidos fue elevado y ocupó la mayor parte del citoplasma, mientras que en las áreas perisinusoidales aumentó la presencia de fibras de colágeno. Este reporte coincide con la degeneración grasa que encontramos en el hígado de las ratas tratadas con PM. Adicionalmente a lo descrito anteriormente en los hígados, también se identificó disminución de la reacción de PAS en los hepatocitos, reflejando un decremento de carbohidratos (glucógeno), posiblemente debido a un aumento de la glucogenólisis, lo cual podría estar relacionado con la hiperglicemia observada de la 1ª- 8ª semana de intoxicación, como consecuencia de la alteración del metabolismo energético del hígado. Lukaszewicz-Hussain y col (1985) reportaron hiperglicemia e hipoinsulinemia en ratas con exposición aguda a PM y propusieron que la exposición a este pesticida genera daño en páncreas disminuyendo la concentración de insulina en sangre, aumentando así, la

concentración de glucosa en el plasma, sin embargo, Srivastava A. K. Y Singh N. N. 1981, propusieron que la hiperglucemia se derivan de efectos colinérgicos, debido a que la inhibición de la AChE incrementa la ACh en los espacios sinápticos presentes en la médula suprarrenal provocando una sobre estimulación de receptores nicotínicos determinando un aumento de la liberación de catecolaminas, las cuales favorecen la glucogenólisis, disminuyendo con esto la cantidad de glucógeno hepático e incrementando la concentración de glucosa en sangre, lo que también explicaría la hiperglucemia vista en este trabajo. A demás estos investigadores reportaron glucosuria en los animales de experimentación.

El nivel adecuado de flujo sanguíneo renal es necesario para mantener la tasa de filtración glomerular (TFG) y la formación normal de orina. En este trajo se alteró el flujo urinario debido a la exposición a PM, probablemente por las siguientes causas: a) Disminución del flujo sanguíneo renal por hipotensión, ya que el PM posee un efecto colinérgico [WHO, 1993], generando un decremento del volumen de sangre filtrado y de la TFG. Se conoce que los riñones poseen varios mecanismos para regular la presión sanguínea, como el sistema renina-angiotensina-aldosterona, en el cual, la caída de la presión arterial o la concentración de Na^+ en el filtrado tubular induce al aparato yuxtglomerular a producir y descargar renina al sistema circulatorio, catalizando la conversión de angiotensinógeno a angiotensina I, la cual es modificada por la enzima de conversión de angiotensina (ECA) en angiotensina II; esta última actúa como un potente vasoconstrictor, además estimula la secreción de aldosterona en la corteza suprarrenal que induce la reabsorción de Na^+ y agua en el segmento tubular distal de la nefrona, elevando de esa manera el volumen sanguíneo y estabilizando la presión sanguínea [Lerman y col 1991; Wayne y col 1989; Issei Komuro y col., 1988]. Otros compuestos vasoactivos secretados por los riñones en respuesta a la caída de la presión sanguínea son la endotelina, el tromboxano A_2 e isoprostanos. La endotelina es un potente vasoconstrictor local, que al ser secretado por las células del endotelio de los capilares glomerulares es capaz de disminuir el flujo sanguíneo renal y por ende, la Tasa de Filtración Glomerular (TFG) decae; sin embargo, se ha reportado durante la Enfermedad Renal Crónica (ERC) que el incremento de la secreción renal de endotelina está asociado al desarrollo de fibrosis

vascular renal y glomerular, por lo que los mecanismos renales encargados de restablecer la homeostasis de la presión sanguínea también pueden estar involucrados en la disminución anormal o patológica del flujo urinario [Baltazares-Lipp y col., 2005; Lerman y col., 1991; Wayne y col., 1989]. b) Daño en el sistema de filtración glomerular, provocando alteraciones en la TFG, respecto al cual, durante este trabajo adicionalmente a las alteraciones del flujo urinario se observaron modificaciones en la en la depuración de creatinina y en la concentración plasmática y urinaria de esta molécula, además en el análisis histológico se identificaron cambios en los corpúsculos renales que incluyeron, aumento del número de células mesangiales, engrosamiento de la membrana basal capilar y de la cápsula de Bowman. La TFG ha sido descrita como un buen indicador de función renal el cual puede emplearse para el diagnóstico de enfermedad renal crónica. La alteración de TFG por un daño gradual renal puede generar la acumulación sanguínea de diversos compuestos derivados del metabolismo celular como urea y creatinina (Rose and Rennke, 1994), por ejemplo, Tocci P.M. y col (1969) reportaron incremento de la concentración plasmática de creatinina en trabajadores expuestos crónicamente a pesticidas organofosforados, efecto que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

Además de lo anterior, debido a la exposición de los animales de experimentación a PM se provocó daño en los túbulos proximales generando alteraciones bioquímicas e histológicas, las cuales incluyeron: 1) incremento de la actividad de γ -glutamyltranspeptidasa (enzimuria) importante en las primeras tres semanas de intoxicación y un repunte de actividad enzimática a la 7ª semana. Esta enzima está localizada en la membrana del borde en cepillo de las células tubulares proximales catalizando la transferencia del grupo γ -glutamilo del glutatión a dipéptidos, aminoácidos e incluso a la misma molécula de glutatión [Curthoys y Hughey, 1979; Tate S.S. y Meister, 1981]. El fenómeno de incremento-decremento-repunte de actividad enzimática urinaria observada durante este experimento puede deberse a un proceso de reparación de las células tubulares proximales y con respecto a esto, en el análisis histológico de los riñones de ratas expuestas crónicamente al PM se observó pérdida de la membrana del borde en cepillo y edema de las células tubulares proximales en las primeras 6 semanas de intoxicación, con un restablecimiento parcial de la integridad tubular en las últimas 2

semanas de experimentación, sin llegar a igualar al grupo control, concordando con las alteraciones de la actividad enzimática observadas. 2) Glucosuria a lo largo de todo el experimento, cuyas posibles explicaciones son las siguientes: el aumento en la concentración de glucosa en sangre (hiperglucemia) antes mencionado, incrementa la masa filtrada de esta molécula, saturando los transportadores de glucosa de las células tubulares proximales; recordemos que este monosacárido es filtrado libremente en los glomérulos debido a su tamaño y que posteriormente es reabsorbido a través de un cotransporte con Na^+ en el segmento tubular proximal. En condiciones normales los transportadores de glucosa son capaces de reabsorber casi en su totalidad la glucosa filtrada, sin embargo, al incrementar su concentración en el filtrado glomerular son saturados conduciendo a la pérdida de esta molécula en la orina. También es factible que el PM alterara selectivamente a los transportadores de glucosa, ya que estos poseen grupos OH en sus sitios de unión a glucosa que podrían ser fosforilados e inhibidos [Mueckler y col., 1985; Mueckler 1994; Gould y Holman, 1993; Medina y Owen., 2002; Pascual y col 2004]. Una tercera posibilidad es que la glucosuria observada sea el resultado de la combinación de la saturación de los transportadores de glucosa, la inhibición selectiva de éstos y el daño en los túbulos renales observado en el estudio histológico [Pascual y col., 2004].

En el contexto de daño tubular, el fosfato inorgánico (Pi) filtrado por los glomérulos es reabsorbido por transportadores en la membrana apical de las células proximales a través de un cotransporte Na-Pi. En el polo basal diferentes tipos de sistemas transportadores están involucrados en el intercambio de Pi del intersticio [Murer y col., 1991; Murer y Biber, 1996]. La disminución de la reabsorción tubular de Pi indica daño renal, por lo tanto, la fosfatúria y la glucosuria indican alteraciones funcionales en el segmento proximal de la nefrona, el cual fue corroborado por el análisis histológico [Jaramillo-Juráez y col. 2008]. En este trabajo solo se observó incremento significativo de la masa excretada de fosfatos durante la 7ª semana de intoxicación.

Con respecto a la excreción de proteínas totales en orina (proteinuria) en los grupos estudiados no se obtuvieron datos relevantes, sin embargo durante la 7ª semana de exposición a PM se observó un incremento estadísticamente significativo en la masa excretada de albúmina. La proteinuria se refiere a la pérdida de proteínas en orina

provocada por el incremento de la permeabilidad de la barrera glomerular o por la reducción de la reabsorción tubular. Existen varios factores que afectan el manejo renal de las proteínas, como las características estructurales de la cápsula de Bowman, del endotelio de capilares glomerulares y las propiedades fisicoquímicas de las proteínas plasmáticas, por lo que cambios patológicos a nivel glomerular o túbulo-intersticial pueden provocar proteinuria. Proteínas con un alto peso molecular como la albúmina están confinadas en el espacio vascular por la membrana basal de los capilares glomerulares, por lo que la presencia en orina de esta molécula en las ratas tratadas con PM indica daño en esta zona, además recordemos que en análisis histológico de los riñones de ratas expuestas a este pesticida se observó engrosamiento de la membrana basal capilar y de la cápsula de Bowman, así como incremento del número de células mesangiales.

Adicionalmente a los hallazgos antes mencionados, se observó que la exposición crónica de los animales al PM provoca cambios en la concentración de GSH y actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx). De hecho, varios estudios han reportado que el estrés oxidativo juega un papel importante en la toxicidad de pesticidas organofosforados (POF) en animales y humanos [Soltaninejad y Abdollahi, 2009]. En el estrés oxidativo se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros radicales libres. Las ROS están involucrados en una amplia variedad de fenómenos biológicos como inflamación y enfermedades degenerativas [Ranjbar y col., 2009; Gupta y col., 2005]. Se ha demostrado que la intoxicación aguda con POF está relacionada con producción de ROS y lipoperoxidación (LPO) [Pournourmohammade S. y col 2007; Datt C. y col., 1994], por ejemplo, Piña-Guzman y col. (2006), reportaron en ratas intoxicadas agudamente con PM, un incremento en LPO. La prevención de LPO es un proceso esencial para organismos aerobios debido al daño celular provocado por los radicales libres; una de las defensas antioxidantes más importante de sistemas biológicos para contrarrestar el daño por radicales libres incluye el empleo de compuestos antioxidantes como el GSH y enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa o la GPx [Matés, 2000; Halliwell y Gutteridge, 1990]. Por lo tanto, el incremento de LPO reportada para POF puede explicar la disminución de GSH observado en el grupo de ratas tratadas con PM, además, el incremento de actividad de la GPx, enzima que cataliza la reducción de hidroperóxidos

como el H₂O₂ usando GSH, puede ser un fenómeno de inducción enzimática para protección de las células renales en contra del daño oxidativo causado por este pesticida [Rushmore y col., 1993; Michio Asahi y col., 1995; Radjendirane y col., 1997; Wirth, 1998; Arthur, 2000; Haan y col., 2005]. Adicionalmente, Pedzik A. y col (2010) reportaron que la pérdida del balance ERO/antioxidantes produce cambios en el número de células mesangiales, fenómeno ampliamente observado en pacientes con glomerulonefritis y síndrome nefrótico, siendo esto una explicación al incremento de células mesangiales observado en los corpúsculos renales de las ratas expuestas crónicamente a PM.

El estrés oxidativo y la LPO también puede alterar la estructura de los organelos celulares como la membrana citoplásmica, lo cual conduciría a la pérdida o liberación de de diversas moléculas presentes en este sitio, como algunas proteínas, por lo que este fenómeno puede estar relacionado con el incremento de la actividad urinaria de γ -glutamyltranspeptidasa observada en este trabajo. En estudios *in vitro* usando células de epitelio tubular se ha reportado que el Dicrotofós (POF) provoca citotoxicidad, implicando en parte a la producción de ERO y LPO, por lo que los autores de este trabajo proponen que además de la hipotensión provocada por los POF, el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de la necrosis tubular aguda [Poovala y col., 1999].

En el análisis inmunohistoquímico de los riñones de ratas Wistar en el grupo control se observó marcaje para Cl2 en los bordes basales y laterales de las células tubulares proximales, mientras que en el grupo expuesto a PM se identificó incremento del inmuno-marcaje para Cl2, inicialmente en el borde basal en las primeras 4 semanas de tratamiento y posteriormente en el citoplasma a la 6^a semana, con un restablecimiento parcial de su expresión en la 8^a semana de intoxicación; Así mismo se observó disminución del inmuno-marcaje para DppIV en el borde en cepillo, indicando pérdida de dicha estructura y restitución parcial del inmuno-marcaje en la última semana de tratamiento, concordando con los cambios identificados en el análisis histológico de los riñones. Con respecto al daño celular mediado por estrés oxidativo, esta reportado que diversos xenobióticos como metales pesados (Cd y Pb) y algunos antibióticos (gentamicina) causan alteraciones en el balance prooxidante/antioxidante en células del parénquima renal y provocan cambios en el nivel de expresión y distribución de proteínas de unión intercelular

como la Cl2, que normalmente se localiza en los bordes apical y lateral de las células tubulares proximales y que en respuesta a la exposición a este tipo de compuestos cambia su ubicación, hacia el borde basal y el citoplasma celular [Prozialeck y Edwards , 2007; Reyes y col, 2007; Chirino y col., 2006]. Lo anterior demuestra que el PM al igual que otros xenobióticos que generan estrés oxidativo en los riñones produce alteraciones en la distribución Cl2 en los túbulos proximales del riñón de ratas expuestas crónicamente a este pesticida. No existen reportes que indiquen la distribución normal de Cl2 en la membrana basal de células epiteliales que expliquen nuestros hallazgos en ratas controles, no obstante, es claro el cambio en el nivel de expresión y localización de esta proteína al exponer a los animales de experimentación al PM, por lo que los resultados de este trabajo aportan evidencia que indica un posible mecanismo de daño renal por exposición crónica a este insecticida mediado por la pérdida de uniones de oclusión en el epitelio del túbulo proximal, el cual conduce a una alteración en el transporte por la vía paracelular.

Con respecto a la expresión genética de los genes estudiados en corteza renal en nuestro trabajo observamos disminución de la expresión de TNF- α y BAX durante las primeras semanas de experimentación con una tendencia a la restitución de su expresión en las últimas semanas de intoxicación. El TNF- α es una citocina proinflamatoria, por lo que su liberación está involucrada en la activación de las células endoteliales, secreción de ON, incremento de la permeabilidad vascular, activación del sistema inmune y promoción de la apoptosis. La inhibición de la producción del TNF- α podría provocar alteraciones o modificaciones en todos los procesos antes mencionados. BAX es una molécula proapoptótica que promueve la activación de la vía de las caspasas, las cuales forman un canal de alta conductancia en la membrana mitocondrial provocando la salida del citocromo C conduciendo a la apoptosis [Aguillón y col., 2002].

La disminución de la expresión de BAX y TNF- α identificado en este estudio puede estar relacionado con los procesos de apoptosis y reparación del tejido dañado. Con respecto a esto último, en el estudio histológico de los riñones de los animales intoxicados con PM no se observaron zonas necróticas ni cuerpos apoptóticos a diferencia del trabajo elaborado por Kalender y col. (2007) en el cual reportaron la presencia de células inflamatorias y zonas necróticas en los riñones de ratas después de su exposición aguda a

PM. Nuestros hallazgos son posiblemente el resultado de un proceso de reparación celular del tejido renal afectado. Además, se ha reportado en ratas expuesta crónicamente a PM y otros organofosforados alteraciones de los sistemas endocrinos, inmune y genotoxicidad, esto último nos confirma que el PM es capaz de causar cambios en la expresión genética, concordando con los cambios en la expresión de los genes estudiados en la corteza renal de los animales de experimentación [*Liu y col, 2007; Lui y col, 2006; Undeger y col, 2000; Institoris L. y col 1995*].



CONCLUSIÓN

El tratamiento de ratas Wistar machos adultos a bajas dosis de PM en diferentes tiempos ocasionó:

1. Exposición subaguda:

Daño hepático caracterizado por alteraciones en los hepatocitos del área centrolobulillar, caracterizadas por una disminución del glucógeno y degeneración grasa.

2. Exposición crónica:

Daño renal, causando cambios bioquímicos, funcionales y estructurales. Estos efectos nefrotóxicos se relacionaron con:

- a. Disminución del flujo urinario de la 2^a-8^a semana de intoxicación.
- b. Proteinuria a la 7^a semana de exposición
- c. Daño en el sistema de filtración glomerular:
 - i. Provocando por alteraciones en la TFG caracterizada por: modificaciones en la depuración de creatinina, cambios en la excreción urinaria de creatinina e incremento de la concentración plasmática de esta molécula en las primeras dos semanas de exposición.
 - ii. Daño estructural de los corpúsculos renales que incluyeron: aumento del número de células mesangiales, engrosamiento de la membrana basal capilar y de la hoja parietal de la cápsula de Bowman.
- d. Daño en los túbulos renales proximales, provocando enzimuria y alteraciones estructurales como edema celular, vacuolización citoplásmica, aparición de gránulos PAS+ y pérdida de la membrana del borde en cepillo, así como alteraciones en el nivel de expresión y localización de Cl2 en las células epiteliales de los túbulos renales proximales.
- e. Disminución de la expresión de BAX y TNF- α en la corteza renal.

PROSPECTIVA

Los efectos tóxicos causados por la exposición a PM pueden estar relacionados con estrés oxidativo, por lo que el empleo de terapias dirigidas a contrarrestar este tipo de daño celular podría ser útil para evitar o disminuir los efectos nefrotóxicos causados por la exposición crónica al PM, sin embargo hacen falta más investigaciones para poder confirmarlo.

Es importante señalar que las alteraciones provocadas por la exposición crónica a bajas concentraciones de PM en humanos pueden desencadenar ERC, generando grandes gastos para la sociedad y la familia involucrada. Por tal motivo es necesario elaborar estudios más detallados sobre exposición crónica a pesticidas organofosforados

ANEXO1

Cálculo de la actividad de GPx

Los volúmenes empleados para cada reacción y la fórmula empleada para calcular la actividad de GPx se muestran a continuación:

	Buffer de Ensayo (μl)	NADPH (μl)	Estándar de GPx (μl)	Muestra (μl)	t-Bu-OOH (μl)
Blanco	235	12.5	-----	-----	2.5
Control	230	12.5	5	-----	2.5
Positivo	225	12.5	10	-----	2.5
Problema	225	12.5	-----	10	2.5

Cálculos.

La actividad de GPx en las muestras fue calculada empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{(\Delta A_{340}) (DF)}{(6.22) (V)}$$

Donde:

$$\Delta A_{340} = A_{340}/\text{min. (del blanco)} - A_{340}/\text{min. (de la muestra)}$$

$$6.22 = \epsilon^{\text{mM}} \text{ par el NADPH}$$

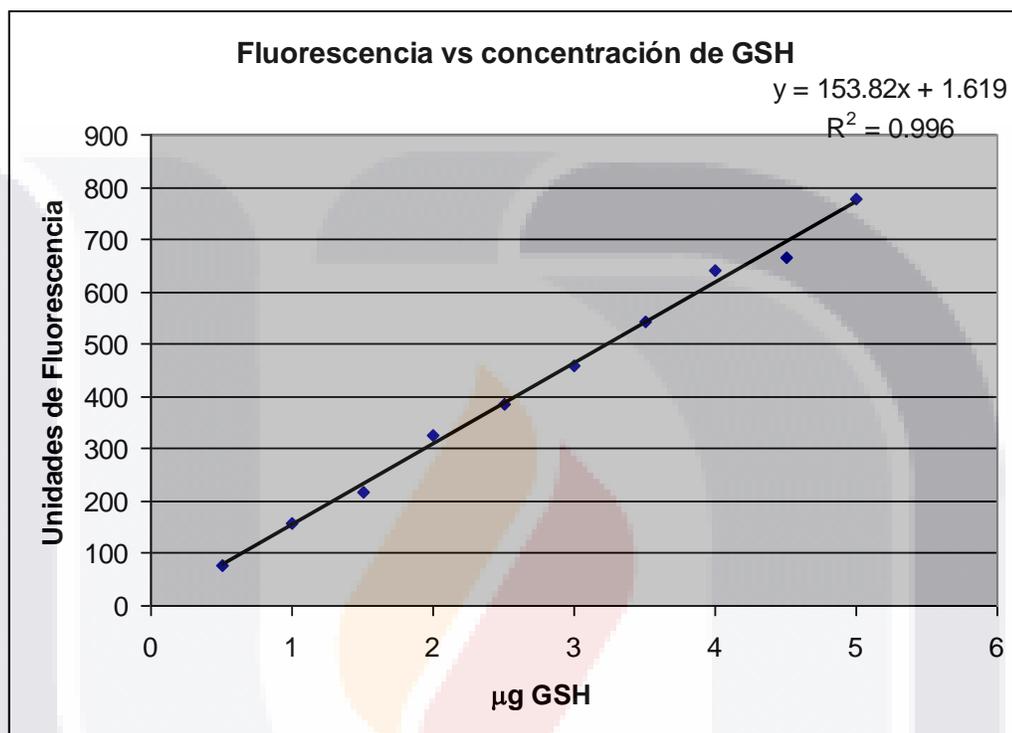
DF = Factor de dilución de la muestra antes de agregarse a la mezcla de reacción.

V = Volumen de la muestra en ml.

Las unidades del resultado de este cálculo se podrá expresar de la siguiente manera:

$$\text{mmol/min/ml} = \text{U/ml.}$$

ANEXO 2



Tomando en cuenta la fórmula " $y=153.82x + 1.619$ " la concentración de GSH/g de tejido se calculó de la siguiente manera:

$$([(UF_{\text{problema}} - UF_{\text{blanco}}) * (1/m)] - 1.619) * (FD)$$

Donde:

UF_{problema} = Unidades de fluorescencia del problema

UF_{control} = Unidades de fluorescencia del control

$1/m$ = Inverso de la pendiente, $1/153.82$

FD = Factor de dilución (400)

ANEXO 3

HEPATOTOXICIDAD SUBAGUDA Y CRÓNICA PRODUCIDA POR EL PLAGUICIDA PARATIÓN-METÍLICO EN LA RATA

ACUTE AND CHRONIC HEPATOTOXICITY PRODUCED BY METHYL PARATHION PESTICIDE IN THE RAT

Victor Hugo Fuentes Delgado¹, Cindy L. Quezada Aguilera¹, Ma. Consolación Martínez Saldaña¹, Fernando Jaramillo Juárez¹, Ma. Luisa Rodríguez Vázquez¹, Francisco Jaramillo González¹, José Luis Reyes Sánchez².

¹Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.

² Depto. de Fisiología y Neurociencias, Centro de Investigación y Estudios avanzados

Clasificación del trabajo presentado: Trabajo Científico.

* Correspondencia

Dr. Fernando Jaramillo Juárez

Universidad Autónoma de Aguascalientes

Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Fisiología y Farmacología

Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, CP 20131

Aguascalientes, Ags., México

Teléfono (449)-910-8400, Fax (449)-910-8401

Correo electrónico: jara@att.net.mx

Resumen

El paratión metílico (PM) es un plaguicida organofosforado muy utilizado en la agricultura. En el humano es absorbido por diferentes vías. En este trabajo se investigó el daño oxidativo y estructural del hígado de ratas Wistar tratadas con PM. En la exposición subaguda a este plaguicida (3 mg/Kg/día, oral, 20 días) encontramos incrementos significativos ($p < 0.05$) en las actividades séricas de TGO (500 %) y TGP (937 %), aumento en la concentración de malondialdehído (213 %) y disminución de la concentración de ATP en el hígado (29.3 %). En la exposición crónica al PM (0.56 mg/Kg/día, oral, 6 semanas) hubo vacuolización citoplásmica de los hepatocitos (inclusiones de lípidos), particularmente en el área centrolobulillar del hígado. Concluimos que el PM produce daño hepático oxidativo y estructural durante la exposición subaguda y crónica, respectivamente.

Palabras clave: metil paratión, plaguicidas organofosforados, estrés oxidativo, daño hepático.

Abstract

Methyl parathion (PM) is an organophosphate pesticide extensively used in agriculture. In the human it is absorbed through different routes. In this work, we investigated the oxidative and structural liver damage induced by PM in Wistar rats. At the subacute exposition (3 mg/Kg/day, oral, 20 days) there was a significantly increase ($p < 0.05$) in the serum activities of GOT (500 %) and GPT (937 %), the malondialdehyde concentration increased (213 %) and the ATP concentration decreased (29.3 %) in liver; PM also significantly decreased the hepatic concentration of ATP (29.3 %). At the chronic exposition (0.56 mg/Kg/day, oral, 6 weeks) there was an extensive vacuolization in the hepatocytes (lipid accumulation), mainly in the central lobe area of the liver. We concluded that PM produces hepatic oxidative and structural damage during subacute and chronic exposition, respectively.

Key words: methyl parathion, organophosphate pesticides, oxidative stress, hepatic damage.

Introducción

Los plaguicidas organofosforados (POF) son compuestos usados frecuentemente en la agricultura como insecticidas y fungicidas, además tienen otras aplicaciones como helminticidas, acaricidas y nematocidas ^(1, 2, 3, 4). El paratión metílico (PM) es uno de estos compuestos que es absorbido en los mamíferos por diferentes vías (oral, dérmica y pulmonar), se distribuye rápidamente en los tejidos corporales y se biotransforma en el hígado generando al metabolito activo metil-paraoxón ⁽⁵⁾. Las intoxicaciones agudas por POF son muy frecuentes y sus efectos nocivos se deben principalmente a la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) en el sistema nervioso central y periférico, lo que ocasiona la acumulación de acetilcolina en las sinapsis colinérgicas y la potenciación de su estímulo sobre los receptores colinérgicos (muscarínicos y nicotínicos) de ambos sistemas. ^(6, 7, 8, 9). Los efectos generales que resultan de la acumulación de acetilcolina son: potenciación de la actividad parasimpática postganglionar, despolarización persistente del músculo esquelético y estimulación inicial de las células del sistema nervioso central seguida por depresión de las mismas ^(7, 10). La muerte puede ocurrir por paro respiratorio debido a la acción sinérgica derivada del bloqueo del centro de la respiración, broncospasmo y parálisis de los músculos respiratorios ⁽¹¹⁾. La Dosis Letal-50 (DL-50) del PM es de 14 mg/Kg de peso corporal en ratas machos adultos ^(12, 13).

Los POF también producen toxicidad subaguda y crónica aunque se conoce menos acerca de estos fenómenos. Al respecto, ha sido descrito que en los trabajadores expuestos a estos compuestos se presentan tiempos de protrombina aumentados ⁽¹⁴⁾, mientras que en las ratas tratadas con diazinón o malatión se modifica el tiempo de coagulación de la sangre ⁽¹⁵⁾. Además, se ha reportado que en ratas expuestas al diazinón aumenta la liberación de glucosa hepática (glucogenólisis) como un mecanismo de acción no colinérgico ⁽¹⁶⁾. Estudios recientes relacionan la toxicidad inducida por los POF con un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (estrés oxidativo celular) ^(17, 18).

En este contexto, debido a la importancia del hígado en el mantenimiento de la homeostasis corporal y a su gran capacidad para metabolizar xenobióticos, el objetivo de este trabajo fue investigar el daño oxidativo y las alteraciones estructurales de este órgano producidas por el PM, administrado a ratas Wistar en forma subaguda y crónica.

Material y métodos

Se usó paratión-metílico grado técnico (95% de pureza) (Cheminova Agro de México, S. A. de C. V.), el cual fue disuelto en aceite de maíz libre de antioxidantes. Todos los demás reactivos utilizados fueron grado analítico (JT Baker). Se trabajó con ratas Wistar machos (250 g \pm 20 g), las cuales fueron colocadas en jaulas limpias y tuvieron acceso libre al agua y al alimento para roedores (Ralston Rations-Kansas, KA). La temperatura ambiente fue de 24 \pm 2 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h. El cuidado y manejo de los animales se hizo de acuerdo a las normas internacionales establecidas para ello (Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology).

Protocolos experimentales

a) Estudios de toxicidad subaguda.

Las ratas fueron distribuidas en dos grupos (N=9/grupo): testigos y tratados. Los animales tratados recibieron PM (3 mg/Kg/día, vía oral) disuelto en aceite de maíz, durante 20 días, mientras que los animales testigos solamente recibieron aceite de maíz, por vía oral, durante 20 días. Al finalizar el tratamiento, se obtuvieron muestras de sangre de la arteria caudal de las ratas y se determinaron las actividades séricas de las transaminasas glutámico-pirúvica (GPT) y glutámico-oxalacética (GOT)⁽¹⁹⁾. Posteriormente, los animales fueron sacrificados y se cuantificaron las concentraciones hepáticas de malondialdehído (MDA)⁽²⁰⁾ y de ATP⁽²¹⁾.

b) Estudios de toxicidad crónica.

Las ratas se dividieron en dos grupos: testigos (N=12) y tratados (N=18). Los animales tratados recibieron PM (0.56 mg/Kg, oral) disuelto en aceite de maíz, durante 6 semanas. El grupo testigo recibió solamente aceite de maíz, por vía oral, en volúmenes equivalentes a los animales del grupo tratado. Al finalizar la cuarta y sexta semanas de tratamiento, se obtuvieron muestras de hígado para realizar su evaluación estructural.

Para ello, los hígados de 3 ratas fueron fijados *in situ* por vía intravascular y procesados mediante la técnica histológica por inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes de 5 μ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H/E) y PAS (reacción del ácido peryódico de Schiff). El análisis de los cortes se realizó por microscopía óptica. Se revisaron 3 laminillas con tejido hepático de cada rata y se determinaron las alteraciones estructurales de los hepatocitos.

c) Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de este estudio son expresados como la media (\pm error estándar). Las comparaciones estadísticas se hicieron con la prueba *t-Student*, considerando las diferencias significativas con $P < 0.05$.

Resultados y discusión

En las últimas décadas, el uso de los POF se ha incrementado de manera importante lo que ha permitido su distribución amplia en el ambiente y la generación de efectos nocivos sobre los seres vivos. La contaminación del humano por los plaguicidas se realiza de forma directa o indirecta. La primera es consecuencia de la exposición de los trabajadores que sintetizan estos compuestos o de las personas que los aplican (agricultores, jardineros y fumigadores). La segunda resulta de la exposición de la población a los plaguicidas por accidentes, contaminación del ambiente y por los residuos de estas sustancias en los alimentos ^(22, 23).

a) Estudios de toxicidad subaguda.

La toxicidad de los plaguicidas organofosforados (POF) originalmente fue caracterizada por su acción inhibitoria de la acetilcolinesterasa (AChE) y las alteraciones de la transmisión colinérgica en los mamíferos ⁽²⁴⁾. Posteriormente, algunos estudios demostraron otros efectos nocivos de estos compuestos que no estaban relacionados de manera directa con la inhibición de esta enzima ⁽²⁵⁾. Al respecto, la exposición del humano y de los animales a los plaguicidas puede desencadenar procesos nocivos como el estrés oxidativo celular ⁽²⁶⁾.

Debe señalarse que la toxicidad de un xenobiótico se relaciona con la dosis ingerida y el tiempo de exposición. En este trabajo, los animales de experimentación recibieron PM a dosis bajas (2/10 de la DL-50 por día, durante 20 días), lo cual fue suficiente para dañar al hígado. En efecto, con relación al grupo control, las ratas tratadas con PM presentaron los siguientes efectos tóxicos:

1) Las actividades plasmáticas de las transaminasas estudiadas aumentaron de manera significativa: TGO (500 %) y TGP (937 %) (Figuras 1 y 2).

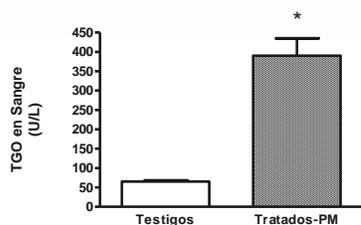


Figura 1. Actividad de la transaminasa glutámico-oxalacético (TGO) en ratas Wistar machos tratados con paratión-metílico (3 mg/Kg/día, oral, 20 días). Se presentan los valores medios (\pm eem), (* $P < 0.05$).

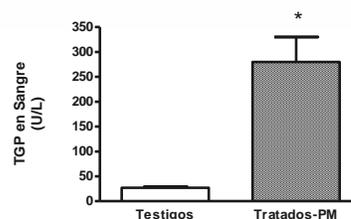


Figura 2. Actividad de la transaminasa glutámico-pirúvica (TGP) en ratas Wistar machos tratados con paratión-metílico (3 mg/Kg/día, oral, 20 días). Se presentan los valores medios (\pm eem), (* $P < 0.05$).

El incremento de las actividades séricas de estas enzimas se relaciona con el proceso de necrosis celular. Cuando esto sucede, las transaminasas antes citadas pasan a la sangre en cantidades proporcionales a la lesión tisular. Conviene señalar que la actividad plasmática de la TGO aumenta cuando hay lesión en la mayoría de los órganos y que la TGP es específica para el hígado. Esto facilita la identificación de hepatopatías y de otros padecimientos ^(27, 28). En este contexto, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por otros autores, ya que ha sido descrito que las actividades séricas de la TGO y TGP aumentan en ratas machos y hembras, luego de la intoxicación aguda con PM ⁽²⁹⁾. Además, se ha reportado que la exposición de ratas Wistar al PM, durante tres meses, disminuye significativamente la concentración de grupos tioles (-SH) libres y unidos a proteínas, en el hígado y los riñones. Esto fue relacionado con la capacidad del PM para producir estrés oxidativo ⁽³⁰⁾.

2) La concentración hepática de malondialdehído (MDA) aumentó significativamente (213 %) (Figura 3).

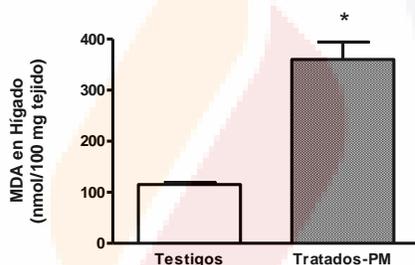


Figura 3. Concentración de malondialdehído (MDA) en el hígado de ratas Wistar machos tratados con paratión-metílico (3 mg/Kg/día, oral, 20 días). Se presentan los valores medios (\pm eem), (* $P < 0.05$).

La membrana plasmática de las células se compone principalmente de fosfolípidos, los cuales tienen en su estructura ácidos grasos poliinsaturados que le dan fluidez. Estos ácidos grasos pueden ser atacados por las especies reactivas de oxígeno que aumentan durante el estrés oxidativo, provocando el proceso de lipoperoxidación, lo que altera la integridad y función de la membrana y puede conducir a su destrucción ⁽³¹⁾. En efecto, en años recientes se ha encontrado que los POF pueden dañar a las células generando estrés oxidativo y alterando el sistema antioxidante. Al respecto, ha sido publicado que estos plaguicidas incrementan la formación de isoprostanos F_2 y de neuroprostanos F_4 (biomarcadores in vivo de la peroxidación lipídica y de la generación de especies reactivas de oxígeno), así como de citrulina, un marcador de la generación de óxido nítrico y de especies reactivas nitrogenadas ^(32, 33).

En este contexto, ha sido descrito que la exposición subcrónica de ratas Wistar al plaguicida organofosforado malatión (100-1500 ppm), durante cuatro semanas, aumenta las actividades de la catalasa y de la superóxido dismutasa, así como la concentración de malondialdehído en el hígado y

en los eritrocitos ⁽³⁴⁾. También se ha reportado que en ratas Wistar machos expuestos a dosis crecientes de malatión (25-150 mg/Kg, durante 28 días) se genera daño oxidativo en el sistema nervioso central al finalizar el tratamiento ⁽³⁵⁾.

3) La concentración de trifosfato de adenosina (ATP) en el hígado disminuyó de manera significativa (29.3 %) (Figura 4).

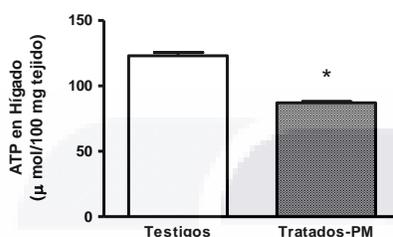


Figura 4. Concentración de trifosfato de adenosina (ATP) en el hígado de ratas Wistar machos tratados con paratión-metílico (3 mg/Kg/día, oral, 20 días). Se presentan los valores medios (\pm eem), (*P<0.05).

Ha sido reportado que durante el estrés oxidativo generado por los POF puede incrementarse el consumo de ATP e inhibirse la fosforilación oxidativa, lo que compromete la capacidad de las células para mantener sus niveles energéticos ^(33, 36). Además, la membrana de las mitocondrias también puede ser dañada por las especies reactivas de oxígeno (lipoperoxidación) disminuyendo con ello la síntesis de ATP ⁽³¹⁾.

En relación con los fenómenos nocivos anteriormente expuestos, también se ha reportado que el PM altera la estructura de la cromatina y el tamaño del ADN de los espermatozoides maduros de ratones expuestos a este plaguicida (3-20 mg/kg, vía intraperitoneal), a los 7 o 28 días de tratamiento. Los autores de este trabajo postulan la participación del estrés oxidativo en esa acción tóxica y señalan el riesgo potencial para los descendientes de los animales expuestos al PM ⁽³⁷⁾.

b) Estudios de toxicidad crónica.

Los hígados de las ratas del grupo control mostraron una estructura y organización normal de los hepatocitos (Figuras 5-A y 6-A). En los hígados de las ratas tratadas con PM durante 4 semanas, la cito-arquitectura fue normal pero disminuyó el volumen de los hepatocitos, además, se presentó una evidente vacuolización en el citoplasma (inclusiones de lípidos), la cual fue muy acentuada en las áreas centrolobulillares (Figuras 5-B y 6-B). A su vez, a las 6 semanas de tratamiento con PM, los hígados de las ratas presentaron hepatocitos con disminución importante en la vacuolización del citoplasma, con persistencia en la reducción del volumen celular y con una organización histológica normal (Figuras 5-C y 6-C).

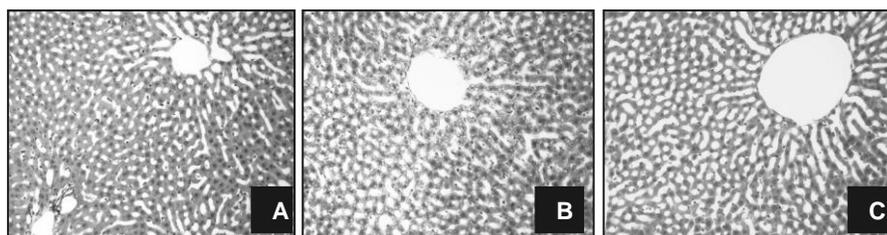


Figura 5. Microfotografía del hígado. A: rata control, B: rata tratada con PM durante 4 semanas, C: rata tratada con PM durante 6 semanas. (H/E AT 100 X).

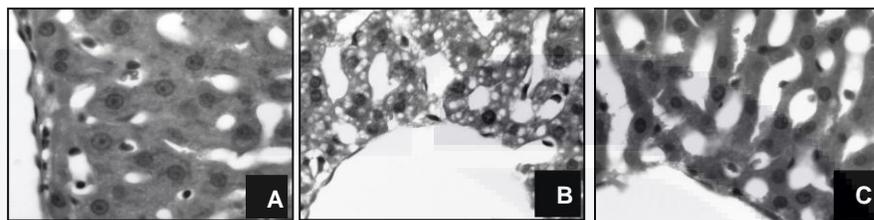


Figura 6. Microfotografía del hígado. A: rata control, B: rata tratada con PM durante 4 semanas, C: rata tratada con PM durante 6 semanas. (H/E AT 400 X).

Finalmente, a las 4 y 6 semanas de tratamiento con PM, los hígados de las ratas presentaron hepatocitos con granulaciones citoplásmicas PAS positivas (Figuras 7-B y 8-C). La intensidad de reacción disminuyó a las 4 y 6 semanas de tratamiento (Figura 8-B y 8-C). Las granulaciones citoplásmicas identificadas con la tinción de PAS corresponden a inclusiones de glucógeno.

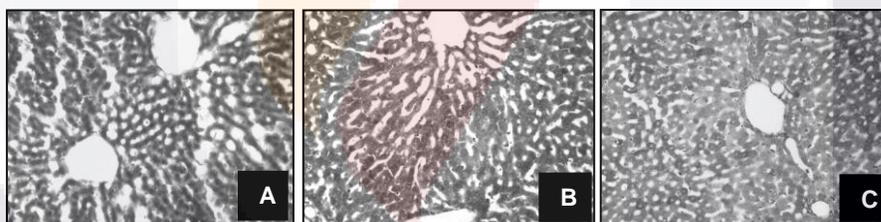


Figura 7. Microfotografía del hígado. A: rata control, B: rata tratada con PM durante 4 semanas, C: rata tratada con PM durante 6 semanas. (PAS AT 100 X).

Nuestros resultados muestran alteraciones estructurales en los hepatocitos de las ratas tratadas con PM (incremento en el depósito de lípidos y disminución de glucógeno) que variaron en función del tiempo de tratamiento. Los efectos nocivos del PM sobre el hígado se pueden relacionar con su acción inhibitoria de algunas esterasas con residuos de serina en su sitio activo, como la colinesterasa plasmática (PCE) y la hidroximetil-glutaril-coenzima A-reductasa (HMG-CoA), principal enzima que regula la síntesis de colesterol. Ha sido reportado que la PCE aumenta en un gran número de pacientes con hiperlipoproteinemia⁽³⁸⁾ y se ha postulado que un incremento en la actividad de esta enzima aumenta a su vez la tasa de secreción de lipoproteínas⁽³⁹⁾.

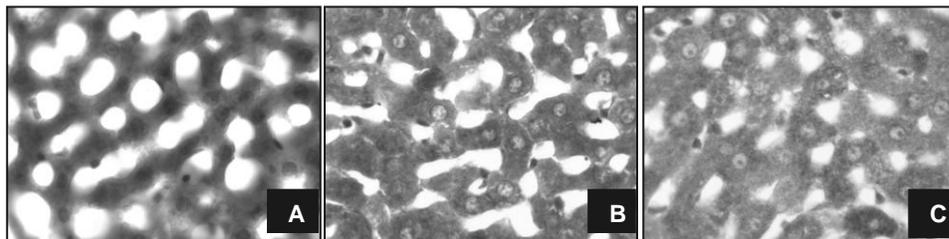


Figura 8. Microfotografía del hígado. A: rata control, B: rata tratada con PM durante 4 semanas, C: rata tratada con PM durante 6 semanas. (PAS AT 400 X).

En estudios de microscopía electrónica se ha encontrado que la exposición aguda de ratas Wistar al plaguicida organofosforado metamidofos produce cambios estructurales de los hepatocitos caracterizados por: incrementos en el contenido de cromatina del núcleo y de la densidad del citoplasma, así como vacuolización relacionada con la destrucción de la matriz de las mitocondrias. En algunas células el contenido de lípidos fue elevado y ocupó la mayor parte del citoplasma, además, en las áreas perisinusoidales aumentó la presencia de fibras de colágeno ⁽⁴⁰⁾. Este reporte coincide con los cambios estructurales que encontramos en el hígado de las ratas tratadas con PM de forma crónica.

Asimismo, se sabe que el PM y otros POF alteran el metabolismo de los carbohidratos ya que se ha reportado hiperglicemia y glucosuria en las intoxicaciones con estos plaguicidas, derivados de efectos colinérgicos en el SNC ^(41, 42). Al respecto, la potenciación de los estímulos de la acetilcolina sobre los receptores nicotínicos del ganglio simpático estimula a su vez a la médula suprarrenal y se liberan catecolaminas, de tal manera que la adrenalina liberada incrementa las concentraciones de glucosa sérica ^(43, 44, 45).

Conclusiones

El paratión metílico daña al hígado durante las intoxicaciones subaguda y crónica. En el primer caso, el daño se relaciona con la generación de estrés oxidativo caracterizado por lipoperoxidación membranal de los hepatocitos, disminución de la síntesis de ATP y necrosis celular. En el segundo caso, el daño está relacionado con alteraciones estructurales de los hepatocitos (incremento en el depósito de lípidos y disminución de glucógeno) que varían en función del tiempo de tratamiento con este plaguicida.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) el apoyo económico otorgado al LAQB Víctor Hugo Fuentes Delgado (Beca No. 204733) para realizar estudios de Doctorado en el área de la Toxicología.

Referencias

1. Oncu M., Gultekin F., Karao E., Altuntas I., Delibas N. 2002. Nephrotoxicity in rats induced by chlorpyrifos-ethyl and ameliorating effects of antioxidants. *Human and Experimental Toxicology*, 21: 223-230.
2. Pajoumand A., Shadniai S., Rezaie A., Abdi M., Abdollahi M. 2004. Benefits of magnesium sulfate in the management of acute human poisoning by organophosphorus insecticides. *Human and Experimental Toxicology*, 23: 565-569.
3. Lein P.J., Fryer A.D. 2005. Organophosphorus insecticides induce airway hyperreactivity by decreasing neuronal M2 muscarinic receptor function independent of acetylcholinesterase inhibition. *Toxicological Science*, 83, 166-176.
4. Guo-Ross S. X., Chambers J. E., Meek E. C., Carr R. L. 2007. Altered muscarinic acetylcholine receptor subtype binding in neonatal rat brain following exposure to chlorpyrifos or methyl parathion. *Toxicological Sciences*, 100, 118-127.
5. WHO. 1993. Methyl Parathion. World Health Organization. *Environmental Health Criteria 145*, Geneva, 13-16.
6. Hahn T., Ruhnke M., Lupp H. 1991. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by the organophosphorus insecticide methylparathion in the central nervous system of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Histochemica*, 91(1):13-9.
7. Taylor Palmer. 1996. Anticolinesterasas. En: Hardman J. G., Limbird L. E., Molinoff P. B., Ruddon R. W., Goodman G. A (eds.), *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 9ª Ed. McGraw-Hill Interamericana, vol.1, pp 171-187.
8. Agarwal S. B. 1993. A clinical, biochemical, neurobehavioral and sociopsychological study of 190 patients admitted to hospital as a result of acute organophosphorus poisoning. *Environmental Research*, 62(1): 63-70.
9. Koksall N., Buyukbese M. A., Guven A., Cetinkaya A., Hasanoglu H. C. 2002. Organophosphate intoxication as a consequence of mouth-to-mouth breathing from an affected case. *Chest*, 122, 740-741.
10. Kramer R. E., Ho I. K. 2002. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methyl parathion. *Chinese Medical Journal*, 65 (5): 187-199.
11. Henao H. S., Corey O. G. 1991. Plaguicidas Inhibidores de las Colinesterasas. *ECO-Organización Panamericana de la Salud*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud-OMS. Serie Vigilancia 11. 1ª Edición.
12. Kimmeler G. 1975. Testing of DDT for combined effect with methyl parathion and fenitrothion in acute tests on rats. *Wuppertal-Elberfeld, Bayer AG, Institute of Toxicology*. Unpublished report No. 5591, submitted to WHO by Bayer AG. Leverkusen, Germany.
13. Gaines T. B. 1969. Acute toxicity of pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 14: 515-534.
14. Murray J. C., Stein F., McGlothlin J. C. 1994. Prolongation of the prothrombin time after organophosphate poisoning. *Pediatric Emergency Care*, 10: 289-290.
15. Lox C. D. 1985. Short term malathion ingestion and blood clotting in the rat. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 6: 51-55.
16. Teimouri F., Amirkibirian N., Esmaily H., Mohammadirad A., Aliahmadi A., Abdollahi M. 2006. Alteration of hepatic cells glucose metabolism as a non-cholinergic detoxication mechanism in counteracting diazinon-induced oxidative stress. *Human and Experimental Toxicology*, 25 (12): 697-703.
17. Akhgari M., Abdollahi M., Kebryaezadeh A., Hosseini R., Sabzevari O. 2003. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human and Experimental Toxicology*, 22(4): 205-211.
18. Soltaninejad K., Abdollahi M. 2009. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: A systematic review. *Medical Science Monitor*, 15(3): RA75-RA90.
19. Schlebusch H., Rick W., Lang H., Knedel M. 1974. Standards in the activities of clinically important enzymes. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 99(15): 765-766.
20. Jentsch A. M., Bachmann H., Furst P., Biesalski H. K. 1996. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20:251-256.
21. Adams H. 1963. Adenosine-5-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase. In: Bergmeyer (ed.), *Methods of enzymatic analysis*. Ed. Academic Press, pp 539-543.
22. Datta J., Gupta J., Sarkar A., Sengupta D. 1992. Effects of organophosphorus insecticide phosphomidon on antioxidant defense components of human erythrocyte and plasma. *Indian Journal of Experimental Biology*, 30: 65-67.
23. Jaramillo Juárez F., Rodríguez Vázquez M. L., Meléndez Camargo M. E., Aldana Madrid M. L. 2009. Toxicología de los Plaguicidas. En: Jaramillo Juárez F., Rincón Sánchez ER., Rico Martínez R. (eds.), *Toxicología Ambiental*. 1ª Ed. Ed. UAA-U de G, pp. 287-322.
24. Forsyth C. S., Chambers J. E. 1989. Activation and degradation of the phosphorothionate insecticides parathion and EPN by rat brain. *Biochemical Pharmacology*, 38: 1597-1603.
25. Brown M.A., Brix K. A. 1998. Review of health consequences from high, intermediate and low-level exposure to organophosphorus nerve agents. *Journal of Applied Toxicology*, 18: 393-408.
26. Turrens J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552: 335-344.
27. Pincus M. R., Zimmerman H. J., Henry J. B. 2000. Enzimología Clínica. En: Henry J. B. (ed.), *Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio*. 9ª Edición, Ed. MASSON, Cap. 13, pp. 259-292.
28. Fischbach FT: Manual de Pruebas Diagnósticas. 5ª. Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. pp. 1149-1997.

29. Sonnenschein P., Golbs S., Wiezorek W. D. 1989. The fermentation diagnosis and histologic studies in blood and the liver of surviving rats after 1 and 2 administrations of a median toxic dose of parathion methyl. Results of studies on the activities of the plasma enzymes AIAT, AsAT, AP and gamma-GT. *Archiv fur Experimentelle Vetrinarmedizin*, 43(1): 1-8.
30. Yildiz D., Dalkilic S., Yildiz H., Oztas H. 2006. Methyl parathion-induced changes in free and protein-bound SH levels in rat tissues. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 16(7): 347-352.
31. Banerjee B. D., Seth V., Ahmed R. S. 2001. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Reviews on Environmental Health*, 16: 1- 40.
32. Gupta R. C., Milatovic S., Montine T. J., Dettbarn W. D., Milatovic D. 2005. Oxidative stress involvement in neurotoxicity of organophosphates and carbamates. *Toxicological Sciences*, 84 (1-S): 204-205.
33. Milatovic D., Gupta R. C., Aschner M. 2006. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *Scientific World Journal*, 6: 295-310.
34. Akhgari M., Abdollahi M., Kebryaezadeh A., Hosseini R., Sabzevari O. 2003. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human and Experimental Toxicology*, 22 (4): 205-211.
35. Fortunato J. J., Agostinho F. R., Reus G. Z., Petronilho F. C., Dal-Pizzol F., Quevedo J. 2006. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. *Neurotoxicology Research*, 9(1): 23-28.
36. Giordano G., Afsharnejad Z., Guizzetti M., Vitalone A., Kavanagh T. J., Costa L. G. 2007. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 219 (2-3): 181-189.
37. Piña-Guzmán B., Solís-Heredia M. J., Rojas-García A. E., Urióstegui-Acosta M., Quintanilla-Vega B. 2006. Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216 (2): 216-224.
38. Cucuiaunu M., Popescu T. A., Haragus S. 1968. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipaemic subjects. *Clinica Chimica Acta*, 22:157-155.
39. Cucuiaunu M., Popescu T. A., Opeincaru A. 1975. Serum pseudocholinesterase and ceruloplasmin in various types of hyperlipoproteinemia. *Clinica Chimica Acta*, 22(59): 19-27.
40. Salim S, Deniz S, Ozgul T, Zikret K, Mehmet K. 2004. Ultrastructural changes in rat liver treated with pralidoxime following acute organophosphate poisoning. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, 71(6): 405-410.
41. Srivastava A. K., Singh N. N. 1981. Effects of acute exposure to methyl parathion on carbohydrate metabolism. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 48(1): 26-31.
42. Tafuri J., Roberts J. 1987. Organophosphate poisoning. *Annals of Emergency Medicine*, 16:193-202.
43. Gunby P. 1979. Help with pesticide poisoning. *Journal of the American Medical Association*, 242: 597-598.
44. Veltri J., Litovitz T. 1984. Annual Report of The American Association of Poison Control Centers National Data Collecting System. *American Journal of Emergency Medicine*, 2: 420-443.
45. Mack R. 1983. Toxic encounters of the dangerous kind. *North Carolina Medical Journal*, 44: 103-105.

GLOSARIO

ACh: Acetil colina.

AChE: Acetil colinesterasa.

ADMF: ácido dimetilfosfórico.

ADMTF: ácido dimetil-tiofosfórico.

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

AMF: ácido metilfosfórico.

AO: Aniones orgánicos.

AOT: Transportador de aniones orgánicos.

BUN: Nitrógeno ureico en sangre.

CL50: Concentración letal 50.

CYP450: Citocromo P450.

DDT: Dicloro difenil tricloroetano.

DL₅₀: Dosis letal 50.

GPx: Glutation peroxidasa.

GSH: Glutation reducido.

MDA: Malondialdehído.

PM: Paratión metílico.

pNp: p-Nitrofenol.

PO: Pesticida organofosforado.

PEF: Presión efectiva de filtración.

RL: Radical libre.

TFG: Tasa de filtración glomerular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas R., Schultz I. R., Doddapaneni S. y Hayton W. L., “Toxicokinetics of Parathion an Paraoxon in Rainbow Trout After Intravascular Administration and Water Exposure”, *Toxicology and Applied Pharamcology*, Vol. 136, No 24, 1996.
2. Aguillón J., Cruzat A., Cuenca J. y Cuchacovich M., “El polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral alfa como factor de riesgo en patología”, *Rev Méd Chile*, Vol. 130, No 1, 1043-1050, 2002.
3. Alan S. L. Yu, Alissa H. Enck, Wayne I. Lencer, and Eveline E. Schneeberger, “Claudin-8 Expression in Madin-Darby Canine Kidney Cells Augments the Paracellular Barrier to Cation Permeation”, *The journal of biological chemistry*, Vol. 278, No. 19, 2003.
4. Arthur J.R. “The glutathione peroxidases”, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, Vol 57, No. 1, 2000, 1825–1835.
5. Balkovetz, D. F., “Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability”, *Am. J. Physiol, Renal Physiol*, Vol. 290, 2006.
6. Baltazares-Lipp M., Rodríguez-Crespo H., Ortega-Martínez J., Sotres-Vega A., “Sistema Endotelina”, *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.*, Vol.18, Num. 4, 308-320, 2005.
7. Barr D. B. y Angerer J., Potential Uses of Biomonitoring Data: A Case Study Using the Organophosphorus Pesticides Chlorpyrifos and Malathion, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 114, No. 11, November 2006.
8. Bev-Lorraine Trae and Dreisbach R. B., “Hand book of Poisoning”, 3ª ed., Parthenon Publishing, 2002.
9. Braeckman R. A., Godefoot M. G., Blondeel G. M., Belpaire F. M. “Kinetic Analysis of the Fate of Methyl Parathion in the Dog”, *Toxicology*, Vol. 1, No. 43, 1980.
10. Castillo R., Huerta P., Carrasco R. y Rodrigo R., “Estrés oxidativo y daño renal”, *CIMEL*, Vol. 8, No. 1, 2003.
11. Castro R., Ramírez V. y Cuenca P., Micronúcleos y otras anomalías nucleares en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas, *Revista Biología Tropical*, Vol. 52, No. 3, Septiembre del 2004.
12. Chambers Janice E. and Oppenheimer Seth F., “Organophosphates, Serine esterase inhibition, and modeling of organophosphate toxicity”, *Toxicological Sciences*, Vol 77, No 2, 2004.
13. Chirino Y. I., Orozco-Ibarra M., Pedraza-Chaverrí J., “Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades”, *Rev. invest. clín.*, Vol. 58, No.4, 2006.
14. Cícero Falcão M., Yassuhiko Okay and Araújo Ramos J. L., “Relationship between plasma creatinine concentration and glomerular filtration in preterm newborn infants”, *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.*, Vol 54, No 4, 1999.
15. Córdoba D., “Toxicología”, 4ª Ed., Manual moderno, 2001.
16. Cucuiaunu M., Popescu T. A., Haragus S. 1968. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipaemic subjects. *Clinica Chimica Acta*, 22:157-155.
17. Cucuiaunu M., Popescu T. A., Opeincaru A. 1975. Serum pseudocholinesterase and ceruloplasmin in various types of hyperlipoproteinemia. *Clinica Chimica Acta*, 22(59): 19-27.
18. Curthoys NP, Hughey RP. Characterization and physiological function of rat gamma-glutamyltranspeptidase. *Enzyme* 1979; 24(6): 383-403.
19. Datta C, Gupta J, Sengupta D. Interaction of organophosphorus insecticides phosphomidon and malathion on lipid profile and acetylcholinesterase activity in human erythrocyte membrane. *Indian J Med Res* 1994; 100: 87-89.
20. De Beer J., Heyndrickx A., Piette M. y Timperman J., Suicidal Poisoning by MCPA and parathion, *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 4, 1980.
21. De la Iglesia Huerta A. y Delgado Cobos P., “PLAGUICIDAS: Neurotoxicidad y vigilancia de la salud”, Centro Nacional de Medios de Protección. Sevilla-INSHT, Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales España e Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, No 8, 2000.
22. Dikshith T. S., Tandon S. K., Datta K. K., Gupta P. K., “Comparative response of male rats to parathion and lindane: histopathological and biochemical studies”, *Environ Res.*, Vol 1, No 9, 1978.
23. Durán-Nah, J., J. y Collín-Quintal, J., Intoxicación aguda por plaguicidas, *Salud pública de México*, Vol. 42, No. 1, Febrero del 2000.

24. Edwards F. L. and Tchounwou P. B., “Environmental Toxicology and Health Effects Associated with Methyl Parathion Exposure”, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, Vol. 2, No. 3, 2005.
25. Eigenberg D. A., Pazdernik T. L. y Doull J., Hemoperfusion and pharmacokinetic studies with parathion and paroxon in the rat and dog, *Drug Metabolism and Disposition*, The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol 11, No. 4, 1983.
26. Edwards F. L. and Tchounwou P. B., “Environmental Toxicology and Health Effects Associated with Methyl Parathion Exposure”, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, Vol. 2, No. 3, 2005.
27. Eyer F., Meischener V., Kiderlen D, Thiermann H., Worek F., Haberkorn M., Felgenhauer N., Zilker T y Eyer P., Human parathion poisoning, *Toxicol Rev.* Vol 22, No. 3, 2003.
28. Fenske R. A., Chensheng Lu, Simcox N. J, Lowenherz C., Touchtone J., Moate T. F., Allen E. H. y Kissel J. C., Strategies for assessing children’s organophosphorus pesticide exposures in agricultural communities, *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, Vol. 10, No. 6, 2000.
29. Finkelstein Y., Wolff M. y Biegón A., Brain acetylcholinesterase after parathion poisoning: a comparative quantitative histochemical analysis post-mortem, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd., *Toxicology*, Vol 49, 1988.
30. Florentín de Merech, L., “Prevalencia de insuficiencia renal aguda y de sus etiologías más frecuentes en pacientes nefrológicos pediátricos”, *Arch. argent. pediatr* Vol 99, No. 3, 2001.
31. Goldbarg JA, Friedman OM, Pineda EP, Smith EE, Chatterji R, Rutenberg AM: The colorimetric determination of gamma-glutamyl transpeptidase with a synthetic substrate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 91: 61-70, 1960.
32. Gould G. W. and Holman G. D., “The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression”, *Biochem J.* Vol. 15, No. 295, 1993, 329–341.
33. Gunby P. 1979. Help with pesticide poisoning. *Journal of the American Medical Association*, 242: 597-598.
34. Gupta RC, Milotovic S, Montine TJ, Dettbarn WD, Milatovic D. Oxidative stress involvement in neurotoxicity of organophosphates and carbamates. *Toxicol Sci* 2005; 84: 204-205.
35. Guyton A. C., “Fisiología y Fisiopatología Básica”, 2ª ed., Interamericana, 1984.
36. Halliwell B, Gutteridge JMC. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Bio Phys* 1990; 280: 1-8.
37. Hissin P. J. and Hilf R., “A fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues”, *Analytical Biochemistry*, Vol 74, No 1, 1976.
38. Hodgson E. y Levi P. E., “Modern Toxicology”, 2ª ed., Appleton and Lange, 1997.
39. Hryhorczuk D. O., Moomey M., Burton A., Runkle K., Chen E., Saxer T., Slightom U., Dimos J., McCann K., and Barr D., “Urinary p-Nitrophenol As a Biomarker of Household Exposure to Methyl Parathion”, *Environmental Health perspectives*, Vol 110, No. 6, 2002.
40. Institutóris L., Siroki O. and Dési I., “Immunotoxicity study of repeated small doses of dimethoate and methylparathion administered to rats over three generations”, *Hum Exp Toxicol.*, Vol 14, No 11, 879-83, 1995.
41. International Programme on Chemical Safety (IPCS): Organophosphorous Insecticides, A General Introduction. *Environmental Health Criteria No. 63-OMS*, 1a. Edición, (1986).
42. Issei Komuro, Hiroki Kurihara, Takao Sugiyama, Fumimaro Takaku and Yoshio Yazaki, “Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells”, *FEBS Letters*, Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division), Volume 238, number 2, 1988, 249-252.
43. Jacquillet G., et al, “Cadmium causes delayed effects on renal function in the offspring of cadmium-contaminated pregnant female rats”, *Renal physiол.*, Vol. , 2007.
44. Jaramillo-Juárez, Rincón-Sánchez A. R. y Posadas del Río F. A., “Toxicología básica”, 1ª ed, Textos Universitarios, 2006.
45. Jaramillo-Juárez F, Posadas del Río FA, Reyes JL, Rodríguez ML, Sánchez EI, Cuellar LH., “Effects of intrauterine exposure to parathion on the activity of renal ATPases in offspring”, *Appl Toxicol*, Vol 9, No. 6, 1989.
46. Jaramillo-Juárez F, Rodríguez-Vázquez ML, Rincón-Sánchez AR, Martínez-Saldaña MC, Ortiz GG, Llamas J, et al. Acute renal failure induced by carbon tetrachloride in rats with hepatic cirrhosis. *Ann Hepatol* 2008; 7(4): 331-338.

47. de Haan J. B., *et al*, “Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy”, *Am J Physiol Renal Physiol*, Vol. 289, No. 1, 2005, 544–551.
48. Kachuchuru Lutale J. J, Thordarson H, Zulfiqarali Gulam Abbas³ and Kåre Vetvik¹, “Microalbuminuria among Type 1 and Type 2 diabetic patients of African origin in Dar Es Salaam, Tanzania”, *BMC Nephrology*, Vol 8, No. 2, 2007.
49. Kalender S., Kalender Y., Durak D, Ogutcu A., Uzunhisarcikli M., Sitki Cevrimli B. y Yildirim M., “Methyl parathion induced nephrotoxicity in male rats and protective role of vitamins C and E”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Vol. 88, 2007.
50. Lerman A., Edwards B. S., Hallett J. W., Heublein D. M., Sandberg S. M., and Burnett J. C., “Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis”, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 325, No 14, 1991, 997-1001.
51. Liu P., Song X., Yuan W., Wen W., Wu X., Li J. and Chen X., “Effects of cypermethrin and methyl parathion mixtures on hormone levels and immune functions in Wistar rats”, *Arch Toxicol.*, Vol., 80, No 7, 449-57, 2007.
52. Liu P., Song XX., Wen WH., Yuan WH. and Chen XM., “Effects of mixed cypermethrin and methylparathion on endocrine hormone levels and immune functions in rats: II. Interaction”, *Wei Sheng Yan Jiu.*, Vol. 35, No 5, 531-3, 2006.
53. Lowry O. H, *et al*, “Protein measurement With the Folin phenol reagent”, *Journal of Biol. Chem*, Vol. 193, 1951).
54. Lukaszewicz-Hussain A., Moniuszko-Jakoniuk J. y Pawłowska D., “Blood glucose and insulin concentration in rats subjected to physical exercise in acute poisoning with parathion-methyl”, *Pol J Pharmacol Pharm.*, Vol. 37, No 5, 647-51, 1985.
55. Mack R. 1983. Toxic encounters of the dangerous kind. *North Carolina Medical Journal*, 44: 103-105.
56. Marieb E. N., “Anatomy and Physiology”, Ed. Perason , 2a edición, 2005.
57. Medina R. A. and Owen G. I. “Glucose transporters: expression, regulation and cancer”, *Biol. Res.* [online], Vol.35, No.1, 2002.
58. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol 2000*; 153: 83-104.
59. Michio Asahi *et al*, “Inactivation of Glutathione Peroxidase by Nitric Oxide”, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, No. 36, 1995, 21035–21039.
60. Ministerio de trabajo y asuntos sociales, NTP 143: Pesticidas: clasificación y riesgos principales, Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo.
61. Mueckler M., “Facilitative glucose transporters”, *Eur. J. Biochem.*, Vol. 219, No. 1, 1994, 713-725.
62. Mueckler M. *et al*, “Sequence and structure of a human glucose transporter”, *Science*, Vol. 229. no. 4717, 1985, 941-945.
63. Murer H, Werner A, Reshkin S, Wuarin F, Biber J. Cellular mechanisms in proximal tubular reabsorption of inorganic phosphate. *Am J Physiol* 1991; 260: C855-899.
64. Murer H, Biber J. Control of proximal tubular apical Na/Pi cotransport. *Exp Nephrol* 1996; 4(4): 201-204.
65. Narayana K, *et al*, “An organophosphate insecticida methyl paratión induces cytotoxic damage and tubular atrophy in testis despite elevated testosterone level in the rat”, *The Journal of Toxicological Sciences*, Vol. 31, No. 3, 2006.
66. Navarro Despaigne D., “Factores relacionados con la glucosuria como método de control para la diabetes mellitus”, *Rev Cubana Med Gen Integr* v.11 n.2, 1995.
67. Nunes F. D., *et al*, “Distinct subdomain organization and molecular composition of a tight junction with adherens junction features”, *Journal of Cell Science*, Vol. 119, 2006.
68. Ortega-Ceseña, J., Espinosa-Torres F. y López-Carrillo L., El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: retos ante el tratado de libre comercio, *Salud Publica de México*, Vol. 36, No. 6, Diciembre de 1994.
69. Özkurt Zübeyde Nur y Col, “Frequency of microalbuminuria and its relationship with othervatherosclerotic risk factors in nondiabetic hypertensive patients” *Anadolu Kardiyol Derg*, Vol 7, 2007.

70. Palacios-Nava, M.,E., Paz-Román, P., Hernández-Robles, S. y Mendoza-Alvarado, L., Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados, *Salud pública de México*, Vol.41, No.1, Febrero de 1999.
71. Pascual J. M. *et al*, “GLUT1 deficiency and other glucose transporter diseases”, *European Journal of Endocrinology*, Vol. 150, No. 1, 2004, 627–633.
72. Pedzik A, Paradowski M, Rysz J. Oxidative stress in nephrology. *Pol. Merkur Lekarski* 2010; 28(163): 56-60.
73. Piña-Guzman B., Solís-Heredia M. J., Rojas-García A. E., Urióstegui-Acosta M. y Quintanilla-Vega B., Genetic damage caused by methyl-parathion in Mouse spermatozoa is related to oxidative stress, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 216, 2006.
74. Poovala VS, Huang H, Salahudeen AK: Role of reactive oxygen metabolites in organophosphate-bidrin-induced renal tubular cytotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(8): 1746-1752.
75. Poulou A. C., Goumas K. E., Dandakis D. C., Tyrmpas I., Panagiotaki M., Georgouli A., Soutos D. C., Archimandritis A., “Microproteinuria in patients with inflammatory bowel disease: Is it associated with the disease activity or the treatment with 5-aminosalicylic acid”, *World J Gastroenterol*, Vol 12, No. 5, 2006.
76. Pournourmohammadi S, Ostad SN, Azizi E. Induction of insulin resistance by malathion: Evidence for disrupted islets cells metabolism and mitochondrial dysfunction. *Pesticide Biochem Physiol* 2007; 88: 346-352.
77. Prophet E.B, Mills B., Arrington J.B., Sobin L.H., “Laboratory Methods in Histotechnology”, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 1994.
78. Prozialeck W. C. and Edwards J. R., “Cell Adhesion Molecules in Chemically-Induced Renal Injury”, *Pharmacol Ther.*, Vol. 114, No 1, 2007, 74–93.
79. Qing Li, New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity, *Journal Nippon Med*, Vol 74, No. 1, 2007.
80. Radjendirane V, Joseph P, Jaiswal AK, Cadenas E, Forman HJ. Oxidative stress and signal transduction. 1th ed. NY:Chapman and Hall, 1997, pp 441-469.
81. Ranjbar A, Pasalar P, Abdollahi M. Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21: 179-182.
82. Reyes J.L., Lamas M, Martin D, del Carmen NM, Islas S, Luna J, et al. The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int* 2002;62:476–487.
83. Rose BD, Rennke HG. *Renal Pathophysiology*. 1th ed. Williams & Wilkins, 1994, pp 235-253.
84. Ross M. H. y Pawlina W., “Histología, Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular”, Panamericana, 5ª ed. 2006.
85. Rubin C., Esteban E., Hill Jr. R. H., and Pearce K., “Introduction—The Methyl Parathion Story: A Chronicle of Misuse and Preventable Human Exposure”, *Environmental Health Perspectives*, Vol 110, No. 6, 2002.
86. Rushmore TH, Pickett CB. Glutathione S-transferases, structure, regulation and therapeutic implications. *J Biol Chem* 1993; 268: 11475-11478.
87. Salazar-Montes A., Delgado-Rizo V. y Armendáriz-Boruda Juan, “Differential gene expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute and chronic liver injury”, *Hepatology Research*, Elsevier, Vol. 16 No 1, 2000.
88. Salim S, Deniz S, Ozgul T, Zikret K, Mehmet K. 2004. Ultrastructural changes in rat liver treated with pralidoxime following acute organophosphate poisoning. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, 71(6): 405-410.
89. Sigma Aldrich, “Technical Bulletin of Glutathione Peroxidase Cellular Activity assay Kit”, Saint Louis, Missouri USA, 2008.
90. Soltaninejad K, Abdollahi M. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: A systematic review. *Med Sci Monit* 2009; 15(3): 75-90.
91. Soranno T. M. y Sultatos L. G., Biotransformation of the insecticide parathion by mouse brain, Elsevier Scientific Publishers, *Toxicology Letters*, Vol. 60, 1992.
92. Sumner J.B., “A method for the colorimetric determination of phosphorus”, *Science*, 100, 413-414, 1944.
93. Smallwood W. L. y Green E. R., “Biología”, 11 ed., Publicaciones Cultural, México, 1981.

94. Srivastava A. K., Singh N. N. 1981. Effects of acute exposure to methyl parathion on carbohydrate metabolism. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 48(1): 26-31.
95. Tafuri J., Roberts J. 1987. Organophosphate poisoning. *Annals of Emergency Medicine*, 16:193-202.
96. Tate SS, Meister A. Gamma-glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1981; 39: 357-368.
97. Tocci PM, Mann JB, Davies JE, Edmunson WF. Biochemical differences found in persons chronically exposed to high levels of pesticides. *Ind Med Surg* 1969; 38(6): 188-195.
98. Undeger U., Institoris L., Siroki O., Nehéz M., Dési I, “Simultaneous geno- and immunotoxicological investigations for early detection of organophosphate toxicity in rats”, *Ecotoxicol Environ Saf.* Vol. 45, No 1, 43-8, 2000.
99. Userpater M e Inserra F., “Pérdida de proteínas urinarias como marcador de daño renal no glomerular y de riesgo cardiovascular”, *Rev. Nefrol. Diál. y Transp.*, Vol 24, No. 2, pag. 81-86, 2004.
100. Valenzuela L., A.; Lagomarsino F., E.; Cavagnaro SM., F y Solar G., E., “Insuficiencia renal crónica en la infancia. Encuesta nacional”, *Rev. Chil. Pediatr.*, Vol 67, No 3, 1996.
101. Valthor Asgrimsson, et al, “Novel Effects of Azithromycin on Tight Junction Proteins in Human Airway Epithelia”, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Vol. 50, No. 5, 2006.
102. Veltri J., Litovitz T. 1984. Annual Report of The American Association of Poison Control Centers National Data Collecting System. *American Journal of Emergency Medicine*, 2: 420-443.
103. Wayne L. Miller, Margaret M. Redfield, and Burnett J.C., “Integrated Cardiac, Renal, and Endocrine Actions of Endothelin”, *J. Clin. Invest.*, Volume 83, No 1, 1989, 317-320.
104. WHO: Environmental Health Criteria, 1993; 145, pp 13, 244.
105. Wirth T., “Glutathione Peroxidase-like Activities of Oxygen-Containing Diselenides”, *Molecules*, Vol. 3, No 1, 1998, 164-166.
106. Wiener Lab.; Rosario, Argentina; 2000.
107. Wing Y. Li, Catherine L. Huey, and Alan S. L. Yu, “Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron”, *Am J Physiol Renal Physiol*, Vol. 286, 2004.
108. Walter C. Prozialeck and Joshua R. Edwards, “Cell Adhesion Molecules in Chemically-Induced Renal Injury”, *Pharmacol Ther*, Vol 114, No. 1, 2007.
109. Yélamos F., Díez F., Martín C., Blanco J. L., García M. J., Lardelli A. y Peña J.F , Intoxicaciones agudas por insecticidas organofosforados en la provincia de Almería, Estudio de 187 casos, *Med Clin (Barc)*, 98: 681-684, 1992.
110. Zhimei Hao y col, “The Association between microalbuminuria and Metabolic Syndrome in the General Population in Japan: The Takahata Study”, DOI: 10.2169/internalmedicine.46.6056.