



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA**

TESIS

**“RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CIPERMETRINA Y
SUS EFECTOS EN TEJIDO PULMONAR EN UN MODELO DE RATA
WISTAR”**

PRESENTA

M. en C. CRISTINA GONZÁLEZ RAMÍREZ

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES

Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña

Dra. Elsa Marcela Ramírez López

ASESOR

Dra. María Lourdes Aldana Madrid

Aguascalientes, Ags., marzo de 2024.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como COTUTORA designado del estudiante CRISTINA GONZÁLEZ RAMÍREZ con ID 90055 quien realizó la tesis titulada: **RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CIPERMETRINA Y SUS EFECTOS EN TEJIDO PULMONAR EN UN MODELO DE RATA WISTAR**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 27 de Enero de 2020

DRA. EN C. MA. CONSOLACIÓN MARTÍNEZ SÁLDAÑA
Cotutora de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como COTUTORA designado del estudiante CRISTINA GONZÁLEZ RAMÍREZ con ID 90055 quien realizó la tesis titulada: **RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CIPERMETRINA Y SUS EFECTOS EN TEJIDO PULMONAR EN UN MODELO DE RATA WISTAR**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 27 de Enero de 2020

Elsa Marcela Ramírez López
DRA. EN C. ELSA MARCELA RAMÍREZ LÓPEZ
Cotutora de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M.C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como ASESORA designada de la estudiante CRISTINA GONZÁLEZ RAMÍREZ con ID 90055 quien realizó la tesis titulada: **RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CIPERMETRINA Y SUS EFECTOS EN TEJIDO PULMONAR EN UN MODELO DE RATA WISTAR**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por él momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 27 de Enero de 2020


DRA. MARÍA LOURDES ALDANA MADRID
Asesora de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

M.C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
PRESENTE

Por medio del presente como Miembros del Comité Tutorial designado de la estudiante CRISTINA GONZÁLEZ RAMÍREZ con ID 90055 quien realizó la tesis titulada: RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CIPERMETRINA Y SUS EFECTOS EN TEJIDO PULMONAR EN UN MODELO DE RATA WISTAR, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 27 de Enero de 2020


Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña
Cotutora de tesis


Dra. Elsa Marcela Ramírez López
Cotutora de tesis


Dra. María Lourdes Aldana Madrid
Asesora de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 23-feb-24

NOMBRE: CRISTINA GONZÁLEZ RAMÍREZ LGAC (del ID 90055

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MODALIDAD TRADICIONAL (del posgrado): BIOINGENIERÍA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTALE

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico

"RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE CIPERMETRINA Y SUS EFECTOS EN TEJIDO PULMONAR EN UN MODELO DE RATA WISTAR"

TITULO:

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

El estudio contribuye a entender el efecto de la cipermetrina en la salud humana y animal

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
NO Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
SI El estudiante es el primer autor
SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Si SI
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Dra. ALMA LILIÁN GUERRERO BARRERA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIÁN GUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. ALEJANDRO PADILLA DÍAZ

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFEREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

LA EGRESADA NO CUMPLE CON LOS REQUISITOS PARA OBTENER SUMMA CUM LAUDE CON ACUERDO AL PROGRAMA DE ESTUDIOS VIGENTE

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEE-FO-15
Actualización: 01
Emisión: 20/06/19



CYPERMETHRIN CAUSE ALLERGIC INFLAMMATORY RESPONSE IN RAT LUNG

González-Ramírez Cristina¹, Ramírez-López Elsa Marcela², Aldana-Madrid María Lourdes³, Ventura-Juárez Javier¹, Muñoz-Ortega Martín Humberto⁴, Vásquez Mellado-Cerrillo Carolina¹, Martínez-Saldaña Ma. Consolación*¹

^{1,2,4}Departamento de Morfología¹, Departamento de Ingeniería Bioquímica², Departamento de Química⁴, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, CP 20131, Aguascalientes, Ags., México.

³Departamento de Investigación y posgrado en alimentos, Universidad de Sonora, Boulevard Luis Encinas J, Avenida Rosales &, Centro CP 83000, Hermosillo Sonora, México.

Article Received: 28 October 2023 | Article Revised: 18 November 2023 | Article Accepted: 08 December 2023

Corresponding Author: Martínez-Saldaña Ma. Consolación
Departamento de Morfología, Universidad, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, CP 20131, Aguascalientes, Ags., México. **Email ID:** consolacion.martinez@edu.uaa.mx, **DOI:** <https://doi.org/10.5281/zenodo.10421575>

ABSTRACT

Cypermethrin is a type 2 photosensitive liposoluble pyrethroid for agricultural and domestic use, has a half-life in the ambient air for days, its metabolism in human liver generate a cyan group (CN), an alcohol fraction (dimethylcyclopropanecarboxylic acid) (DCCA), and 3-acid phenoxybenzoic acid (3-PBA) with reactive oxygen species (ROS) properties, there are scarce studies when is inhaled. The objective of this work was to evaluate the structural changes and activation of allergic inflammatory response in lower airway components and alveoli induced by inhaled exposure to low doses of cypermethrin. Rats were exposed during 7, 14 and 21 days by inhalation, then were analyzed the serum levels of IgE by ELISA, performed H&E stain on lung tissue for analyze the structural changes, through immunofluorescence were detected positive cellsto IL-4, IL-5 and IL-13, finally by qPCR was quantified mRNA for IL-4, our results shows that cypermethrin induce a local and systemic allergic inflammatory reaction in rats, specifically in lungs, induce the production and secretion of products of Th2 cells (IL-4, IL-5, IL-13), eosinophils and, high serum levels of IgE, demonstrating like this, the cytotoxic effect of cypermethrin at 7 and 14 days exposition.

KEYWORDS: Cypermethrin, inhaled toxicity, inflammatory reaction, IL-4, IL-5, IL-13, IgE.

INTRODUCTION

Cypermethrin is a type 2 photosensitive liposoluble pyrethroid for agricultural and domestic use, has a half-life in the ambient air for days (Côté et al. 2014; Amweg, Weston, and Ureda 2005), is widely used in Mexico for control of domestic and field pests (González-Arias et al. 2010). Due to its fat-solubility, it is easily absorbed dermally, gastrointestinal and inhaled. Respiratory exposure requires that the particle size of the respirable fraction be 0.5 to 5 µm, to reach the lowerairway and alveoli (Fernández Tena and Casan Clarà 2012). After systemic absorption, cypermethrin is hydrolyzed in the liver by human carboxylesterase 1 (hCE-1), generating a cyan group (CN), an alcohol fraction

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías** por apoyar a los estudiantes mexicanos con deseo de superación académica, en lo particular por otorgarme la beca para completar mis estudios de Doctorado.

A la **Universidad Autónoma de Aguascalientes** por brindar los medios de infraestructura y de recursos humanos y económicos en forma de subsidio de colegiatura, uso de laboratorios, reactivos y asesoría de maestros y tutores del más alto nivel.

Al Instituto de Salud y Servicios del Estado de Aguascalientes, a través del **Departamento de Estudios Ambientales del Laboratorio Estatal de Salud Pública** por la orientación brindada, el apoyo de su personal con alto sentido humano en especial la Dra. Elvia Cristina Mendoza y el uso de equipo para obtención de resultados imprescindibles para este trabajo.

A mis tutoras, la **Doctora Consolación** por su acompañamiento y cariño ininterrumpidos durante el desarrollo de este trabajo, por ser un ejemplo integral de ser humano y para mí un modelo a seguir; no me alcanzan las palabras para agradecerle tanto. A la **Doctora Elsa Marcela**, por su gran apertura y tolerancia, por compartir sus conocimientos, su tiempo y espacio incondicionalmente y por todos los consejos académicos, profesionales y personales que me llevo para siempre en el corazón. A mi Asesora, la **Doctora Lourdes Aldana**, cuyas aportaciones siempre fueron parteaguas en cada etapa del desarrollo de este trabajo y cuyo apoyo y calidez trascienden la distancia.

Al **Doctor Javier Ventura Juárez**, mi Sinodal, mi Maestro y amigo en toda la extensión de la palabra. Por creer en mí, y por todas las horas invertidas para mi formación, por compartirme toda su experiencia en el área de Morfología, Inmunología e Investigación y por motivarme en los momentos más oscuros, gracias por ser luz.

A la **LAQB Sonia Sofía Cruz Muñoz**, excelente ser humano, por su apoyo en todo el trabajo técnico del Laboratorio y más allá de eso, por su amistad incondicional que perdura a pesar de concluir esta etapa. A todos los técnicos de los Laboratorios de la UAA, que en algún momento apoyaron mi formación y cuyas manos están tatuadas en las páginas de este trabajo. A Maggie, Lupita y todo el personal administrativo de la UAA involucrado.

A mis compañeros y amigos de por vida **Verónica, Leobardo y Maximiliano**, por hacer gratas las eternas horas de trabajo. A mi hermana **Estefani** por ser amor y apoyo incondicional siempre. A mi papá. A mi abuelita Josefina que ya no está.

A mi esposo **Pepe** por darme todo lo que es, apoyarme en cada idea y reto que me propongo, por ser el mejor padre que existe en este mundo, ser mi compañero y cómplice, nunca podré agradecerte lo suficiente.

A mi pequeña hija **Efi**, que me acompañó en este proyecto desde bebida, por todas las horas que no estuve presente por seguir mi desarrollo personal y profesional. Sé que ese tiempo no lo puedo recuperar, pero espero que estés orgullosa de mami.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



Para Pepe y Efi ...

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Índice General

Contenido	Página
Índice General	1
Índice de Tablas	4
Índice de Figuras	5
Acrónimos	8
Resumen	9
Palabras clave	10
<i>Abstract</i>	11
<i>Key words</i>	12
Introducción	13
Marco Teórico	16
1. Cipermetrina	16
1.1 Identidad	16
1.2 Características fisicoquímicas	16
1.3 Uso	17
1.4 Mecanismos de toxicidad	18
1.5 Clasificación toxicológica	18
1.6 Toxicocinética de la Cipermetrina	19
1.6.1 Absorción	19
1.6.2 Distribución	19
1.6.3 Metabolismo	19
1.6.3.1 Fase I Funcionalización	20
1.6.3.2 Fase II Conjugación	20
1.6.4 Eliminación	21
1.7 Efectos adversos de la cipermetrina	21
1.7.1 Toxicidad en sistema inmune	21
1.7.2 Toxicidad en sistema nervioso	21
1.7.3 Disrupción endócrina	22
2. Intoxicación inhalada	22
	22

2.1 Tipos de estudio de acuerdo con el tiempo de intoxicación inhalada	23
2.2 Modelos de administración para intoxicación vía inhalada	23
2.2.1 Cámara de cuerpo entero	23
2.2.2 Exposición sólo cabeza	24
2.2.3 Exposición sólo nariz	24
2.2.4 Intubación endotraqueal, traqueotomía y catéteres	24
3. Morfología del aparato respiratorio	25
3.1 Tracto respiratorio superior	26
3.2. Tráquea	26
3.3 Bronquios	27
3.4 Bronquiolos	27
3.5 Alveolos	28
3.6 Mucosa y epitelio respiratorio	29
3.6.1 Células basales	29
3.6.2 Células ciliadas	30
3.6.3 Células caliciformes	30
3.6.4 Mastocitos	30
3.6.5 Células de Clara	31
4. Respuesta inflamatoria en alergia	31
4.1 Reacciones de fase temprana.	32
4.2 Reacciones de fase tardía.	32
4.3 Inflamación crónica alérgica.	32
5. Citocinas como mediadoras de la inflamación	33
5.1 Transducción de señales	33
5.2 Redes de citocinas	33
5.3 Respuesta TH2	
Justificación	35
Objetivo general	36
Objetivos particulares	36
Hipótesis	36
Metodología	37
1. Modelo de exposición	37

2. Dosis experimental	37
3. Grupos experimentales	37
4. Evaluación clínica de hipersensibilidad	38
5. Inmunolocalización de IL-4, IL-5, IL-13	38
6. Evaluación histopatológica	39
7. Cuantificación de IgE	39
8. Extracción y determinación de concentración de cipermetrina en tejido	40
8.1 Cromatógrafo de gases	40
8.2 Curva matriz	40
8.3 Lavado de material	41
8.4 Molienda de muestras	41
8.5 Fase de extracción	41
8.6 Fase de dispersión	41
9. Análisis estadístico	42
Resultados	43
1. Evaluación clínica de hipersensibilidad	43
2. Estudio de inmunolocalización IL-4, IL-5 e IL-13.	43
2.1 Interleucina - 4	44
2.2 Interleucina - 5 e Interleucina - 13	47
3. Observaciones Histopatológicas y Morfometría	50
a. Alteraciones histopatológicas en bronquiolo y alveolo	50
b. Cuantificación de eosinófilos en tejido pulmonar	56
4. IgE	59
5. Extracción y determinación de concentración de cipermetrina en tejido por cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS)	60
Discusión	61
Conclusiones	66
Referencias	67

Índice de Tablas

Contenido	Página
Tabla 1. Curva matriz para la determinación de la concentración de cipermetrina por cromatografía de gases	40



Índice de Figuras

Contenido	Página
Figura 1. Estructura química de la cipermetrina	17
Figura 2. Cámara de cuerpo entero con administración de agente vía nebulización	23
Figura 3. Estructuras y división funcional de la vía aérea	25
Figura 4. Anatomía de la vía respiratoria	28
Figura 5. Epitelio de la vía respiratoria por estructura	31
Figura 6. Cámara de exposición inhalada tipo cuerpo completo usada en este estudio	37
Figura 7. Signos clínicos de hipersensibilidad en animales expuestos	43
Figura 8. Microscopia confocal de contraste de fases e inmunolocalización por fluorescencia de IL-4 (Alexa Flúor 488). Grupo control	44
Figura 9. Microscopia confocal de contraste de fases e inmunolocalización por fluorescencia de IL-4 (Alexa Flúor 488). Grupo expuesto a cipermetrina vía inhalada por 7 días	45
Figura 10. Microscopia confocal de contraste de fases e inmunolocalización por fluorescencia de IL-4 (Alexa Flúor 488). Grupo expuesto a cipermetrina vía inhalada por 14 días	45
Figura 11. Microscopia confocal de contraste de fases e inmunolocalización por fluorescencia de IL-4 (Alexa Flúor 488). Grupo expuesto a cipermetrina vía inhalada por 21 días	46
Figura 12. Microscopia confocal de contraste de fases e inmunolocalización por fluorescencia de IL-4 (Alexa Flúor 488). ANOVA de un solo factor para intensidad de fluorescencia ($p < 0.001$)	46
Figura 13. Microscopia confocal de contraste de fases y colocalización de inmunofluorescencia de IL-5 (Alexa Flúor 488) e IL 13 (Alexa Flúor 594). Grupo control	47
Figura 14. Microscopia confocal de contraste de fases y colocalización de inmunofluorescencia de IL-5 (Alexa Flúor 488) e IL 13 (Alexa Flúor 594). Grupo expuesto a cipermetrina vía inhalada por 7 días	48

Figura 15. Microscopia confocal de contraste de fases y colocación de inmunofluorescencia de IL-5 (Alexa Flúor 488) e IL 13 (Alexa Flúor 594). Grupo expuesto a cipermetrina vía inhalada por 14 días	48
Figura 16. Microscopia confocal de contraste de fases y colocación de inmunofluorescencia de IL-5 (Alexa Flúor 488) e IL 13 (Alexa Flúor 594). Grupo expuesto a cipermetrina vía inhalada por 21 días	49
Figura 17. Microscopia confocal de contraste de fases y colocación de inmunofluorescencia de IL-5 (Alexa Flúor 488) e IL 13 (Alexa Flúor 594). ANOVA de un solo factor para intensidad de fluorescencia de IL-5 ($p < 0.001$)	49
Figura 18. Microscopia confocal de contraste de fases y colocación de inmunofluorescencia de IL-5 (Alexa Flúor 488) e IL 13 (Alexa Flúor 594). ANOVA de un solo factor para intensidad de fluorescencia de IL-13 ($p < 0.001$)	50
Figura 19. Microscopia óptica de parénquima pulmonar de rata Wistar. Flecha: Espesor del epitelio bronquiolar. Grupo control. Tinción H&E, 400 aumentos totales	51
Figura 20. Microscopia óptica de parénquima pulmonar de rata Wistar expuesta a cipermetrina vía inhalada. Grupo 7 días de exposición. Tinción H&E, 400 aumentos totales	51
Figura 21. Microscopia óptica de parénquima pulmonar de rata Wistar expuesta a cipermetrina vía inhalada. Grupo 14 días de exposición. Tinción H&E, 400 aumentos totales	52
Figura 22. Microscopia óptica de parénquima pulmonar de rata Wistar expuesta a cipermetrina vía inhalada. Grupo 21 días de exposición. Tinción H&E, 400 aumentos totales	52
Figura 23. ANOVA de un solo factor para medición del espesor del epitelio bronquial en μm ($p < 0.0001$)	53
Figura 24. Microscopia óptica de parénquima pulmonar de rata Wistar. A Grupo control. B Grupo 7 días de exposición a cipermetrina vía inhalada. C Grupo 14 días de exposición a cipermetrina vía inhalada. D Grupo 21 días de exposición a cipermetrina vía inhalada. Tinción H&E, 400 aumentos totales. E ANOVA de un solo factor para	54

cuantificación de interrupciones del epitelio bronquiolar por campo ($p < 0.0001$)	
Figura 25. Microscopia óptica de parénquima pulmonar de rata Wistar. A Grupo control. B Grupo 7 días de exposición a cipermetrina vía inhalada. C Grupo 14 días de exposición a cipermetrina vía inhalada. D Grupo 21 días de exposición a cipermetrina vía inhalada. Tinción H&E, 400 aumentos totales. E ANOVA de un solo factor para cuantificación de medición del espesor del epitelio alveolar ($p < 0.0001$).	55
Figura 26. Microscopia óptica de pulmón de rata Wistar. Tinción Eritrosina B (Benitez, 1987). Grupo control.	56
Figura 27. Microscopia óptica de pulmón de rata Wistar. Tinción Eritrosina B (Benitez, 1987). Grupo 7 días de exposición.	57
Figura 28. Microscopia óptica de pulmón de rata Wistar. Tinción Eritrosina B (Benitez, 1987). Grupo 14 días de exposición.	57
Figura 29. Microscopia óptica de pulmón de rata Wistar. Tinción Eritrosina B (Benitez, 1987). Grupo 21 días de exposición.	58
Figura 30. Prueba de Kruskal-Wallis para cuantificación de eosinófilos por campo ($p < 0.0001$).	58
Figura 31. Concentración de IgE en suero por ELISA. Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)	59
Figura 32. Concentración de cipermetrina en tejido pulmonar a los 0, 7, 14 y 21 días de exposición inhalada aumentando la concentración en tejido pulmonar ($p < 0.001$).	60

Acrónimos

ADN Ácido desoxirribonucleico
 CAS Compendios Químicos
 CFR Código Federal de Regulaciones
 CICOPLAFEST Comisión Intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas
 CIPAC Consejo Analítico Colaborativo Internacional de Plaguicidas
 DAMM Diámetro aerodinámico medio de la masa
 DL₅₀ Dosis letal 50
 EINECS Lista Europea de Sustancias Químicas Notificadas
 EPA Agencia de Protección Ambiental
 GABA Ácido gamma aminobutírico
 GC/MS Cromatografía de gases acoplada a masas
 GHS Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación
 IgA Inmunoglobulina A
 IgE Inmunoglobulina E
 IgG Inmunoglobulina G
 IL Interleucina
 INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía
 IRAC Comité de Acción de Resistencia a Insecticidas
 ISSEA Instituto de Servicios de Salud del Estado de Aguascalientes ISSEA
 IUPAC Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
 NLM Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos
 NOM Norma Oficial Mexicana NOM
 OMS Organización Mundial de la Salud
 OSHA Administración de Seguridad y Salud Ocupacional
 SEMARNAT Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
 TH2 Linfocitos T cooperadores tipo 2
 TOXNET Red de Datos en Toxicología
 UKPID Centro de Servicio Nacional de Información sobre Venenos en el Reino Unido
 URF Unidades de fluorescencia

RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CIPERMETRINA Y SUS EFECTOS EN TEJIDO PULMONAR EN UN MODELO DE RATA WISTAR

Resumen

Introducción. La cipermetrina es un piretroide considerado de baja toxicidad en mamíferos. Se distribuye en México sin restricciones. Se han reportado efectos citotóxicos en órganos y sistemas; existen pocos estudios de sus efectos en pulmón por exposición inhalada.

Objetivo. Determinar la concentración de cipermetrina y sus efectos en tejido pulmonar en un modelo de exposición crónica inhalada en rata Wistar.

Metodología. Estudio experimental en rata Wistar modelo de intoxicación vía inhalada tipo cuerpo completo en 7, 14 y 21 días. Se determinaron: hipersensibilidad clínica por escala Li; inmunolocalización de IL-4, IL-5, IL-13 por microscopia confocal; cambios histopatológicos por microscopia óptica; IgE por ELISA; y concentración de cipermetrina por cromatografía de gases (QuEChERS®). Análisis estadístico se realizó ANOVA de un solo factor.

Resultados. En animales expuestos se presentaron: signos clínicos de hipersensibilidad, cambio en la intensidad de fluorescencia de IL-4 en función al tiempo de exposición ($p < 0.0001$), variaciones en intensidad de fluorescencia de IL-5 e IL-13 ($p < 0.0001$), incremento del espesor del epitelio ($p < 0.0001$), aumento en la cuantificación de eosinófilos ($p < 0.0001$) e incremento en la concentración sérica de IgE ($p < 0.05$). En la cromatografía de gases, no se detectó cipermetrina en muestras de suero, pero sí en pulmón ($p < 0.0001$).

Discusión. En los grupos expuestos a cipermetrina, encontramos un patrón de células en tejido pulmonar que producen y secretan las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 y regulan la producción sistémica de IgE de respuesta inflamatoria tipo alergia que coincide con detección de cipermetrina en tejido pulmonar.

Conclusión. La exposición inhalada a cipermetrina produce daño inflamatorio y expresión de marcadores de respuesta inflamatoria tipo alergia en tejido pulmonar.

Palabras clave

Cipermetrina, inflamación respiratoria, intoxicación vía inhalada, IL-4, IL-5, IL-13, IgE.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CYPERMETHRIN CONCENTRATION AND EFFECTS ON LUNG TISSUE IN WISTAR RAT MODEL

Abstract

Introduction. Cypermethrin is a pesticide considered of low toxicity for mammals. It is distributed without restrictions in Mexico. Cytotoxic effects in organs and systems have been reported. There are few studies on cypermethrin effects in lung related to inhaled exposition.

Objective. Evaluate cypermethrin concentration and structural changes in lung tissue induced by inhaled exposure to low doses of cypermethrin in Wistar rat.

Methods. Experimental study performed in Wistar rat, in a whole body inhaled intoxication model at 7, 14 and 21 days. We evaluated: clinical hypersensitivity over Li scale; IL-4, IL-5 and IL-13 immunolocalization with confocal microscopy; histological examination with optical microscopy; IgE cuantification with ELISA; and concentration of Cypermethrin in lung tissue and serum with gas chromatography (QuEChERS®). Statistical analysis was one way ANOVA.

Results. Hypersensitivity symptoms, IL-4 fluorescence intensity changes ($p < 0.0001$) IL-5 and IL-13 fluorescence intensity variations ($p < 0.0001$), changes in bronchiolar epithelium diameter ($p < 0.0001$), eosinophils cuantification changes ($p < 0.0001$), rise in Serum IgE concentration ($p < 0.05$). Gas cromatography did not report detection of Cypermethrin in serum samples and reported detection in lung tissue simples ($p < 0.0001$).

Discussion. Within the groups exposed to inhaled Cypermethrin, we observed cells that produce and secrete IL-4, IL-5 and IL-13 in lung tissue, resulting in the production of a systemic allergy-like inflammatory response, that overlaps with the detection of Cypermethrin in lung tissue.

Conclusion. The inhaled exposure to Cypermethrin produce inflammatory damage and expression of inflammatory biomarkers linked to allergy in lung tissue.

Key words

Cypermethrin, respiratory inflammation, inhaled exposition, IL-4, IL-5, IL-13, IgE.



Introducción

El avance industrial va acompañado de varios productos químicos sintéticos que pueden disolverse y contaminar. La contaminación ambiental es un fenómeno multifacético y complejo de origen parcialmente conocido o desconocido. En las últimas décadas, la contaminación ambiental se ha convertido en un problema central en todo el mundo, lo que la convierte en una preocupación fundamental para los eco toxicólogos, biólogos ambientales, eco químicos, patólogos e investigadores de otros campos. Debido a la rápida expansión industrial y al continuo crecimiento de la población humana, las consecuencias de la contaminación ambiental son peores que antes (Ullah et al., 2018).

Uno de los principales problemas en la producción intensiva de productos agrícolas para satisfacer necesidades alimentarias, es el control de plagas y enfermedades de los cultivos. En las actividades agrícolas se utilizan químicos con el objetivo de incrementar la producción. Otra actividad cotidiana la que se observa consumo de químicos es el control de plagas domésticas de fauna nociva: insectos rastreros, mosquitos y roedores, entre otros. Lo anterior, genera residuos en las tierras de cultivo, suelo urbano y suelo residencial, representando la vía por la que los humanos pueden recibir exposición a estos químicos que conlleva implicaciones para la salud por la exposición laboral, doméstica y a través de los alimentos contaminados (Côte et al., 2014; Zhou, et al., 2018).

Los seres humanos y los animales terrestres están continuamente expuestos a diferentes tipos de plaguicidas a través de numerosas formas, como la exposición ocupacional, la exposición residencial y el consumo de agua y alimentos contaminados por plaguicidas. Los plaguicidas, que son sustancias o mezclas destinadas a controlar una plaga, incluyendo: los vectores de enfermedades humanas y de animales, especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, las plagas que causan daño durante el almacenamiento o transporte de los alimentos u otros bienes materiales, y las plagas que interfieran con el bienestar del hombre y de los animales (Ullah et al., 2018).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), por cada 100.000 casos de intoxicación, hay 18.2 intoxicaciones agudas por plaguicidas en trabajadores agrícolas por año, y probablemente los casos subagudos son peores. Aunado a esto, existen dificultades para documentar estos datos, y no se conocen todos los efectos de los plaguicidas (Cunha et al., 2020).

Los plaguicidas se pueden clasificar de acuerdo con varios criterios: concentración, familia química, modo de acción, composición química, organismos que controla, persistencia y uso al que se destina. Dentro de la clasificación por familia química encontramos los piretroides que son plaguicidas de amplio uso agrícola y doméstico en nuestro país (Pérez-Olvera et al., 2012).

Actualmente, entre los piretroides más utilizados está la cipermetrina. Se han reportado efectos citotóxicos a nivel de los sistemas: nervioso, inmune, endócrino, musculoesquelético, reproductor y en órganos como hígado y riñón (Huang et al., 2016). Adicionalmente, se han reportado efectos irritantes en vías respiratorias y piel (Veerappan et al., 2010; Aman, et al., 2018).

La exposición a la cipermetrina puede ser aguda o crónica. Las principales vías de exposición son dérmica, oral e inhalatoria, siendo las dos primeras las más documentadas en cuanto a efectos adversos en la salud de población y animales de experimentación. Existen pocos estudios sobre los efectos adversos a la salud provocados por la vía de exposición a la cipermetrina más frecuente en la población que es la inhalatoria a dosis recomendadas por las empresas que distribuyen las presentaciones de uso doméstico (Singleton et al., 2014).

No existe información precisa sobre la cantidad de plaguicidas que se utiliza actualmente en México (Pérez-Olvera, 2011). Sin embargo, se pueden obtener datos indirectos de bases de datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) sobre La Industria Química en México donde se reporta que el valor de la producción en la industria química por clase de actividad. Para mezcla de insecticidas y plaguicidas fue de 6 217 879 miles de pesos en el 2008 en comparación con 4 156 654 en 2003; el valor total de las ventas en la industria química por clase de actividad en 2008 fue de 5 789 519 miles de pesos para

mezclas de insecticidas y plaguicidas, mismo que en 2003 fue de 4 088 780 miles de pesos. El volumen de producción de fertilizantes, insecticidas y plaguicidas por tipo de producto en toneladas fue de 18 279 en el caso de insecticidas agrícolas en líquido, de 8 392 para insecticidas agrícolas en polvo, y de 31 878 de herbicidas y defoliantes para el año 2010 (INEGI, 2015); y en el “Consumo aparente de Plaguicidas por tipo de Producto” que se calcula como la producción más la importación menos la exportación en un país, publicado por SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) declara que en el 2015 se consumieron 55.77 miles de toneladas de plaguicidas, sin señalar el nombre de los productos, solamente los clasifica de acuerdo a la presentación en: agrícola líquido, agrícola polvo, herbicidas y defoliantes y finalmente el total. De todo lo anterior se concluye el amplio uso de estos productos químicos en México (SEMARNAT, 2016).

En nuestro país, el uso de plaguicidas se encuentra regulado por la Comisión Intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST) desde 1987, cuya finalidad es llevar un control uniforme e integral de los plaguicidas autorizados en cuanto a su fabricación, formulación, mezclas, empaque, manejo, transportación, distribución, aplicación, almacenamiento, comercialización y disposición final mediante un catálogo que lista los productos y sus fichas técnicas con las características fisicoquímicas, entre ellas, el uso autorizado de los plaguicidas y sus mezclas (Pérez-Olvera, 2011). En este catálogo se encuentran 483 productos de los cuales 105 sustancias únicas y 58 mezclas están autorizadas para uso doméstico, urbano y de jardinería y no se establecen restricciones normativas para el uso y distribución de la cipermetrina como plaguicida de uso doméstico y de venta libre en establecimientos comerciales (CICOPLAFEST, 1991).

En el Estado de Aguascalientes existen 59 Establecimientos de Servicios de Control y Exterminación de Plagas registrados ante el Instituto de Servicios de Salud del Estado de Aguascalientes (ISSEA). Con la finalidad de conocer los plaguicidas vendidos y aplicados por estos establecimientos, realizamos un cuestionario basado en estudios realizados en México, y en la Norma Oficial Mexicana NOM-256-SSA1-2012: “Condiciones sanitarias que deben cumplir los establecimientos y personal dedicados a los servicios urbanos de control de plagas mediante plaguicidas” a 30 establecimientos. El sondeo mostró que la totalidad de los establecimientos utilizan al menos un piretroide en la mezcla que utilizan para la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aplicación doméstica de plaguicidas para control de fauna nociva, y de estos, un 68% declaró el uso de cipermetrina, en aplicaciones periódicas, recomendando su aplicación dos a tres veces por año (González-Arias et al., 2010), evidenciando la facilidad para adquirir y aplicar este producto para el uso doméstico permite que la población se encuentre ampliamente expuesta a la cipermetrina.

Marco Teórico

1. Cipermetrina

De acuerdo con la información recabada de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia de Protección Ambiental (EPA), El Centro de Servicio Nacional de Información sobre Venenos en el Reino Unido (UKPID), El Comité de productos Biocidas en Bélgica, el Comité de Acción de Resistencia a Insecticidas (IRAC) y la Red de Datos en Toxicología (TOXNET) de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos (NLM), y la Universidad de Montreal, Canadá para la organización no gubernamental *Équiterre*, se presenta a continuación la información sobre la descripción, características, propiedades y toxicología de la cipermetrina como sustancia activa.

1.1 Identidad

El número de registro del Servicio de Compendios Químicos (CAS por sus siglas en inglés) es el 52315-07-8. En la Lista Europea de Sustancias Químicas Notificadas (EINECS) su número es el 257-842-9. El número de registro ante el Consejo Analítico Colaborativo Internacional de Plaguicidas (CIPAC) es 332 (*Standing Committee on Biocidal Products*, 2012). El nombre dado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) es (RS)- α -ciano-3 fenoxibencil-(1RS)-cis, trans-3-(2,2-diclorovinil)- 2,2-dimetilciclopropano carboxilato. La fórmula molecular es $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$. Su nombre común y sinónimo es cipermetrina y cipermetrina cis:trans/40:60, respectivamente (Tomlin, 1997).

1.2 Características fisicoquímicas

La cipermetrina en su estado físico es un líquido color amarillo o café, con un leve olor químico; viscoso y con peso molecular de 416.3. Su punto de fusión es de 60 a 80°C en una presión de 101.3 kPa (760 mmHg). Tiene una baja solubilidad en agua (<9 $\mu\text{g/L}$; 4 $\mu\text{g/l}$), pero es soluble en metanol, acetona, xileno y cloruro de metileno. Tiene alta liposolubilidad

(log Pow = 5.3–5.6). Es combustible y en formulaciones con solventes orgánicos puede ser flamable. Se descompone arriba de 220 °C. Su presión de vapor es baja: 6×10^{-7} Pa a 25 °C; por lo tanto, no se espera que la volatilización contribuya notablemente a su disipación en el ambiente (O’Neil, 2006).

La estructura química de la cipermetrina se observa en la Figura 1.

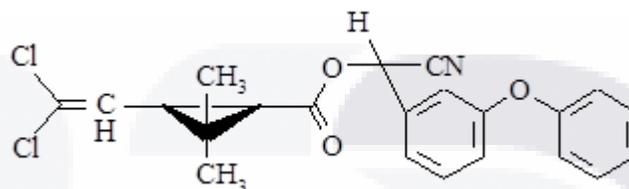


Figura 1. Estructura química de la cipermetrina
(*Standing Committee on Biocidal Products, 2012*)

La cipermetrina pertenece al grupo de plaguicidas piretroides sintéticos tipo II compuestos por una estructura con una porción de éster carboxílico ciclopropano básica más una estructura fenoxibencilo con un grupo ciano agregado en un átomo de carbono, lo que le confiere una actividad insecticida potenciada (Cage et al., 1998).

Todos los piretroides tienen cuatro estereoisómeros, con diferente orientación de los sustituyentes en el anillo ciclopropano. Los isómeros tienen diferentes actividades biológicas y nombres comunes que reflejan su importancia comercial. El ratio de isómeros cis:trans de la cipermetrina es de 40(±5) :60(±5). La molécula de la cipermetrina tiene 3 centros quirales que da lugar a 8 estereoisómeros y 4 pares de enantiómeros: dos cis (CIS I y CIS II) y dos trans (TRANS I y TRANS II). Cada par de enantiómeros es racémico (mezcla 50:50 de cada enantiómero). En el caso de la alfa-cipermetrina, contiene más del 90 por ciento de dos de los cuatro isómeros cis más activos desde el punto de vista insecticida de la cipermetrina (Aldridge et al, 1978).

1.3 Uso

La cipermetrina es un insecticida de uso doméstico, agrícola y de salud pública. Se describen usos como el control de ectoparásitos que infestan el ganado, ovejas y pollos (Heitzman, 1997); como medio preventivo y remedial en bosques y madera de construcción en climas subtropicales contra insectos destructores de madera (*Standing Committee on*

Biocidal Products, 2012), a través de métodos de aplicación profesional como la presión de vacío, doble presión de vacío, baños y aspersion; y aplicación no profesional por métodos de aspersion o barrido.

1.4 Mecanismos de toxicidad

Los isómeros neurotóxicos de los piretroides se unen a la subunidad alfa de los canales de sodio dependientes de voltaje, y modifican sus características de compuerta tanto en mamíferos como en invertebrados con retraso en el cierre de los canales, lo que incrementa la excitabilidad de la membrana celular, provocando eventualmente un bloqueo en la conducción. En el caso particular de los piretroides tipo II como la cipermetrina, se han reportado: despolarización de las membranas en nervios mielinizados, disminución en la amplitud del potencial de acción y aperturas muy prolongadas de los canales de sodio, esto produce parálisis muscular y muerte por discapacidad del sistema nervioso que sobreviene minutos después de la absorción de esta. Este mecanismo se cumple tanto en insectos como en mamíferos. Por otro lado, se han reportado acciones postsinápticas como interacción con receptores nicotínicos de acetilcolina y GABA (ácido gamma aminobutírico) y liberación de noradrenalina (OMS, 2005).

1.5 Clasificación toxicológica

El Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación (*GHS*, por sus siglas en inglés) de la OMS, clasificó a la cipermetrina por su toxicidad dentro de la categoría 3 ("Tóxico si es ingerida") al ser administrada por vía oral, con una Dosis Letal 50 (DL_{50}) en rata de 250 mg/kg. (OMS, 2010). La clasificación toxicológica del Código Federal de Regulaciones (29 CFR 1910) de la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (*OSHA*, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, graduada del 1 al 4 donde el efecto dañino disminuye conforme el número de categoría incrementa, indica variaciones en la categoría toxicológica para la cipermetrina de acuerdo con el tipo y a la vía de exposición (Burrigh, 1988), donde:

- Toxicidad aguda, Oral (Categoría 3)
- Toxicidad aguda, Cutáneo (Categoría 4)
- Irritación cutánea (Categoría 2)
- Sensibilización respiratoria (Categoría 1)
- Toxicidad específica en determinados órganos - exposición única (Categoría 3)
- Sistema respiratorio, Toxicidad acuática aguda (Categoría 1)

- Toxicidad acuática crónica (Categoría 1)

El Comité de Resistencia de acción de insecticidas (*IRAC*, por sus siglas en inglés) clasifica a los pesticidas por su modo de acción, que se asigna al involucrar la identificación de las proteínas responsables del efecto biológico (proteínas blanco), por su efecto fisiológico y por su estructura relacionada. En esta clasificación, la cipermetrina se encuentra dentro del grupo 3A: Piretroides moduladores de los canales de sodio que los mantienen abiertos produciendo hiperexcitabilidad y en algunos casos, bloqueo nervioso por el papel que desempeñan los canales de sodio en la propagación de los potenciales de acción a lo largo de los axones (Sparks et al., 2021).

1.6 Toxicocinética de la Cipermetrina

1.6.1 Absorción. No se cuenta con información publicada sobre el mecanismo de absorción ni el lugar preciso de absorción en el tracto gastrointestinal cuando se ingiere por vía oral; sin embargo, se puede atribuir a sus propiedades lipofílicas el atravesar las células intestinales por difusión de las membranas lipídicas y pasar a la circulación sistémica. En cuanto a la vía dérmica e inhalada, se considera que el mecanismo de absorción es la difusión a través de las membranas lipídicas de la piel y de los alveolos pulmonares (Luty, et al., 2000).

1.6.2 Distribución. Por su propiedad de alta liposolubilidad, se distribuye a casi todos los tejidos y se concentra en tejidos con alto contenido graso, como el tejido graso y nervioso. El metabolismo de los piretroides resulta en compuestos más hidrosolubles que el compuesto padre, por lo que es más difícil que los metabolitos crucen la barrera hematoencefálica (Latuszyńska et al., 2001).

1.6.3 Metabolismo. Es necesario conocer el destino metabólico de este plaguicida en animales y otros organismos por su amplio uso a nivel agrícola y doméstico. Se ha reportado en ratón que se absorbe fácilmente y se excreta como una serie de metabolitos derivados de la hidrólisis, oxidación y conjugación (Crawfort et al., 1981).

Los metabolitos de los piretroides no muestran acumulación en ningún órgano o tejido específico después de su absorción. Las reacciones metabólicas principales son la hidrólisis de éster, oxidación y conjugación, llevándose a cabo en dos fases:

1.6.3.1 Fase I Funcionalización. En el caso de la cipermetrina, se lleva a cabo por medio de oxidación e hidrólisis en los microsomas del retículo endoplásmico liso del hígado. La hidrólisis por medio de la enzima carboxilesterasa (hCE1) rompe el enlace éster y se libera, por un lado, el grupo alcohol-alfa-ciano-3-fenoxibenzil que se excreta de forma incompleta y se acumula en piel, estómago y probablemente en pulmón; y por otro, se agrega hidrógeno y se forman dos derivados: DCCA (ácido carboxílico) y 3-PBA (ácido fenoxibenzoico), que son fácilmente excretables. En cuanto al DCCA, dependiendo del isómero proveniente de cipermetrina (cis o trans) puede ser cis-DCCA o trans-DCCA. De los metabolitos resultantes de esta fase I, el que se retiene en fluido extracelular y se une a proteínas séricas (albúmina) es el compuesto que contiene el grupo ciano (alcohol-alfa-ciano-3-fenoxibenzil). La oxidación se lleva a cabo en menor medida que las reacciones de hidrólisis. El ácido 3-fenoxibenzoico es oxidado en la posición 4' del anillo. También se lleva a cabo en los microsomas del retículo endoplásmico liso del hígado, donde se encuentran las enzimas oxidorreductasas, de las cuales, las isoformas con mayor actividad son: CYP 1A1, CYP 2A1, CYP 2C6, CYP 2C11, CYP 3A1, CYP 3A2 y principalmente, CYP 2E1 (Nishi et al., 2006).

1.6.3.2 Fase II Conjugación. Genera formas hidrofílicas y lipofílicas. Los conjugados hidrofílicos se encuentran como glucorónidos, sulfatos, y aminoácidos, fácilmente excretados por orina. Los conjugados lipofílicos muestran mayores tiempos de bioretención. Uno de los metabolitos comunes de los piretroides, el ácido 3-Fenoxibenzoico, presenta conjugados de aminoácidos en varias formas como glicina, taurina o glicilvalina (dipéptido). También se ha reportado la formación de tiocianato a partir de la hidrólisis de ésteres; ácido sulfónico formado en el tracto gastrointestinal por adición no enzimática del ácido sulfónico y conjugados ácidos. Los conjugados lipofílicos que se forman a partir del metabolismo de los piretroides son el éster de colesterol, glicérido y conjugado de ácido biliar. Se considera que el metabolismo de la cipermetrina es rápido, con una vida media de 30 minutos a 2 horas, y que probablemente tenga una segunda fase de eliminación más lenta, que resulta de la liberación del compuesto padre de los compartimientos de almacenamiento con una tasa de liberación menor a la tasa de metabolismo, en su mayoría por hidrólisis por carboxilesterasa hCE-1 y hCE-2 (Kaneko, 2011).

1.6.4 Eliminación. Las fracciones ácido y alcohol de los piretroides se excretan más rápido por orina y heces de forma completa varios días después de la administración. Sin embargo, los derivados del grupo ciano muestran excreción incompleta y retención prolongada en piel y estómago, probablemente debida a la distribución al espacio extracelular y a su unión parcial con la proteína sérica albúmina (como es el caso del tiocianato). En el ser humano, el 43% de una dosis oral se excreta en la orina en un plazo de 24 horas en forma de ácido cis-ciclopropano-carboxílico libre o conjugado (Galea et al., 2015).

1.7 Efectos adversos de la cipermetrina

A pesar de los beneficios que se obtienen del uso de los plaguicidas como la cipermetrina en el control de plagas y vectores de enfermedades, su uso ha puesto en peligro la salud pública mediante la contaminación del ambiente (Morgan et al., 2016). Los efectos adversos por toxicidad inducida por la cipermetrina se agrupan por el órgano o sistema involucrado.

1.7.1 Toxicidad en sistema inmune. La cipermetrina y otros piretroides pueden producir daño directo en los tejidos linfoides y las células producidas por éstos. El metabolismo del plaguicida puede producir la generación de especies reactivas de oxígeno tóxicas que producen alteraciones en los componentes de las células como lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN). También puede interferir con la cadena respiratoria mitocondrial e inhibiciones de enzimas de metabolismo, como las esterasas antes mencionadas. Esto afecta a las células del sistema inmune como los macrófagos y células dendríticas, disminuyendo su función como presentador de antígeno o fagocítica. Por otro lado, la reacción alérgica producida por la cipermetrina se desencadena por la producción de citocinas del perfil de respuesta inflamatoria TH₂, como la IL-4 e IL-13, posterior a la exposición, lo que promueve la secreción de IgE por los linfocitos B. Al unirse al receptor FcεRI, la IgE produce la degranulación de los mastocitos y basófilos, que se manifiesta como dilatación de vasos sanguíneos, incremento en la secreción de moco, contracción del músculo liso respiratorio y gastrointestinal (Hussien et al., 2013; AlKahtane et al., 2018; Wang et al., 2019).

1.7.2 Toxicidad en sistema nervioso. La cipermetrina incrementa la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en todas las regiones del cerebro: corteza cerebral, cerebelo, hipocampo e hipotálamo (Luty et al., 1998). Por lo tanto, incrementa el nivel de acetilcolina

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y glutamato en el espacio sináptico y estimula receptores específicos, estimulando la actividad nerviosa y provocando repetición y aumento en la duración de los estímulos nerviosos. También producen el retraso en el cierre de los canales de sodio del sistema nervioso central, provocando un estado de hipopolarización e hiperexcitación de las neuronas, persistiendo el potencial de acción después de la repolarización de la membrana (Raszewski et al., 2015).

1.7.3 Disrupción endócrina. Se refiere al mecanismo por el que se impide la comunicación entre órganos desde el punto de vista hormonal. La cipermetrina, al igual que otros plaguicidas, puede producir la activación aberrante de los receptores estrogénicos y androgénicos a través de modificación en la expresión de genes que resulte en una disminución de la función inmunitaria, desarrollo de algunos tipos de cáncer y activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Glándula Suprarrenal (Moustafalou & Abdollahi, 2013).

2. Intoxicación inhalada

La intoxicación inhalada es la exposición a tóxicos respirables en un espectro de gases, vapores, humos, partículas aéreas y aerosoles que entran al cuerpo vía tracto respiratorio y resultan en daño pulmonar y/o sistémico (Chen et al., 2012).

2.1 Tipos de estudio de acuerdo con el tiempo de intoxicación inhalada

La evaluación de la toxicidad vía inhalada incluye la determinación de los cambios inducidos por sustancias químicas en exposiciones a corto y a largo plazo. Los estudios agudos generalmente definen la cantidad del químico que se requiere para producir una respuesta dada, los signos y síntomas asociados con exposiciones a altas concentraciones. Consisten en una sola exposición, de 4 a 6 horas para probar el rango de dosis a las cuales se produce la muerte, generalmente, con el fin de definir la dosis letal 50 (DL₅₀). Los estudios a largo plazo o crónicos se conducen para determinar el órgano o sistema blanco afectado por exposiciones repetidas. Se lleva a cabo exponiendo a animales machos a concentraciones del químico de 1/5, 1/15, y 1/50 de la DL₅₀. Se observa al grupo estudiado diariamente, en búsqueda de signos clínicos: peso, características fisicoquímicas y determinaciones analíticas a las sustancias químicas administradas en concentraciones muy bajas; para evaluar los efectos sistémicos de las sustancias químicas, y definir las variables: límite de

exposición, supervivencia, y producción de daño reversible e irreversible (Kinney et al., 1989).

2.2 Modelos de administración para intoxicación vía inhalada

Se han utilizado y diseñado varios tipos de exposición para evaluar el efecto de materiales a medida que ingresan al tracto respiratorio. Éstos son:

2.2.1 Cámara de cuerpo entero. Es un contenedor donde se pueden colocar y remover animales de experimentación y se introducen los agentes físicos y químicos que serán administrados al animal. Este modelo refleja la condición habitual del ser humano, expuesto de manera cotidiana, libre e individual a una atmósfera que contiene el químico, de tal manera que la absorción en el sistema ocurre de manera fisiológica por vía inhalada, dérmica posterior al contacto con vapores o aerosoles y oral por la deglución del compuesto al ser atrapado por el moco en vía respiratoria superior. Este estudio puede utilizar cantidades variables de animales, y se ha demostrado que no se modifica la cantidad de vapor o aerosol inhalado por los residentes de la cámara (Wong, 2007). Se ha descrito la administración de sustancias químicas y fármacos vía nebulizada; en el caso de la rata, la partícula producida debe ser de 3 µm de diámetro para alcanzar el espacio alveolar (Kling, 2011).



Figura 2. Cámara de cuerpo entero con administración de agente vía nebulización (Kling, 2011)

2.2.2 Exposición sólo cabeza. Es útil para exposiciones breves y repetidas donde la cantidad de agente es limitada y para restringir la exposición al tracto respiratorio del animal. En este sistema no hay manera de evitar la exposición inhalada. Las desventajas

de este sistema incluyen la pérdida de material en el pelo del animal, dificultad para un correcto sellado alrededor del cuello y que se somete al animal a estrés. Tampoco representa la situación habitual de exposición cotidiana doméstica o laboral (Wong, 2007).

2.2.3. Exposición sólo nariz. Se trata de respiradores que se unen a la nariz del animal, y sólo puede ser usado en especímenes relativamente grandes. Da exposiciones breves al compuesto de interés y se utiliza para determinar límites de exposición o determinaciones de dosis letales (Kennedy, et al., 1989).

2.2.4 Intubación endotraqueal, traqueotomía y catéteres. Es la manera de limitar la exposición a los pulmones únicamente, sin utilizar la vía aérea superior. Es el más difícil de usar por sus limitaciones mecánicas (Phalen et al., 1984).

3. Morfología del aparato respiratorio

El pulmón, a diferencia de otros órganos, asume su función principal, la respiración, después de dejar la vida intrauterina. Todo el componente epitelial del sistema respiratorio se origina del endodermo a partir de la tercera semana de vida embrionaria, del cual se desprenden una gran cantidad de estirpes celulares: Células ciliadas, células basales, células claras, y células caliciformes en la porción proximal de las vías aéreas; neumocitos tipo I y II en las porciones distales de las vías. El árbol bronquial se desarrolla por gemación y división dicotómica, arrastrando una capa de tejido mesenquimatoso del mesodermo en la línea media del embrión; y a partir de éste, se formarán el componente vascular, músculo liso, cartílago y demás tejido conectivo que se encuentra rodeando a los pulmones (Navas et al., 2010).

La estructura histológica alveolar se desarrolla en forma rápida a partir de la semana 24 y el número de neumocitos tipo II aumenta entre las semanas 30 a 32, que coincide con la producción de surfactante tensioactivo. El desarrollo del parénquima pulmonar y alveolar ocurre después del nacimiento con la maduración de los ductos transicionales, sáculos alveolares y septos secundarios, donde las células epiteliales experimentan un crecimiento masivo. De los 2 a 3 años, aumenta el número de alvéolos; posteriormente, lo hacen en número y tamaño continuando hasta su estructura definitiva en la edad adulta de 300 millones de alvéolos y 75 metros cuadrados de superficie de intercambio gaseoso (Sepúlveda-Saavedra & Soto-Domínguez, 2012).

3.1 Tracto respiratorio superior

El tracto respiratorio superior juega un papel crítico en el condicionamiento (provee de humedad y temperatura) al aire que entra a los pulmones. La mayoría del aire que se transporta desde la cavidad nasal tiene un flujo de características turbulentas y conforme se mueve hacia la tráquea, encuentra el ángulo recto en la parte posterior de la nasofaringe. Por estas características de la anatomía nasofaríngea y de la dinámica del flujo de aire, la mayoría de las partículas y gases respirados, impactan o son absorbidos a lo largo de la superficie de la mucosa y removidas de la vía superior hacia la parte posterior de la faringe, donde las secreciones son tragadas eventualmente. Sin embargo, esta limpieza es ineficiente para las partículas menores a 1 micrómetro de diámetro o gases de baja reactividad y una fracción de estos contaminantes se deposita en la vía inferior o en las regiones alveolares (Sánchez & Concha, 2018) (Figura 2).

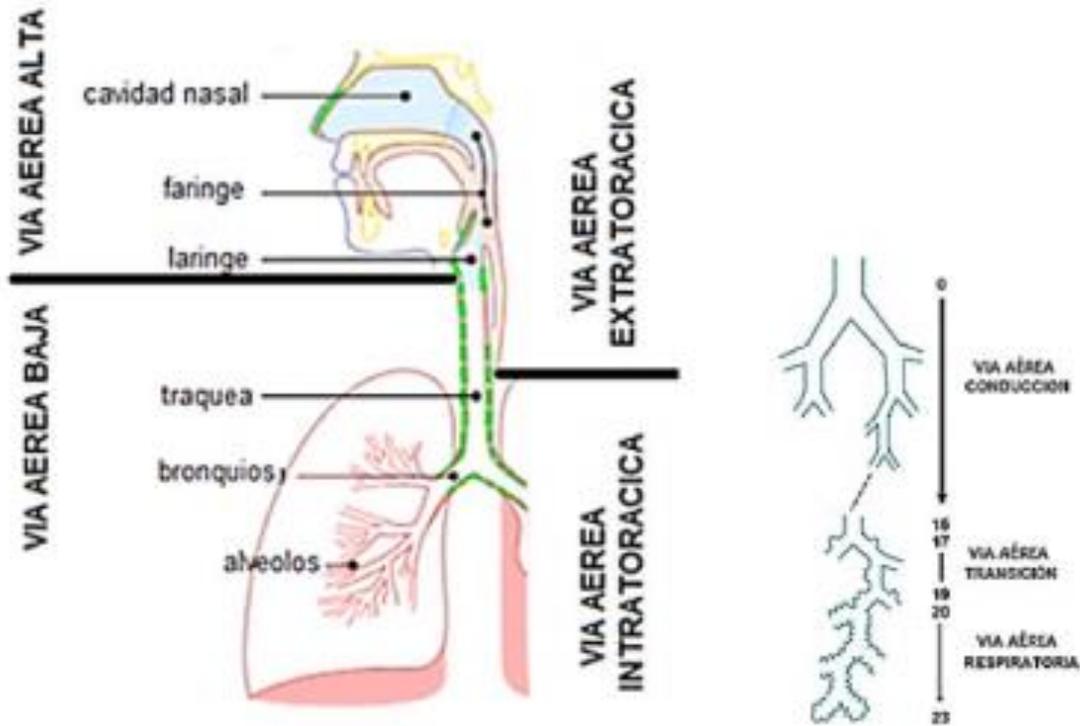


Figura 3. Estructuras y división funcional de la vía aérea (Sánchez y Concha, 2018).

3.2. Tráquea

Ocupa una posición central pero desplazada ligeramente hacia la derecha por la arteria aorta. Está constituida por anillos cartilaginosos abiertos en su parte posterior. Se bifurca a nivel de la quinta o sexta vértebra dorsal dando lugar a los dos bronquios principales, el derecho más corto. El espolón que separa los dos bronquios fuente se denomina carina (Sánchez & Concha, 2018) (Figura 3 A, B, F).

3.3 Bronquios

Cada pulmón tiene un bronquio principal o bronquio fuente. Después de dar origen al bronquio del lóbulo superior, el bronquio derecho continúa como bronquio intermediario y se bifurca dando origen a los bronquios de los lóbulos medio e inferior. El izquierdo da origen a dos bronquios lobulares, que se subdivide en las ramas superior e inferior, y cada una se subdivide en ramas, una para cada segmento pulmonar, por eso la segmentación bronquial se corresponde con la segmentación pulmonar. A partir de este punto, los bronquios se dividen dicotómicamente. Las divisiones del árbol traqueobronquial se numeran desde la tráquea o generación 0 hasta los sacos alveolares o generación 23. Las primeras 16 generaciones sirven para conducir el aire, no contienen alvéolos y constituyen el espacio muerto anatómico. Las generaciones más distales, contienen un número creciente de alvéolos y participa en el intercambio gaseoso. La pared bronquial está formada por tres capas: mucosa, submucosa y adventicia. La mucosa incluye el epitelio y lámina propia. La submucosa contiene glándulas mucosas, músculo liso, cartílago, tejido elástico y una red capilar. En la adventicia, constituida por tejido conectivo, se encuentran nervios, vasos sanguíneos, linfáticos y tejido adiposo. El músculo liso está organizado en láminas cuya cantidad, localización y orientación varían de acuerdo con el tamaño del bronquio; su contracción ocasiona disminución del calibre y longitud del bronquio. El cartílago provee el soporte estructural y evita el colapso durante la espiración. La cantidad de músculo y cartílago disminuye progresivamente hacia la periferia. Los bronquios intrapulmonares contienen una capa subepitelial elástica. Después, aparece el músculo liso en forma de espiral alrededor de la vía aérea, extendiéndose hasta los bronquiolos respiratorios. Esta organización estrecha en forma de espiral permite la broncoconstricción cuando el músculo liso se contrae. Alrededor del músculo liso, hay una capa de tejido conectivo laxo que rodea al músculo liso, donde están situadas las glándulas bronquiales y las placas de cartílago (Sánchez & Concha, 2018) (Figura 3 C, D).

3.4 Bronquiolos

Son las vías aéreas distales que no contienen cartílago y cuyo diámetro es menor de 2 milímetros. Se dividen de acuerdo con su función en membranosos (no respiratorios) y respiratorios. Los bronquiolos no respiratorios sirven como conductores del aire y su última división se denomina bronquiolo terminal, del cual se originan de tres a cinco bronquiolos respiratorios que tienen alvéolos en sus paredes, que a su vez originan de tres a cinco conductos alveolares, de cuyas paredes nacen los sacos alveolares. La pared del bronquiolo no contiene cartílago ni glándulas mucosas. Los conductos alveolares, revestidos como los alvéolos por una capa única de células, funcionan como vías de conducción y participan en el intercambio gaseoso (Sánchez & Concha, 2018) (Figura 3 E).

3.5 Alveolos

Los alvéolos son las estructuras terminales de la vía respiratoria. Tienen forma hexagonal, y se caracterizan por compartir paredes planas. A este nivel de la vía, ya no hay cartílago, por lo que el tejido elástico de los septos alveolares evita el colapso de la vía aérea distal. El pulmón tiene entre 300 y 480 millones alvéolos. Están rodeados por neumocitos tipo I y tipo II. Los neumocitos tipo I son células planas de 0.1 a 0.5 μm , que constituyen el 95% de la superficie alveolar y son las estructuras encargadas del intercambio gaseoso. Los neumocitos tipo II son cuboidales y se caracterizan por presentar cuerpos lamelares, constituyen el 5% de la superficie alveolar y son los encargados de producir surfactante pulmonar, cuya función es disminuir la tensión superficial en la interfase alveolar aire-líquido y evitar el colapso de los bronquiolos terminales y la zona alveolar (Sánchez & Concha, 2018) (Figura 3 E).

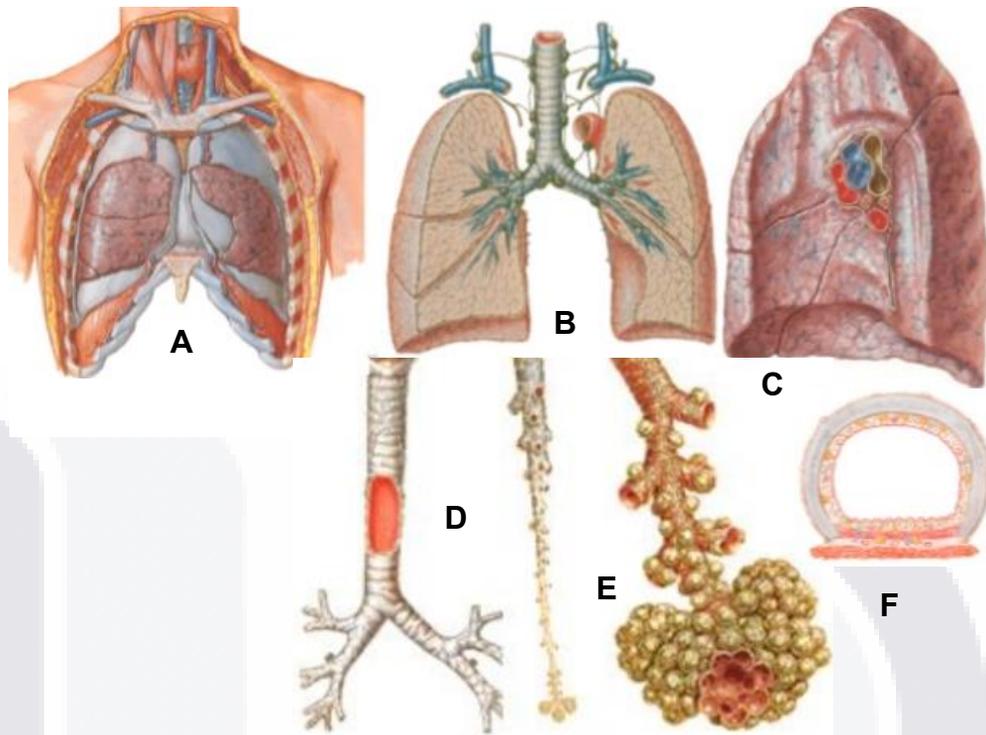


Figura 4. Anatomía de la vía respiratoria. A. Órganos respiratorios *in situ*. B. Árbol traqueobronquial y pulmones. C. Hilio Pulmonar. D. Vía respiratoria extrapulmonar (zona de conducción). E. Vía respiratoria intrapulmonar (zona respiratoria). F. Tráquea corte transversal (Netter, 2015).

3.6 Mucosa y epitelio respiratorio

Las vías aéreas, desde la tráquea hasta los bronquíolos respiratorios, están recubiertas de epitelio implantado sobre una membrana basal. Hasta poco antes del bronquíolo terminal, el epitelio es columnar alto, cilíndrico y pseudoestratificado y disminuye progresivamente de altura en sentido distal. En los bronquíolos terminales el epitelio consiste en una capa única de células cuboidales y en los respiratorios de un epitelio plano. El epitelio bronquial es estratificado, con varias poblaciones celulares. Las células que predominan son las células secretoras (en la vía superior la mayoría son secretoras de moco), células ciliadas epiteliales y células basales no ciliadas. También se pueden encontrar células neurosecretoras como las encontradas en el epitelio gástrico, llamadas células de Kultschitsky o células K, mejor conocidas como cuerpos neuroepiteliales y se considera que tienen una función secretora neuroendocrina. Están ubicadas en bronquios y bronquiolos. Tienen numerosos gránulos grandes, finos, con núcleo denso en la porción basal de la célula. Estos gránulos son secretados al tejido conectivo peribronquial y rodean el músculo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

liso y en esta secreción se han identificado productos capaces de producir contracción del músculo liso, secreción de moco y movimiento ciliar. Los cilios son los principales encargados de limpiar de sustancias inhaladas colocadas en el revestimiento de la mucosa desde la nariz. Cuando existe disfunción de los cilios, se ha observado una predisposición a infecciones respiratorias y bronquiectasias en el individuo. Las células ciliadas se distribuyen ampliamente en la vía aérea, e incrementan su superficie apical, que constituye el 80% de la superficie de la membrana plasmática de la vía aérea. Por lo tanto, los cilios son un filtro primario para contaminantes o xenobióticos inhalados que reaccionan con las membranas celulares. Cada célula ciliada contiene alrededor de 200 cilios, que se mueven en una contracción bifásica, que de forma coordinada produce un movimiento de transporte de 20 mm/min en bronquios y 1 mm/min en bronquiolos. Además, las células ciliadas contienen bombas de iones que remueven el sodio de la luz del bronquio y de cloro, que lo sacan hacia la luz; así, el agua sigue un gradiente osmótico, cuya función es controlar la viscosidad de la capa de fluido seroso. Las células caliciformes y las glándulas mucosas producen moco, aunque el volumen de moco proveniente de las glándulas es mayor que la derivada de las células mucosas en condiciones normales.

Las características de las glándulas mucosas son:

- Tubulares.
- Bordeando la submucosa del bronquio entre las placas de cartílago.
- Conectadas por un túbulo secretor a la luz de la vía aérea.
- Se han encontrado células plasmáticas en los túbulos secretores, que contienen IgA e IgG, predominando IgA. Dos moléculas de IgA se unen por medio de una proteína J.

Esto forma un complejo secretor de una pieza formado por células epiteliales delineando los túbulos secretores, y este complejo se transporta hacia la luz tubular y de ahí a la capa mucosa. A continuación, se listan las células de mucosa y epitelio plano alveolar (Sánchez & Concha, 2018).

3.6.1 Células basales. Constituyen el origen de las demás células epiteliales, diferenciándose en ciliadas o caliciformes (Rokicki et al, 2016).

3.6.2 Células ciliadas. Grupo celular predominante en la tráquea y los bronquios y se extienden hasta los bronquiolos terminales. Su superficie libre está recubierta de cilios, 250 por cada célula y su altura es proporcional al diámetro de las vías aéreas. Los cilios

representan extensiones móviles del citoplasma que impulsan el moco en dirección a la laringe y están compuestos por dos filamentos axiales centrales rodeados por nueve parejas de microtúbulos (Rokicki et al, 2016).

3.6.3 Células caliciformes. Se encuentran interpuestas entre las células ciliadas y menos numerosas que éstas, en una proporción de 1:4. Disminuyen en los bronquios periféricos y no se observan en los bronquiolos respiratorios. Sintetizan un moco viscoso y elástico, rico en polisacáridos, cuya importancia es mayor en los bronquiolos membranosos donde no hay glándulas mucosas (Rokicki et al, 2016).

3.6.4 Mastocitos. Adyacentes al músculo liso, poseen gránulos citoplasmáticos que contienen histamina, serotonina y otros mediadores bronco-constrictores que participan en la respuesta inflamatoria alérgica, provocando hiperreactividad bronquial, aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, hipersecreción de moco e infiltración de linfocitos (Rokicki et al, 2016).

3.6.5 Células de Clara. Carecen de cilios y se proyectan a la luz bronquial en forma de cúpula abombada. Su número aumenta al disminuir las células ciliadas y constituyen la masa celular principal en los bronquiolos. Producen una sustancia de viscosidad menor que el moco, en la cual los pocos cilios existentes en este nivel vibran fácil y eficientemente. Las células de Clara son uno de los tipos de células madre de la vía aérea. Las células de Clara contribuyen a la regeneración celular en el epitelio bronquial en el estado basal. Sus funciones son:

- Secreción de componentes primarios del epitelio respiratorio bronquiolar.
- Células progenitoras de células ciliadas y células de Clara.
- Reguladoras de los contenidos de las secreciones en los segmentos distales del tracto respiratorio.
- Biotransformación de xenobióticos inhalados, junto con el citocromo P-450 y monooxigenasas.
- Induce procesos neoplásicos en los pulmones bajo la influencia de la mutación que induce KRAS gen.
- Secreta varias proteínas al árbol bronquial, sangre, orina, que pueden servir como pruebas diagnósticas (Rokicki et al, 2016).

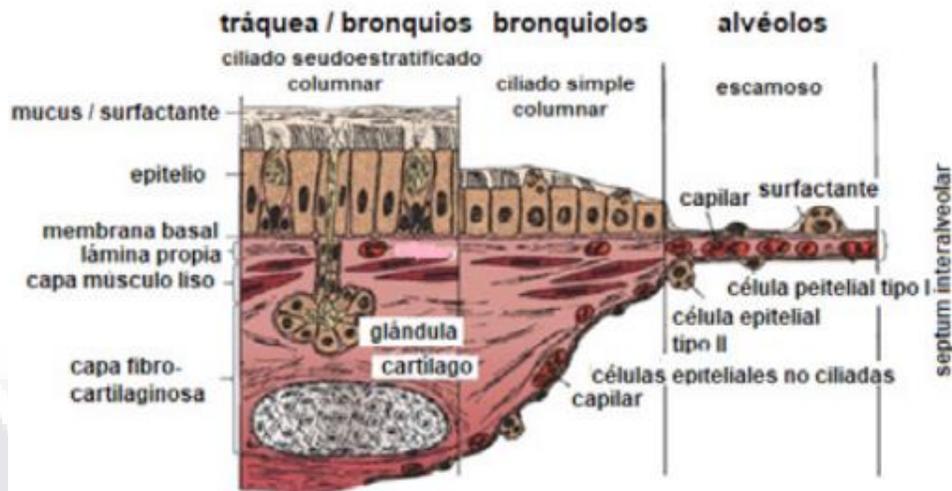


Figura 5. Epitelio de la vía respiratoria por estructura (Sánchez y Concha, 2018).

4. Respuesta inflamatoria en alergia

La alergia es una respuesta anormal del sistema inmune adaptativo contra sustancias ambientales no microbianas. Esta respuesta se caracteriza por la participación de IgE específica al alérgeno y linfocitos T cooperadores tipo 2 (TH2, por sus siglas en inglés), que reconocen los antígenos derivados del alérgeno. La sensibilización a un alérgeno refleja la capacidad de las células TH2 de responder y liberar las citocinas IL-4 e IL-13 para producir el cambio de isotipo a IgE (Montero-Vega, 2006). La inflamación alérgica se clasifica en 3 etapas por su tiempo de evolución: Reacciones tempranas, tardías e inflamación crónica.

4.1 Reacciones de fase temprana. También conocidas como reacciones de hipersensibilidad tipo I, respuesta inmediata, ocurre dentro de los primeros minutos de exposición al alérgeno por la secreción de mediadores de los mastocitos en el sitio de afección. En individuos sensibilizados, estas células ya cuentan con receptores IgE específicos de alta afinidad en su superficie, que al ser activados, desencadenan un complejo de señalización intracelular que resulta en la secreción de tres tipos de productos biológicamente activos: las aminas mediadoras que se encuentran dentro de los gránulos citoplasmáticos, mediadores derivados de lípidos, y el grupo de productos sintetizados que incluye las citocinas, las quimiocinas y los factores de crecimiento. La degranulación o exocitosis de compuestos de los mastocitos libera aminas biogénicas, proteoglicanos serglicina, serinproteasas, enzimas y citocinas. Al ser liberados todos estos mediadores de manera local, la reacción inflamatoria de fase temprana se instala (Galli et al., 2008).

4.2 Reacciones de fase tardía. Los mastocitos, que responden a IgE y al alérgeno, también liberan un amplio rango de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, pero de una forma más lenta que los mediadores preformados. Esta fase ocurre de 2 a 6 horas después de la exposición al alérgeno, con un pico entre las 6 y 9 horas. No se desarrolla en todos los sujetos sensibilizados, y puede no haber una demarcación entre el fin de la fase temprana y el inicio de la tardía. Los leucocitos reclutados incluyen células TH2, granulocitos (eosinófilos, neutrófilos y basófilos) y monocitos (Galli et al., 2008).

4.3 Inflamación crónica alérgica. Cuando la exposición al alérgeno es continua o repetitiva, la inflamación persiste. Esto hace que se puedan encontrar algunas células de inmunidad innata y adaptativa en los tejidos donde se tiene contacto con el alérgeno. Esta inflamación persistente, se asocia con cambios estructurales en las células, e incluso puede llegar a disminuir la función del órgano afectado (Galli et al., 2008).

5. Citocinas como mediadoras de la inflamación

La Inmunología ha sido la fuente más significativa de investigación de las citocinas. Desde los años setenta ya era conocido que los linfocitos podían producir uno o más factores mitogénicos para otros linfocitos. El término interleucina se propuso basado en la capacidad de las proteínas de actuar como señal de comunicación entre distintas poblaciones de leucocitos, y son proteínas reguladoras secretadas por las células blancas y otras células. Sus acciones pleiotrópicas incluyen efectos en las células del sistema inmune y modulación de la respuesta inflamatoria (Oppenheim, 2001; Aarden et al., 1979). Sus características son:

- Son polipéptidos simples o glicoproteínas de menos de 30 KDa de tamaño.
- Su producción es regulada por estímulos, transitoria y con acción corta.
- Su efecto se produce por la unión con receptores de superficie altamente afines.
- Sus acciones conllevan incremento en la tasa de proliferación celular.
- Citocinas con estructuras diferentes, pueden ser similares en sus acciones.
- Una misma citocina puede ejercer varias acciones en diferentes células y tejidos.
- Los receptores para citocinas y los receptores hormonales comparten ciertas características estructurales (Oppenheim, 2001).

5.1 Transducción de señales

Las señales se generan en los receptores para citocinas de la superficie celular y se transmiten al interior de las células. Su mecanismo principal es el reclutamiento o activación de otras proteínas citoplasmáticas a regiones específicas en los dominios intracelulares de dichos receptores. Por ejemplo, las proteínas de unión del dominio de muerte intracelular inician la cascada de la apoptosis, que trae como resultado la activación de la quimiotaxis leucocitaria, incremento en el estallido respiratorio, fagocitosis y degranulación (Kishimoto et al., 1994).

5.2 Redes de citocinas

Las acciones en las citocinas pueden ser influenciadas por el entorno en el que actúan y especialmente por la presencia o ausencia de otros agentes biológicos activos, es decir, es contextual. Una misma célula puede estar expuesta a varias citocinas y agentes biológicos activos que resultará en varias interacciones sinérgicas o antagónicas de los agentes presentes. Es por esto, que los sistemas experimentales pueden subestimar la influencia de las acciones de las citocinas en su entorno natural. Las citocinas pueden estimular o inhibir la producción de otras citocinas. También tiene acciones indirectas, efectos estimulantes, interacciones, efectos de autoestimulación y mitogénico. Las acciones moleculares de las citocinas, conocidas gracias a los estudios de interrupción de un gen blanco, interacción compleja y resultado de las acciones de las citocinas son: pleiotropía, redundancia, sinergismo/antagonismo, cascada, y señalización y transducción vía receptores (dependiendo de si es de alta afinidad o con nivel reducido de expresión del receptor). El resultado de la mayoría de las interacciones entre citocinas es compatible con la homeostasis (Holtmann & Resch, 1995).

5.3 Respuesta TH2

La vía tipo 2 de la inflamación se caracteriza por la activación de citocinas provenientes de las células T cooperadoras 2 y de las células innatas tipo 2, que resultan en atopia y eosinofilia. Esta cascada inflamatoria inicia en las células epiteliales de la vía aérea, que liberan IL-23, IL-33 y linfopoyetina estromal tímica en respuesta a contaminantes, alérgenos y agentes infecciosos. Estas citocinas señalizan a eosinófilos, basófilos, mastocitos y linfocitos, que a su vez producen las citocinas efectoras que caracterizan la respuesta alérgica. La IL-4 es primordial para la diferenciación de los linfocitos a CD4+. La IL-13 lleva

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a la hiperreactividad de la vía aérea, producción de moco y fibrosis subepitelial. La IL-4 y la IL-13 comparten un complejo de receptor: (IL4R α /IL-13R α 1) y trabajan para promover el cambio de isotipo a IgE de los linfocitos B. Cuando la IgE se une a su receptor en los mastocitos y basófilos, la activación celular y degranulación ocurre con el reclutamiento de otras células inflamatorias en las vías aéreas. Otra citocina tipo 2 es la IL-5, que es crítica para la proliferación, maduración y quimiotaxis de los eosinófilos. Los eosinófilos liberan la proteína catiónica de los eosinófilos, la neurotoxina derivada de eosinófilos y la proteína básica principal que causa inflamación local en tejido en la vía aérea. El reconocimiento de antígenos induce la diferenciación de células T *naive* a células T cooperadoras efectoras, lo que incluye los subconjuntos de Th1, Th2 y Th17. Estas poblaciones expresan factores de transcripción maestros que producen un patrón especializado de citocinas que ejercen distintas funciones. Las células Th2 expresan el factor de transcripción maestro GATA-3, que normalmente se utiliza para la erradicación de parásitos. Este subconjunto produce interleucina 4, 5, 9, 13 y GM-CSF y se ha demostrado su papel en la respuesta alérgica en modelos animales y en humanos. Las células dendríticas recogen los alérgenos en los pulmones, se activan, maduran y migran a los ganglios linfáticos donde inducen el compromiso de los linfocitos hacia Th2. La IL-4 e IL-13 están involucradas en el cambio de isotipo hacia IgE en los linfocitos B. La IL-4 promueve la diferenciación a Th2 a través de STAT-6 y entonces amplifica la reserva de células Th2. Las células Th2 activadas, migran a los pulmones donde contribuyen a la inflamación. La IL-5 promueve la diferenciación de los eosinófilos (células características de las enfermedades alérgicas) y su reclutamiento en los pulmones. La IL-13 permite el reclutamiento de células inflamatorias en los pulmones y actúa sobre las células epiteliales, resultando en la producción de quimioatrayentes. La IL-13 también permite la producción de moco por las células caliciformes, promueve la broncoconstricción y evita la relajación muscular mediada por óxido nítrico (Nakayama et al., 2017).

Justificación

La cipermetrina tiene amplio uso y disponibilidad. En México, no hay restricciones para su obtención, comercialización y aplicación en el área doméstica y agrícola, apuntando la importante exposición de la población en general, por lo que la exposición inhalada a cipermetrina afecta a miles de individuos cada año.

Está descrito que la cipermetrina produce efectos adversos en la salud, pero hay pocos reportes que relacionen los niveles de residuos en tejido por exposición con estos efectos haciendo difícil la identificación de los efectos y su relación con el compuesto causante por la variación en la concentración y el tiempo de exposición.

Se cuenta con información limitada sobre los parámetros de toxicidad de cipermetrina, incluso de los relacionados con efectos adversos. Los trastornos inflamatorios tipo alergia, entre los que se encuentran los de vías respiratorias, afectan casi al 25% de la población del mundo desarrollado. En sujetos alérgicos, la exposición repetida a alérgenos ambientales resulta en inflamación alérgica crónica. La cipermetrina ha sido descrita como un alérgeno capaz de producir citocinas proinflamatorias y elevar los niveles de IgE en sangre.

Por todo lo anterior, se plantea el presente trabajo con el fin de explorar los efectos en vía respiratoria provocados por la exposición a la cipermetrina vía inhalada como insecticida de amplio uso y disponibilidad sin regulación ni restricción en nuestro medio, y con base en que la mayoría de los estudios reportan los efectos cuando se administra por vía oral o dérmica y no inhalada, se presenta el diseño y ejecución de un modelo de intoxicación crónica vía inhalada en rata Wistar.

Objetivo general

Determinar la concentración de cipermetrina y sus efectos en tejido pulmonar en un modelo de exposición crónica inhalada en rata Wistar.

Objetivos particulares

1. Establecer un modelo de exposición crónica a cipermetrina vía inhalada.
2. Determinar la constante de partición tejido/aire, sangre/aire y tejido/sangre para cipermetrina.
3. Estudiar *in situ* la respuesta inflamatoria en tejido pulmonar por exposición crónica a cipermetrina.
4. Determinar el tipo de respuesta inflamatoria mediante la expresión de citocinas en tejido pulmonar e IgE en sangre, por exposición crónica a cipermetrina.
5. Correlacionar la respuesta inflamatoria y la concentración de IgE con la concentración de cipermetrina en tejido pulmonar.

Hipótesis

“La exposición crónica a cipermetrina a dosis domésticas se relaciona con la producción de respuesta inflamatoria tipo alérgica en vías respiratorias de rata Wistar”.

Metodología

1. Modelo de exposición

Se utilizó un modelo de exposición inhalada tipo cuerpo completo (Wong, 2007). Se diseñó una cámara donde habitaron los grupos de trabajo durante el curso del experimento. El volumen de aire durante la nebulización de la cipermetrina fue de 54 litros con una salida para flujo de 2.5 cm. Se generaron partículas cargadas en cipermetrina con un nebulizador Citizen® Cun 60 ultrasónico con un flujo de 0.266 ml/minuto, y un tamaño de partícula producida de 5 μm MMAD (diámetro aerodinámico mediana de la masa). La exposición de los animales se realizó durante 30 minutos, una vez al día durante el tratamiento a una velocidad de salida 0.05 $\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$.



Figura 6. Cámara de exposición inhalada tipo cuerpo completo usada en este estudio

2. Dosis experimental

Se utilizó cipermetrina grado técnico (94.3%, Química Lucava®, Guanajuato, México) se preparó una solución a concentración estimada de 156.64 μg por m^3 de aire, y utilizando como vehículo agua desionizada y Tween 80 al 0.1%. La dosis de cipermetrina se calculó con base en la cantidad asperjada en 30 segundos recomendados en las instrucciones del producto comercial Raid® Acción Total (cipermetrina 1g/kg, SC Johnson and Son®, Estado de México, México).

3. Grupos experimentales

Se emplearon 32 ratas de la cepa Wistar macho, adultos, de 250 g de peso promedio, sin exposición a plaguicidas desde el periodo de gestación, 8 animales por tiempo experimental: 0, 7, 14 y 21 días. Se mantuvieron a temperatura ambiente (18°C a 26°C), bajo ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, y disposición de agua y alimento para roedor

Nutricubos® (Purina®, Mexico) ad libitum. Su uso y cuidados fueron de acuerdo con las especificaciones técnicas de la NOM-062-ZOO-1999-2001 y de la guías y recomendaciones de la Federación Europea de Asociaciones Científicas de Animales de Laboratorio (*FELASA*, por sus siglas en inglés). Al término de los tiempos experimentales, se obtuvieron muestras de sangre y pulmón, que fueron preservadas siguiendo la respectiva técnica de estudio hasta su procesamiento como se describe en la sección correspondiente. Los animales fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico intraperitoneal (1.5 mg/kg, Pisabental PiSA® Agropecuaria, Hidalgo, México).

4. Evaluación clínica de hipersensibilidad

Para determinar la severidad de los signos clínicos inducidos por la exposición a cipermetrina, se utilizó la escala de Li y colaboradores adaptada, del 0 al 5 donde el 0 representa ningún signo; 1 rascado alrededor de la nariz y/o la cabeza; 2 hinchazón alrededor de las mucosas de ojos y boca, diarrea, piloerección, letargia y/o letargia con incremento en la frecuencia respiratoria; 3 sibilancias, dificultad respiratoria y cianosis en boca y cola; 4 temblor o convulsiones seguidas de inactividad física; y 5 muerte (Li, et al., 2000).

5. Inmunolocalización de IL-4, IL-5, IL-13

Se realizó la técnica de perfusión intravascular (Prophet & Armed Forces Institute of Pathology U.S., 1992, pp. 29–31) en 3 animales de cada grupo experimental con dos lavados con solución salina al 0.9% con heparina (5000U/l) y procaína (0.2%) y perfusión con 40 ml de paraformaldehído al 4%. Posteriormente, se extrajo quirúrgicamente el pulmón derecho y se preservó en paraformaldehído (4%). Se procesó el tercio proximal del pulmón con la técnica histológica de inclusión en parafina (Prophet & Armed Forces Institute of Pathology U.S., 1992, pp. 29–31), para la obtención de cortes de tejido consecutivos de 2 µm de espesor que fueron colocados en portaobjetos silanizados. Se realizó inmunofluorescencia doble directa para IL-5 e IL-13 de acuerdo con el protocolo estándar del fabricante (Bioss Laboratories), así como inmunofluorescencia indirecta para IL-4 siguiendo el protocolo estándar del fabricante (abcam®) con las condiciones que se listan a continuación.

En la doble inmunofluorescencia directa se utilizaron anticuerpos policlonales Anti-IL13 Alexa Fluor® 488 de Bioss Laboratories a dilución de 1:200, tiempo de incubación 60

minutos a 37°C y Anti-IL5 Alexa Fluor® 594 de Bioss Laboratories a dilución de 1:200, tiempo de incubación toda la noche a 4°C. En la inmunofluorescencia indirecta se utilizó el anticuerpo primario policlonal Rabbit Anti-IL4 (Abcam® ab9811) a dilución 1:50 y tiempo de incubación toda la noche a temperatura ambiente y el anticuerpo secundario GOAT anti rabbit Alexa Fluor® 488 dilución 1:200, incubación 60 minutos a 37°C y 60 minutos a temperatura ambiente.

De cada uno de los animales, se obtuvieron tres cortes histológicos para su observación en el microscopio. En cada corte se revisaron tres campos aleatorios, empleando un microscopio confocal LSM 700 Zeiss®. Se capturaron imágenes de cada campo con el software Blue (Zeiss®). Para cuantificar la fluorescencia emitida, se convirtieron las imágenes a profundidad de color de 8 bits por canal, con el software Fiji Open Source image processing software package y se cuantificaron las unidades de fluorescencia (URF) (<http://fiji.sc>).

6. Evaluación histopatológica

En los cortes histológicos, se realizaron 2 técnicas de marcaje: Hematoxilina & Eosina (Prophet, 1992) y Eritrosina B (Erythrosin B 200964-5G, Sigma Aldrich®) (Benítez-Bribiesca et al., 1987). Se realizó un estudio morfométrico mediante el análisis de 5 campos aleatorios (100,000 μm^2) a 400 aumentos por laminilla en 3 cortes de cada animal. Se realizó la captura de imágenes en el microscopio óptico Axioskop® 40 (Carl Zeiss®) con la cámara CoolSnap Color y el software Image-Pro Plus (Kodak® 1D Image Analysis Software). Las variables estudiadas fueron: longitud del epitelio bronquiolar (μm), número de interrupciones de epitelio bronquiolar por campo (20,000 μm^2) y longitud del epitelio del tabique alveolar (μm). Se cuantificó el número de eosinófilos en 6 campos aleatorios (120,000 μm^2) a 400 aumentos de 3 cortes histológicos de cada animal.

7. Cuantificación de IgE

Se extrajo sangre por punción intracardiaca. Se obtuvo suero por centrifugación a 2500 g por 10 minutos (Centrífuga Eppendorf® - 5410) y se dividió en dos porciones, una para cuantificación de IgE, y otra para cuantificación de cipermetrina. Se mantuvieron las muestras en congelación a -80°C hasta el momento de su estudio. A temperatura ambiente, se elaboró un pool de suero por tiempo de tratamiento con 5 μL de cada muestra que fueron mezcladas en un tubo Eppendorf® utilizando un Vortex - Genie 2 (Scientific industries®)

durante 1 minuto a 10 revoluciones. La medición de IgE se realizó en cada uno de los pools con el kit comercial Rat IgE ELISA Kit de Abcam® (ab157736) por triplicado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

8. Extracción y determinación de concentración de cipermetrina en tejido

Se preservaron las muestras de pulmón y suero de 3 animales de cada grupo en tubos de cultivo nuevos, previamente lavados con etanol, agua destilada y ácido cítrico hasta su neutralización con agua destilada y secados en horno por evaporación en ultracongelador a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Se utilizaron los Agilent Bond Elut QuEChERS kits para cárnicos (©Agilent Technologies, Inc.) 5982-5650CH, siguiendo la metodología de la AOAC 2007.01 para la determinación de residuos de plaguicidas por extracción con acetonitrilo y fraccionamiento con sulfato de magnesio.

8.1 Cromatógrafo de gases

Características del Cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer en el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Aguascalientes, departamento de estudios ambientales.

8.2 Curva matriz

Se preparó con las siguientes concentraciones del estándar de cipermetrina (*Cypermethrin* 45835, Merck).

Tabla 1. Curva matriz para la determinación de la concentración de cipermetrina por cromatografía de gases

Vial	Concentración cipermetrina (mg/L)
1	1
2	2.5
3	5
4	10
5	50
6	75
7	100

8.3 Lavado de material

Todo el material de molienda y analítico fue preparado con lavados en el orden que se describe a continuación:

- Extrán
- Enjuague con agua corriente
- Ácido nítrico al 50%
- Enjuague con agua destilada hasta su neutralización
- Secado en horno por evaporación a 70°C
- Acetonitrilo grado reactivo 1000034000 (Merck)
- Acetonitrilo grado HPLC 34998 (Sigma Aldrich)
- Secado en horno por evaporación a 70°C

8.4 Molienda de muestras

En el caso del pulmón, se realizó maceración del órgano completo con mortero hasta formar una pasta uniforme. Para el suero, se hizo un *pool* con la muestra de los sueros de todos los animales de cada grupo.

8.5 Fase de extracción

- Se pesó la muestra en báscula analítica y se agregó acetonitrilo grado HPLC hasta completar 10g.
- Se agregó la muestra al tubo de centrífuga incluido en el kit.
- Se adicionó un homogeneizador cerámico dentro del tubo.
- Se agregaron 10 ml de acetonitrilo grado HPLC.
- Se agitó vigorosamente durante 1 minuto.
- Se agregaron las sales de extracción.
- Se agitó durante 1 minuto en Vortex - Genie 2 (Scientific industries®) y 1 minuto de manera manual.
- Se centrifugó durante 2 minutos a 3500 rpm a 19°C.
- Se tomaron 6 ml del sobrenadante y se agregaron al tubo de dispersión.

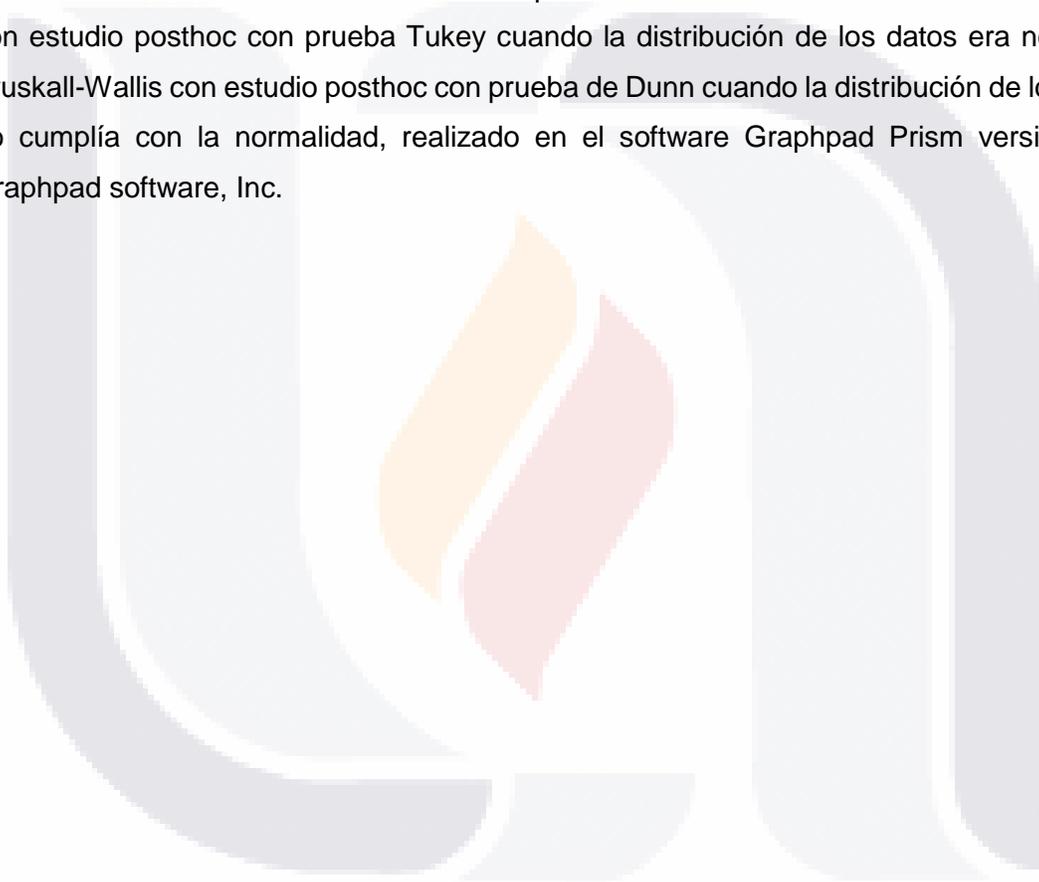
8.6 Fase de dispersión

- Se agitó el tubo durante 1 minuto en Vortex - Genie 2 (Scientific industries®)
- Se centrifugó durante 2 minutos a 3500 rpm a 19°C.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Se tomaron 2 ml del tubo con jeringuilla y se inyectan a través de un filtro para líquido de polipropileno para cromatografía, vaciándolo hacia viales para cromatógrafo de gases Perkin Elmer.
 - Se engarzan los viales y se pasan a lectura en el cromatógrafo de gases.

9. Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les realizaron las pruebas estadísticas ANOVA de un solo factor con estudio posthoc con prueba Tukey cuando la distribución de los datos era normal; y Kruskall-Wallis con estudio posthoc con prueba de Dunn cuando la distribución de los datos no cumplía con la normalidad, realizado en el software Graphpad Prism versión 5.01 Graphpad software, Inc.



Resultados

1. Evaluación clínica de hipersensibilidad

Los animales presentaron irritación nasal y arcadas nauseosas desde el primer día de exposición a la cipermetrina. Los signos se exacerbaron al séptimo día de tratamiento y se agregó epistaxis, piloerección, rascado intenso de orejas y nariz, rinorrea hialina, sialorrea, diarrea, dificultad respiratoria, letargia con anorexia y adipsia. Estos signos corresponden al nivel 3 de la escala de Li para la evaluación clínica de hipersensibilidad. Entre el séptimo y décimo día se presentó la muerte del 9.4% de los animales, descrito en el nivel 5 de la escala. Del día 11 al 15, los signos de hipersensibilidad decrecieron a nivel 3; y finalmente, del día 15 al 21 los signos de hipersensibilidad disminuyeron a nivel 2 (Li, et al., 2000).

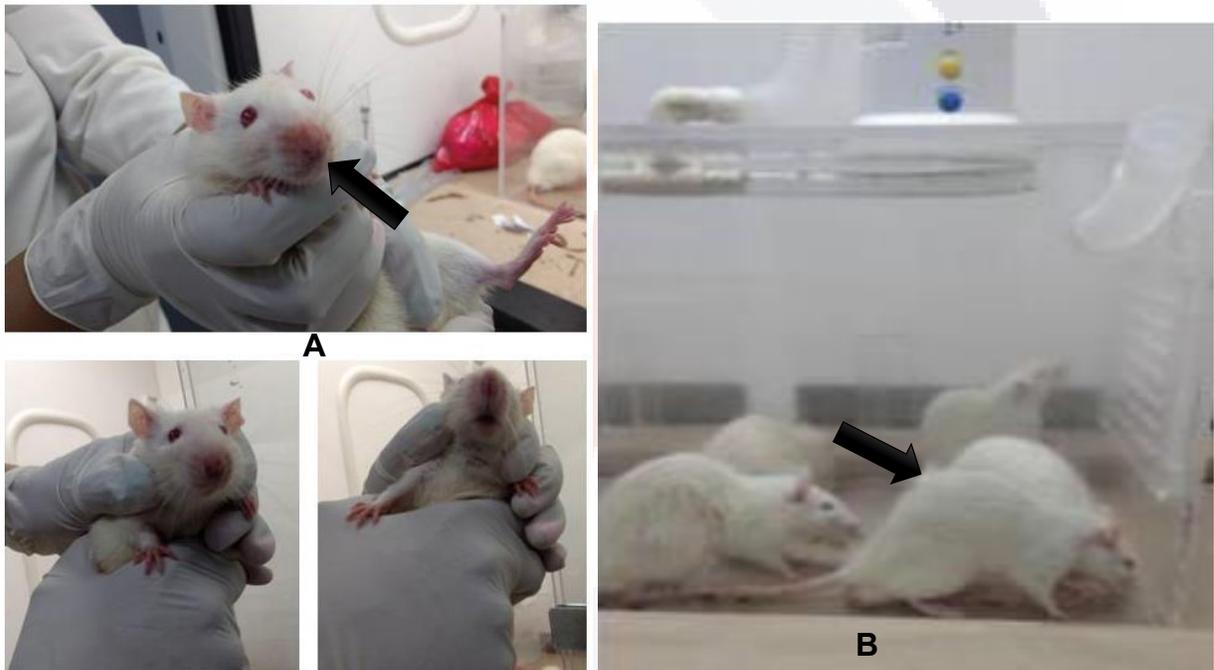


Figura 7. Signos clínicos de hipersensibilidad en animales expuestos. A Epistaxis. B Arcada y piloerección.

2. Estudio de Inmunolocalización

Los cortes correspondientes a los diferentes grupos de este estudio mostraron diferentes patrones de inmunopositividad en cuanto a localización e intensidad medida en unidades relativas de fluorescencia (URF) para los anticuerpos contra IL-4, IL-5 e IL-13.

2.1 Interleucina - 4

El grupo control presentó positividad en el citoplasma para el anticuerpo contra IL-4 (Figura 8). Se observó cambio en la distribución de la IL-4 en función al tiempo de exposición a la cipermetrina, con desplazamiento hacia matriz extracelular, en el tabique alveolar e incremento de la intensidad de fluorescencia (URF), habiendo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control con el grupo tratado 7 (Figura 9), 14 (Figura 10) y 21 días (Figura 11) respectivamente y el grupo tratado 14 días con el grupo tratado 21 días, con una $p < 0.0001$ (Figura 12).

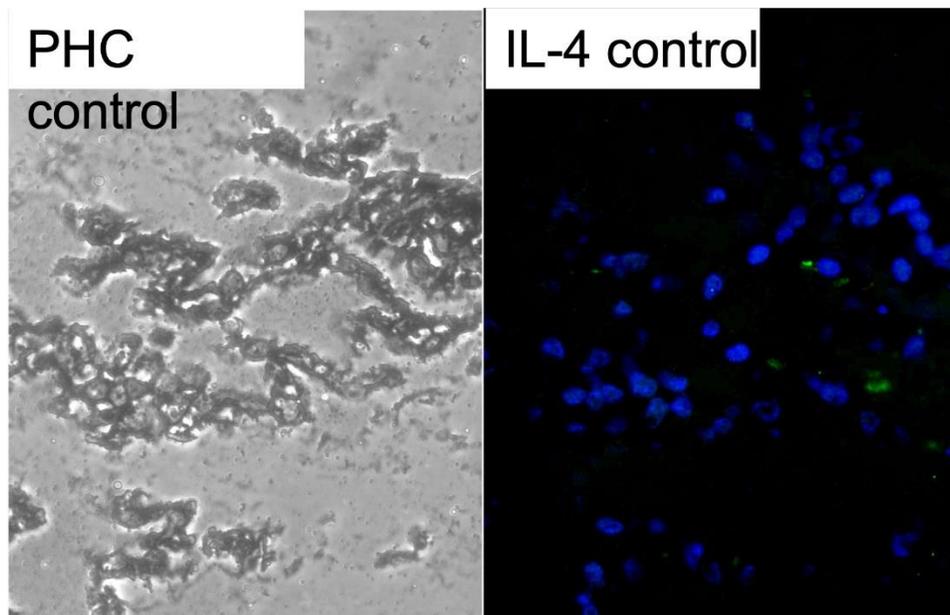


Figura 8. Microscopia confocal de contraste de fases e inmunolocalización por fluorescencia de IL-4 (Alexa Fluor 488). Grupo control.

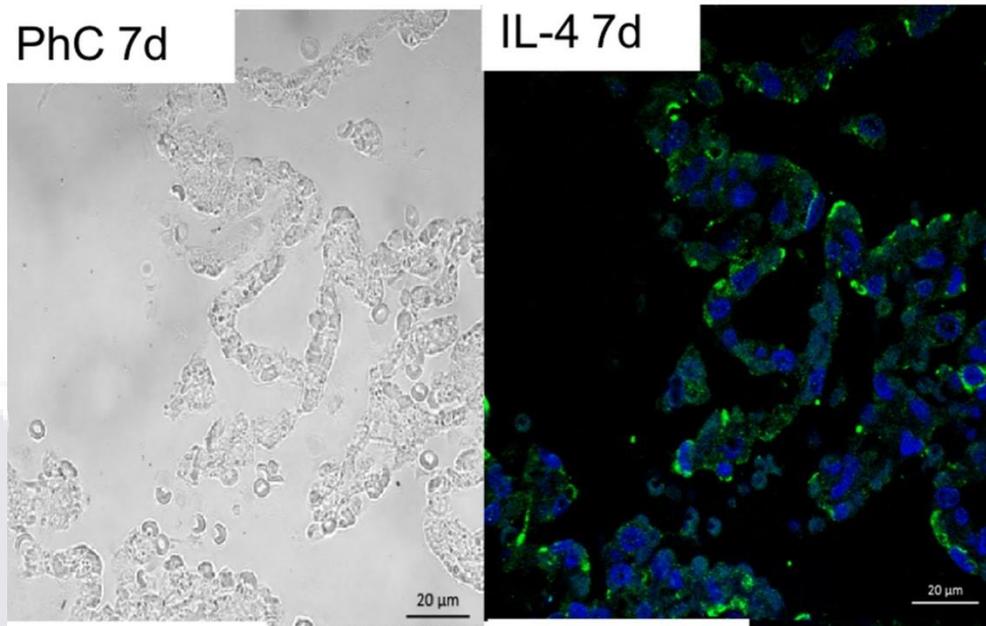


Figura 9. Microscopia confocal de contraste de fases e inmunolocalización por fluorescencia de IL-4 (Alexa Flúor 488). Grupo expuesto a cipermetrina vía inhalada por 7 días.

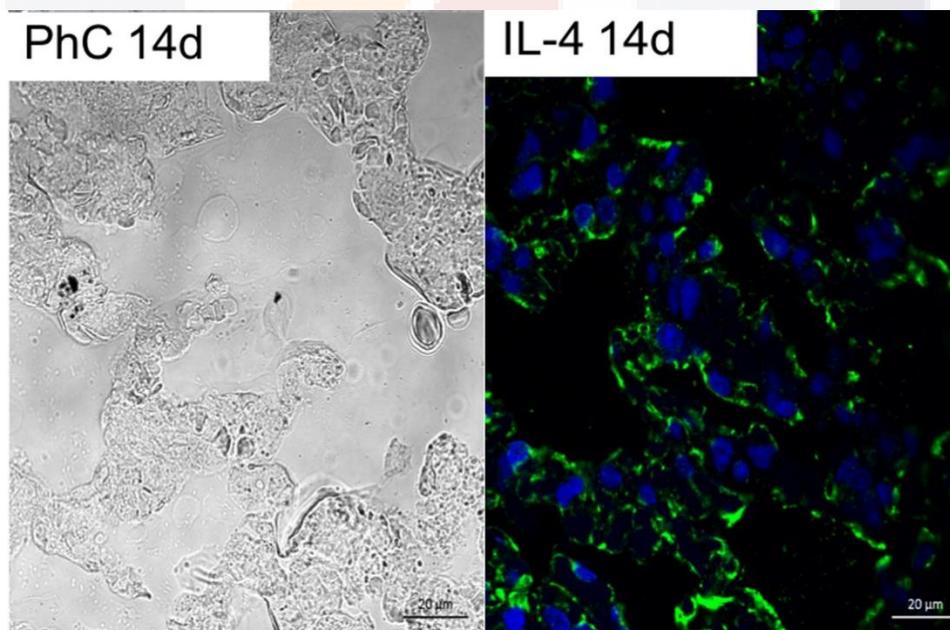


Figura 10. Microscopia confocal de contraste de fases e inmunolocalización por fluorescencia de IL-4 (Alexa Flúor 488). Grupo expuesto a cipermetrina vía inhalada por 14 días.

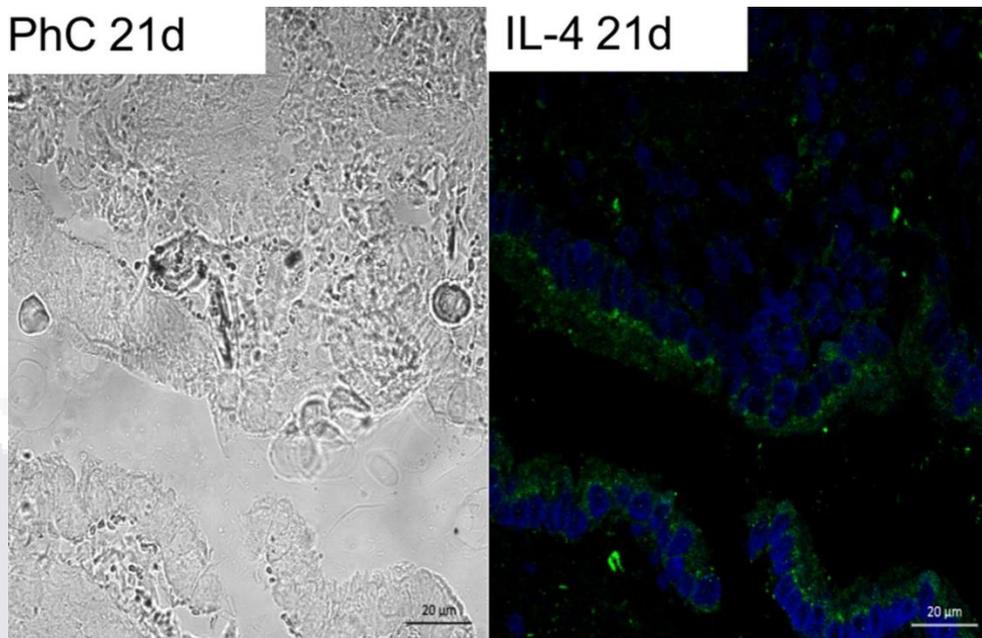


Figura 11. Microscopia confocal de contraste de fases e inmunolocalización por fluorescencia de IL-4 (Alexa Flúor 488). Grupo expuesto a cipermetrina vía inhalada por 21 días.

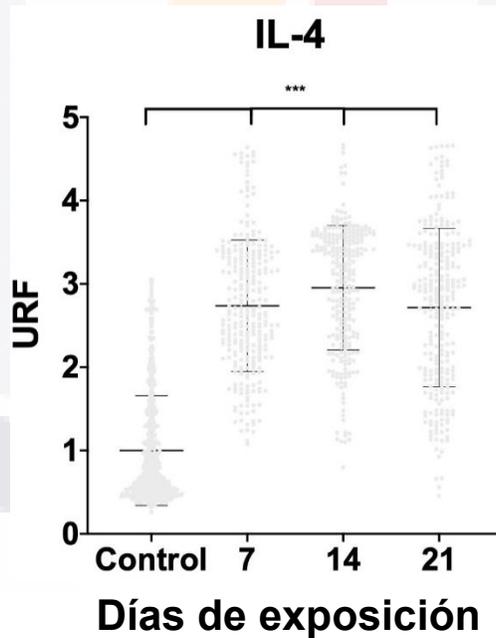


Figura 12. Unidades relativas de fluorescencia (URF) y días de exposición a cipermetrina en microscopia confocal e inmunolocalización por fluorescencia de IL-4 (Alexa Flúor 488). ANOVA de un solo factor para intensidad de fluorescencia ($p < 0.001$).

2.2 Interleucina - 5 e Interleucina - 13

Se reportan en el mismo apartado por el doble marcaje llevado a cabo. En el grupo control (Figura 13), se observa positividad localizada en las células del epitelio bronquiolar cuya intensidad aumenta con relación al tiempo de exposición y que persiste en localización epitelial y se confirma la participación de las IL-5 e IL-13 en la fase resolutive del daño (Figura 14, 15 y 16). Para la intensidad de fluorescencia de IL-5 se observan variaciones con diferencia estadísticamente significativa en unidades relativas de fluorescencia (URF) entre el grupo control con los grupos expuestos 7, 14 y 21 días respectivamente y de 7 con 14 días y 14 con 21 días con $p < 0.0001$ (Figura 17). La intensidad de fluorescencia en IL-13 representa diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control con 7, 14 y 21 días con $p < 0.0001$ (Figura 18).

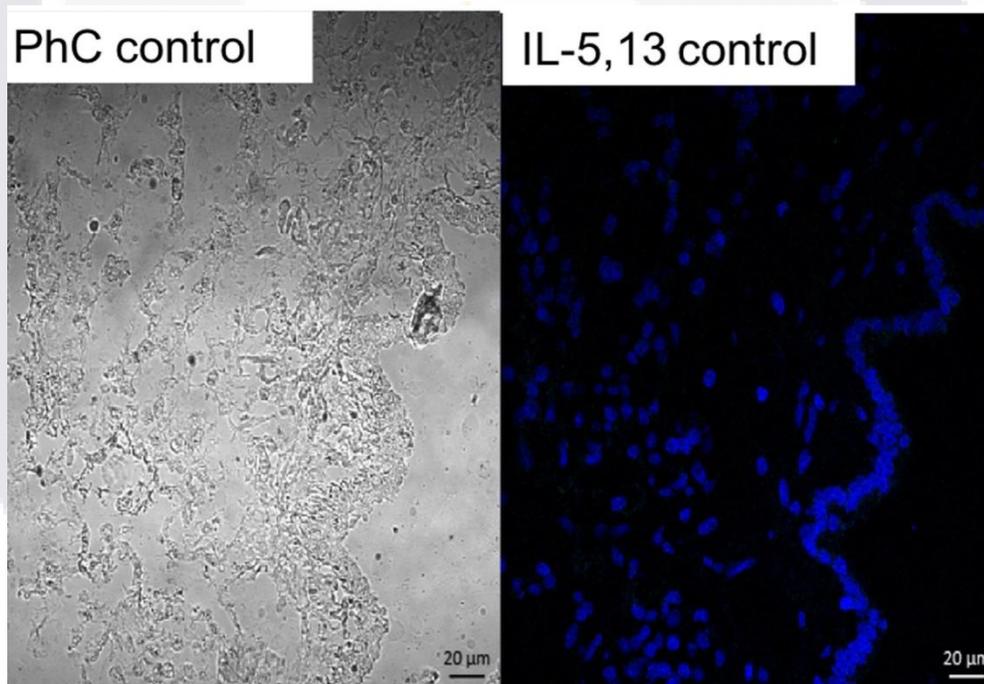


Figura 13. Microscopia confocal de contraste de fases y colocación de inmunofluorescencia de IL-5 (Alexa Fluor 488) e IL 13 (Alexa Fluor 594). Grupo control.

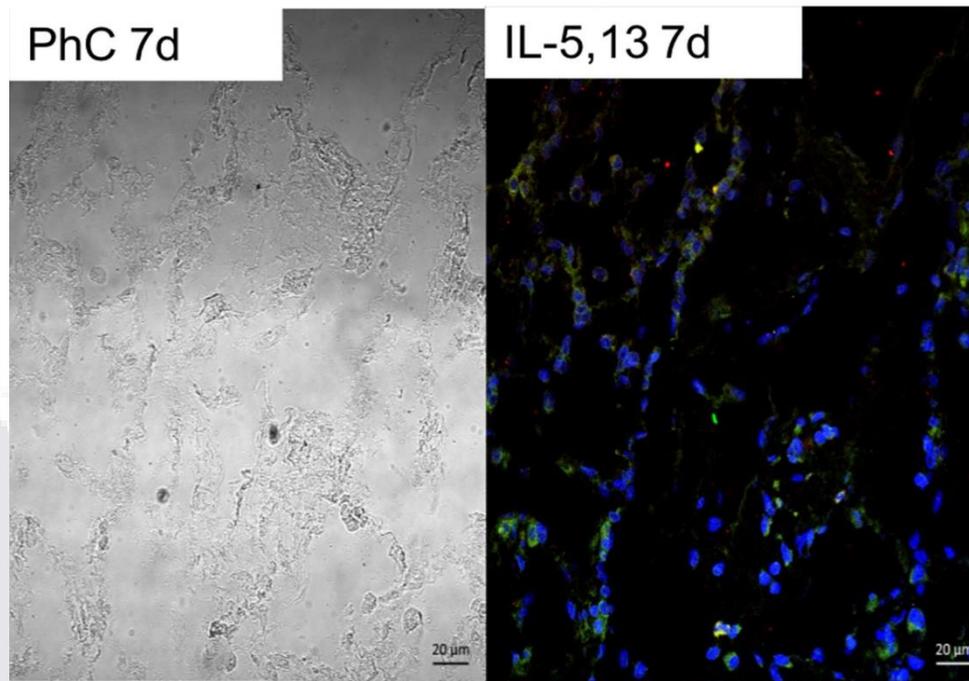


Figura 14. Microscopia confocal de contraste de fases y colocación de inmunofluorescencia de IL-5 (Alexa Flúor 488) e IL 13 (Alexa Flúor 594). Grupo expuesto a cipermetrina vía inhalada por 7 días.

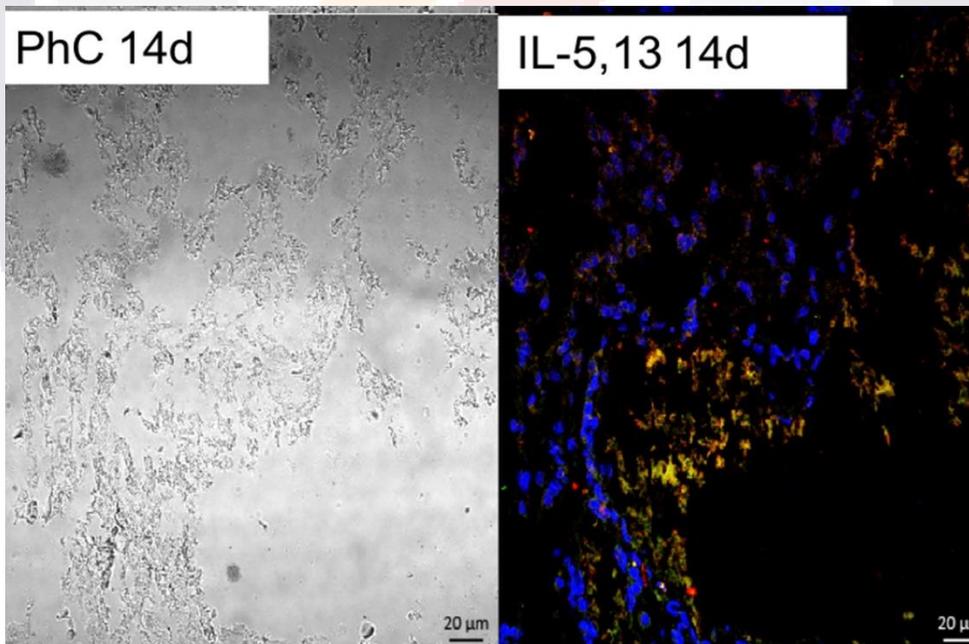


Figura 15. Microscopia confocal de contraste de fases y colocación de inmunofluorescencia de IL-5 (Alexa Flúor 488) e IL 13 (Alexa Flúor 594). Grupo expuesto a cipermetrina vía inhalada por 14 días.

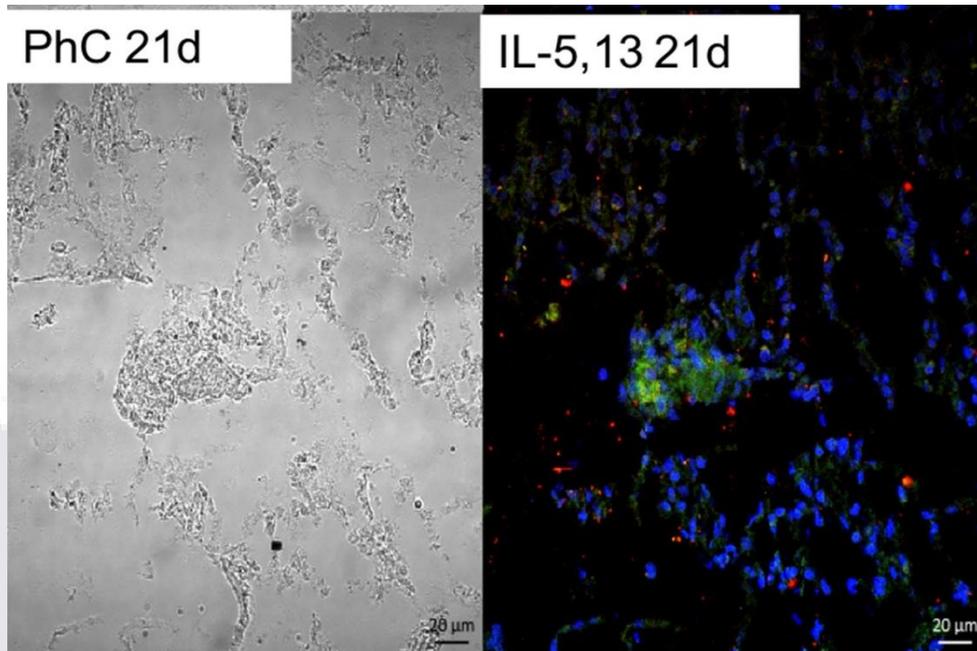


Figura 16. Microscopia confocal de contraste de fases y colocación de inmunofluorescencia de IL-5 (Alexa Flúor 488) e IL 13 (Alexa Flúor 594). Grupo expuesto a cipermetrina vía inhalada por 21 días.

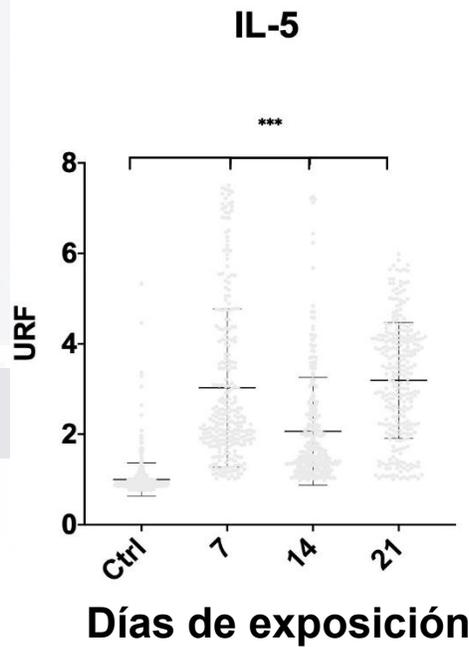


Figura 17. Unidades relativas de fluorescencia (URF) y días de exposición a cipermetrina en microscopia confocal de contraste de fases y colocación de inmunofluorescencia de IL-5 (Alexa Flúor 488) e IL 13 (Alexa Flúor 594). ANOVA de un solo factor para intensidad de fluorescencia de IL-5 ($p < 0.001$).

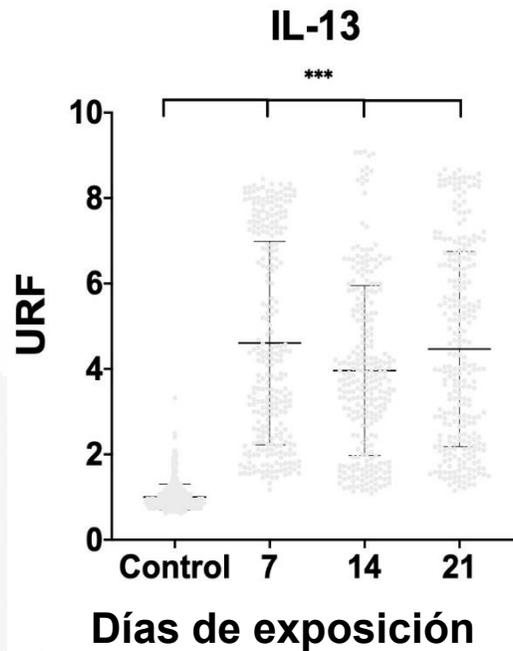


Figura 18. Unidades relativas de fluorescencia (URF) y días de exposición a cipermetrina en microscopia confocal de contraste de fases y colocalización de inmunofluorescencia de IL-5 (Alexa Flúor 488) e IL 13 (Alexa Flúor 594). ANOVA de un solo factor para intensidad de fluorescencia de IL-13 ($p < 0.001$).

3. Observaciones Histopatológicas y Morfometría

La estructura histológica del parénquima pulmonar de los animales mostró una evolución de daño con relación al tiempo de exposición.

3.1 Alteraciones histopatológicas en bronquiolo y alveolo

A la observación en microscopia óptica se encontró incremento del espesor del epitelio bronquiolar en los grupos de 7 días de exposición (Figura 20) y 14 días de exposición (Figura 21), y se muestra tendencia al estado basal en el grupo de 21 días de exposición (Figura 22) en comparación con el grupo control (Figura 19); al medirse por Morfometría confirma la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre los grupos (Figura 23). Por otro lado, se observó interrupción en la continuidad del epitelio bronquiolar en los grupos expuestos a cipermetrina vía inhalada por 7 días (Figura 24 B), 14 días (Figura 24 C) y 21 días (Figura 24 D); y no en el grupo control (Figura 24 A) siendo más evidente y estadísticamente significativa en el grupo de 21 días (Figura 24 D) con una $p < 0.0001$ (Figura 24 E). En cuanto al epitelio alveolar, se observó un incremento en el espesor del

tabique alveolar en los grupos de 7 días de exposición (Figura 25 B) y 14 días de exposición (Figura 25 C), tendiendo a recuperar el grosor presentado en el grupo control (Figura 25 A) hacia los 21 días de exposición (Figura 25 D) con una $p < 0.0001$ (Figura 25 E).

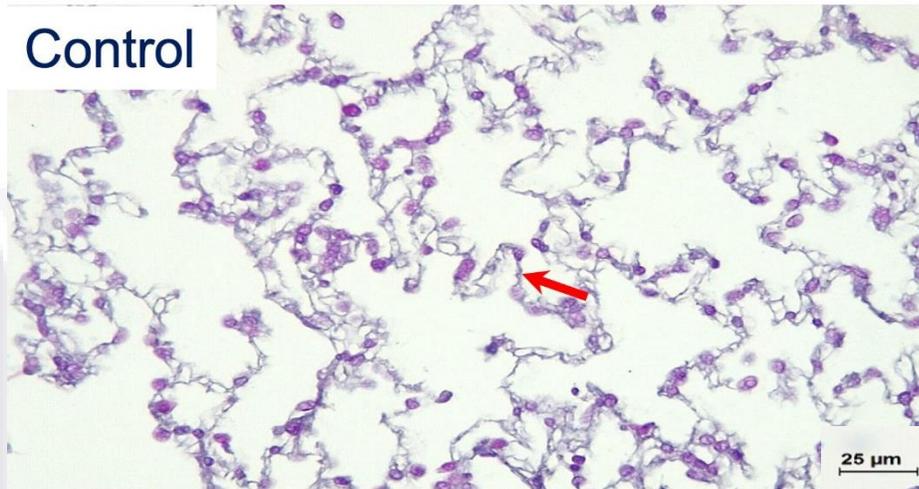


Figura 19. Microscopia óptica de parénquima pulmonar de rata Wistar. Flecha: Espesor del epitelio bronquiolar. Grupo control. Tinción H&E, 400 aumentos totales.

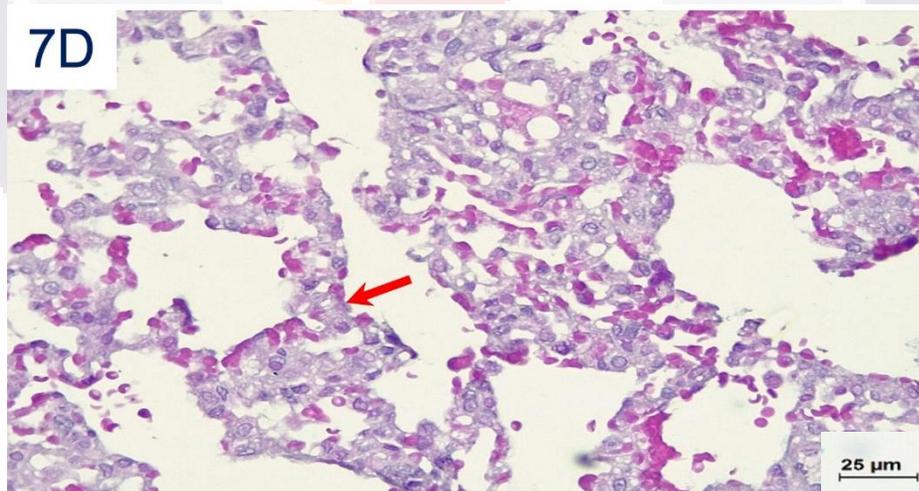


Figura 20. Microscopia óptica de parénquima pulmonar de rata Wistar expuesta a cipermetrina vía inhalada. Flecha: Espesor del epitelio bronquiolar. Grupo 7 días de exposición. Tinción H&E, 400 aumentos totales.

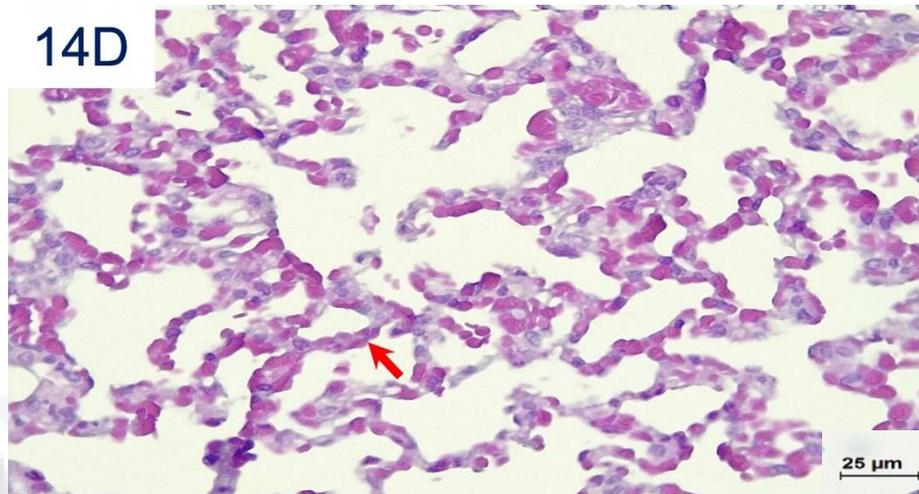


Figura 21. Microscopia óptica de parénquima pulmonar de rata Wistar expuesta a cipermetrina vía inhalada. Flecha: Espesor del epitelio bronquiolar. Grupo 14 días de exposición. Tinción H&E, 400 aumentos totales.



Figura 22. Microscopia óptica de parénquima pulmonar de rata Wistar expuesta a cipermetrina vía inhalada. Flecha: Espesor del epitelio bronquiolar. Grupo 21 días de exposición. Tinción H&E, 400 aumentos totales.

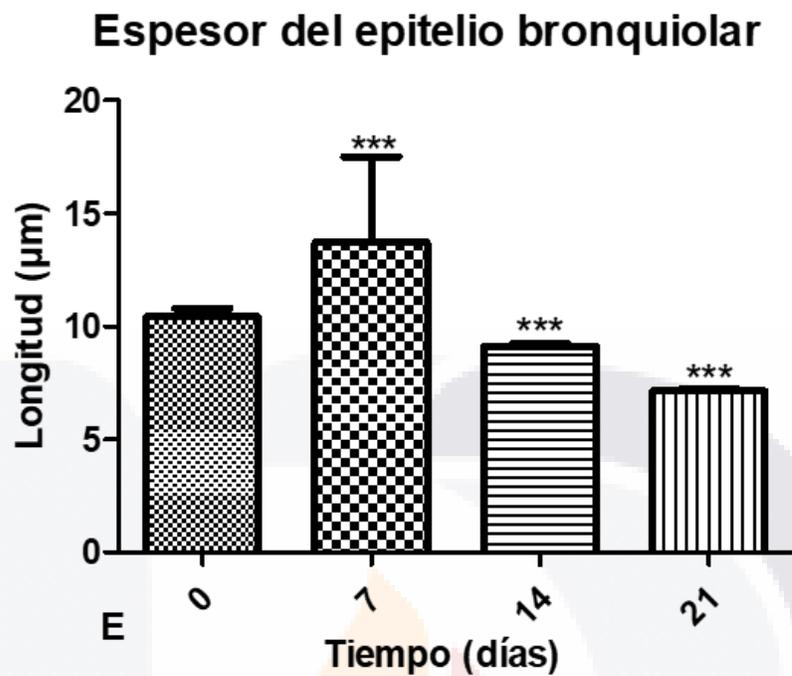


Figura 23. ANOVA de un solo factor para medición del espesor del epitelio bronquiolar en μm ($p < 0.0001$).

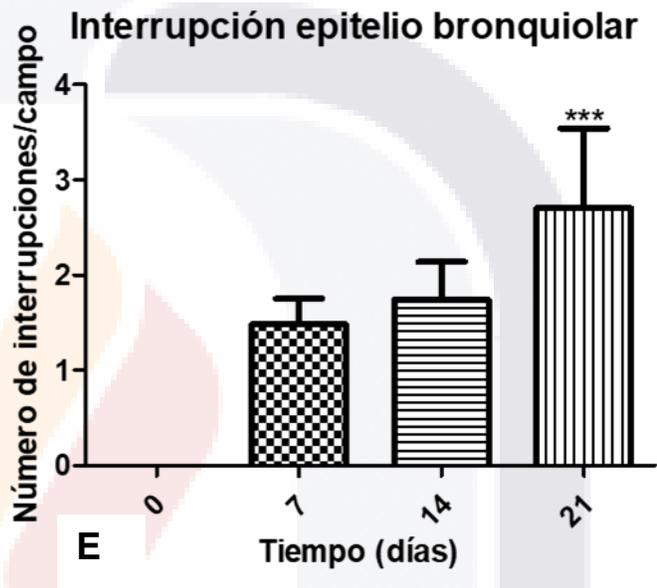
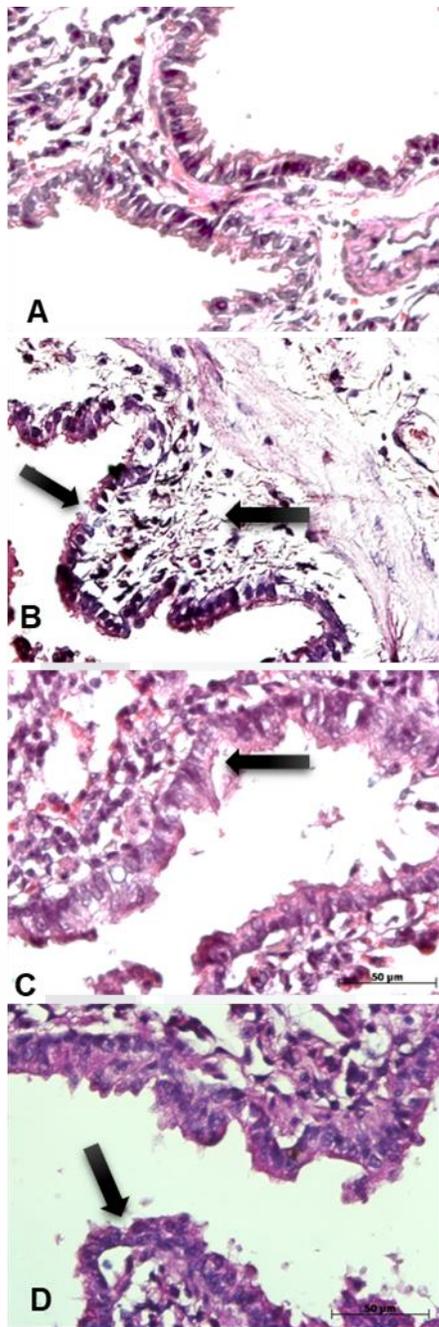


Figura 24. Microscopia óptica de parénquima pulmonar de rata Wistar. A Grupo control. B Grupo 7 días de exposición a cipermetrina vía inhalada. Flecha: Interrupción de epitelio bronquial. C Grupo 14 días de exposición a cipermetrina vía inhalada. Flecha: Interrupción de epitelio bronquial. D Grupo 21 días de exposición a cipermetrina vía inhalada. Flecha: Interrupción de epitelio bronquial. Tinción H&E, 400 aumentos totales. E ANOVA de un solo factor para cuantificación de interrupciones del epitelio bronquiolar por campo ($p < 0.0001$).

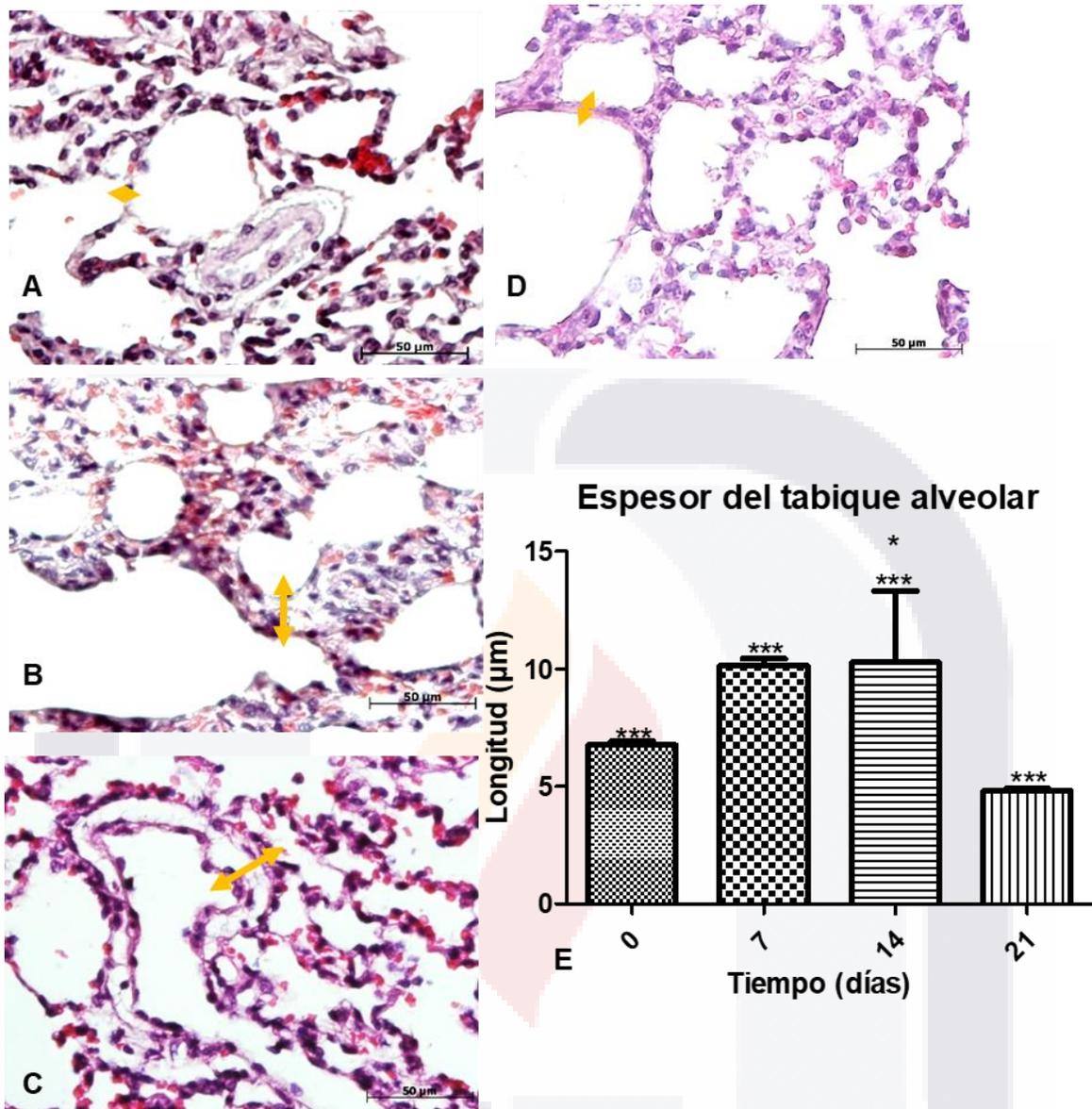


Figura 25. Microscopia óptica de parénquima pulmonar de rata Wistar. A Grupo control. Flecha: espesor del epitelio alveolar. B Grupo 7 días de exposición a cipermetrina vía inhalada. Flecha: Espesor del epitelio alveolar. C Grupo 14 días de exposición a cipermetrina vía inhalada. Flecha: Espesor del epitelio alveolar. D Grupo 21 días de exposición a cipermetrina vía inhalada. Flecha: Espesor del epitelio alveolar. Tinción H&E, 400 aumentos totales. E ANOVA de un solo factor para cuantificación de medición del espesor del epitelio alveolar ($p < 0.0001$).

3.2 Cuantificación de eosinófilos en tejido pulmonar

La cuantificación de eosinófilos mostró incremento significativo en tejido pulmonar, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre el grupo control (Figura 26) y el grupo de 7 días (Figura 26 B), de 14 días (Figura 26 C) y de 21 días (Figura 26 D) de exposición a cipermetrina vía inhalada; y del grupo tratado 7 días con el grupo tratado 21 días ($p < 0.0001$) (Figura 12, d).

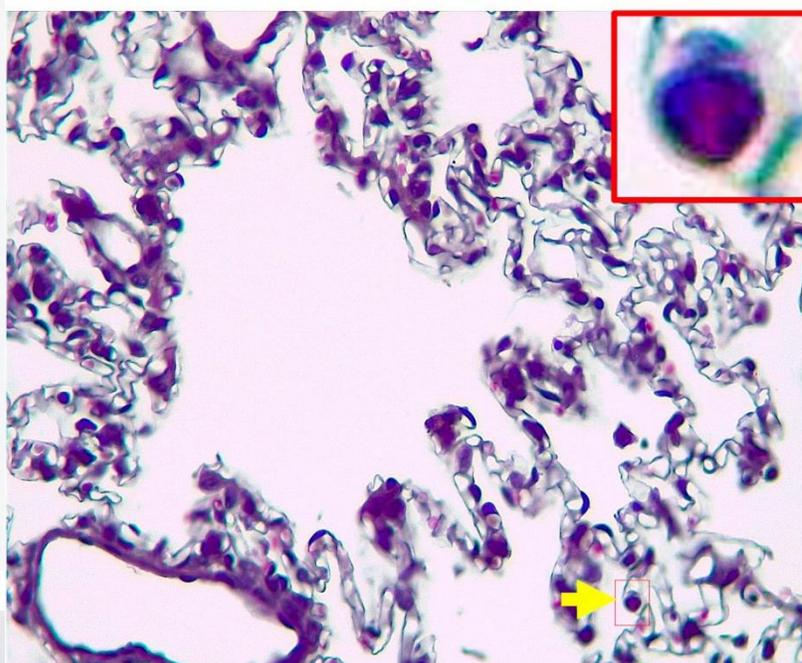


Figura 26. Microscopia óptica de pulmón de rata Wistar. Tinción Eritrosina B (Benitez, 1987). Flecha: Eosinófilos en tejido pulmonar Grupo control.

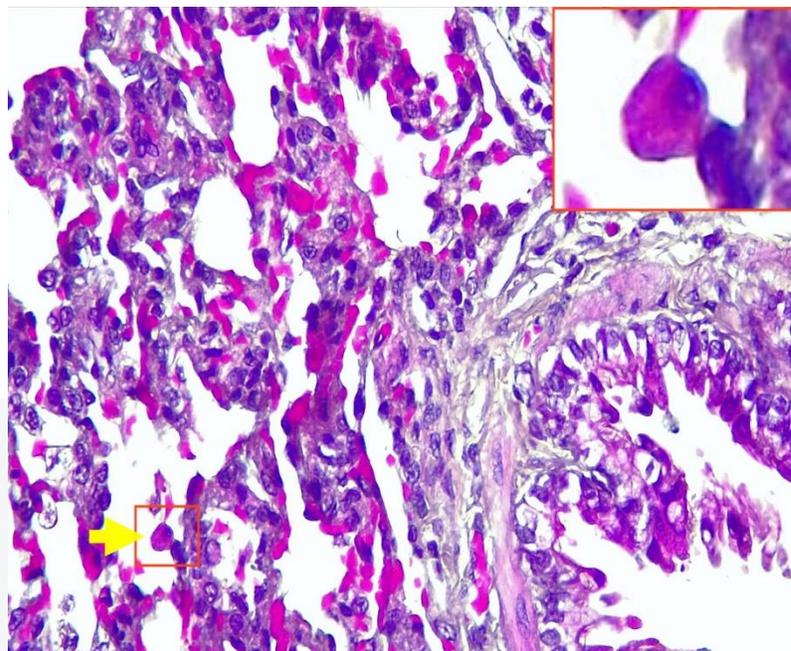


Figura 27. Microscopia óptica de pulmón de rata Wistar. Tinción Eritrosina B (Benitez, 1987). Flecha: Eosinófilos en tejido pulmonar expuesta a cipermetrina vía inhalada. Grupo 7 días de exposición.

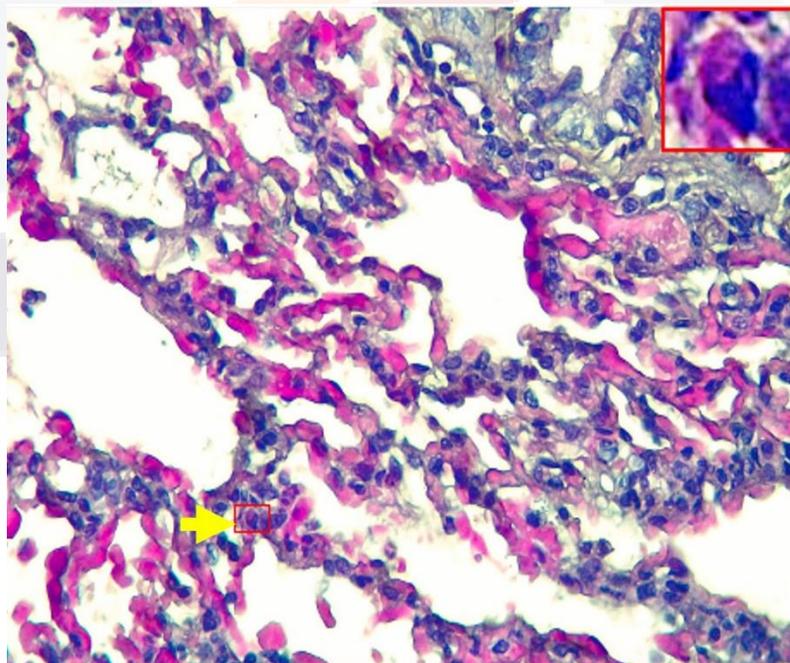


Figura 28. Microscopia óptica de pulmón de rata Wistar. Tinción Eritrosina B (Benitez, 1987). Flecha: Eosinófilos en tejido pulmonar expuesta a cipermetrina vía inhalada. Grupo 14 días de exposición.

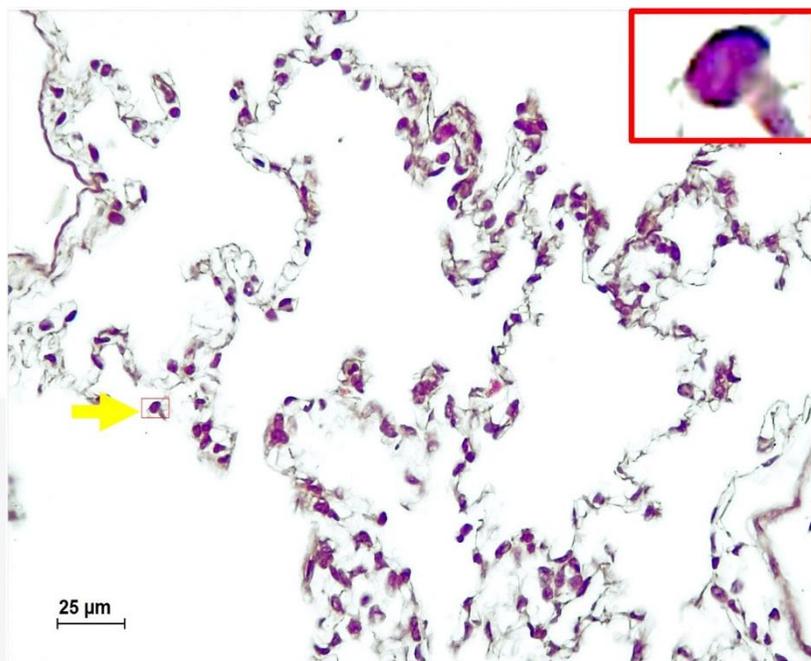


Figura 29. Microscopia óptica de pulmón de rata Wistar. Tinción Eritrosina B (Benitez, 1987). Flecha: Eosinófilos en tejido pulmonar expuesta a cipermetrina vía inhalada. Grupo 21 días de exposición.

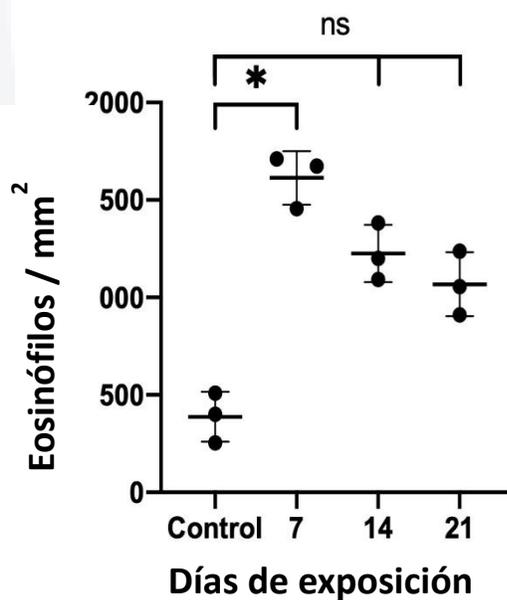


Figura 30. Prueba de Kruskal-Wallis para cuantificación de eosinófilos por campo ($p < 0.0001$).

4. IgE

Se observó incremento en la concentración sérica de IgE relacionada al tiempo de exposición y sólo se observó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo de 14 días de exposición a cipermetrina vía inhalada con $p < 0.05$ (Figura 31).

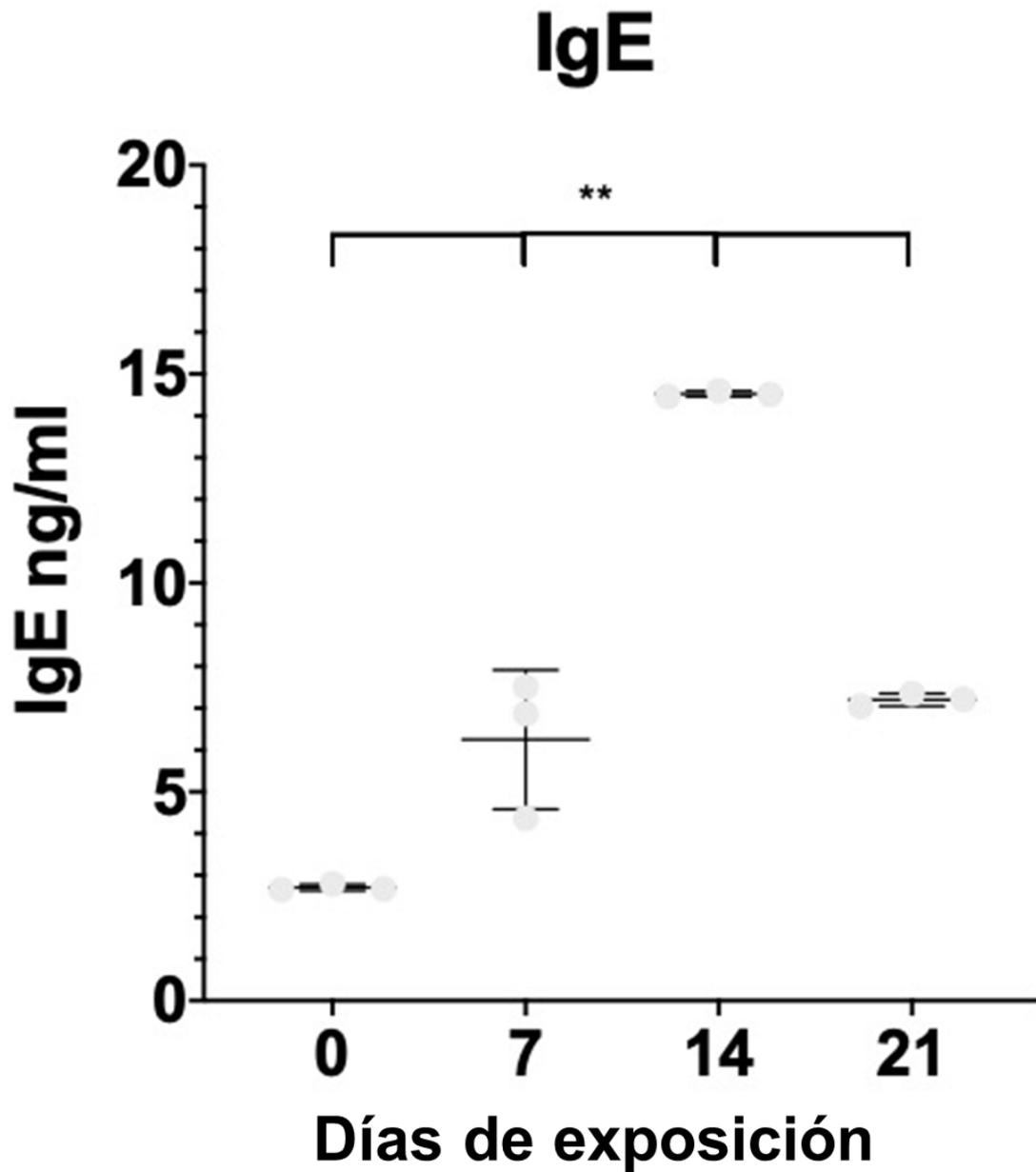


Figura 31. Concentración de IgE en suero por ELISA. Prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)

5. Extracción y determinación de concentración de cipermetrina en tejido por cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS)

No se detectó cipermetrina en muestras de suero en ninguno de los grupos por cromatografía de gases. En muestras de pulmón, no se detectó cipermetrina en el grupo de tiempo 0. En los grupos de 7, 14 y 21 días de exposición, se cuantificaron 9.125, 7.861 y 7.875 mg/Kg, respectivamente, observando una diferencia estadísticamente significativa con respecto al tiempo 0 ($p < 0.0001$) (Figura 32).

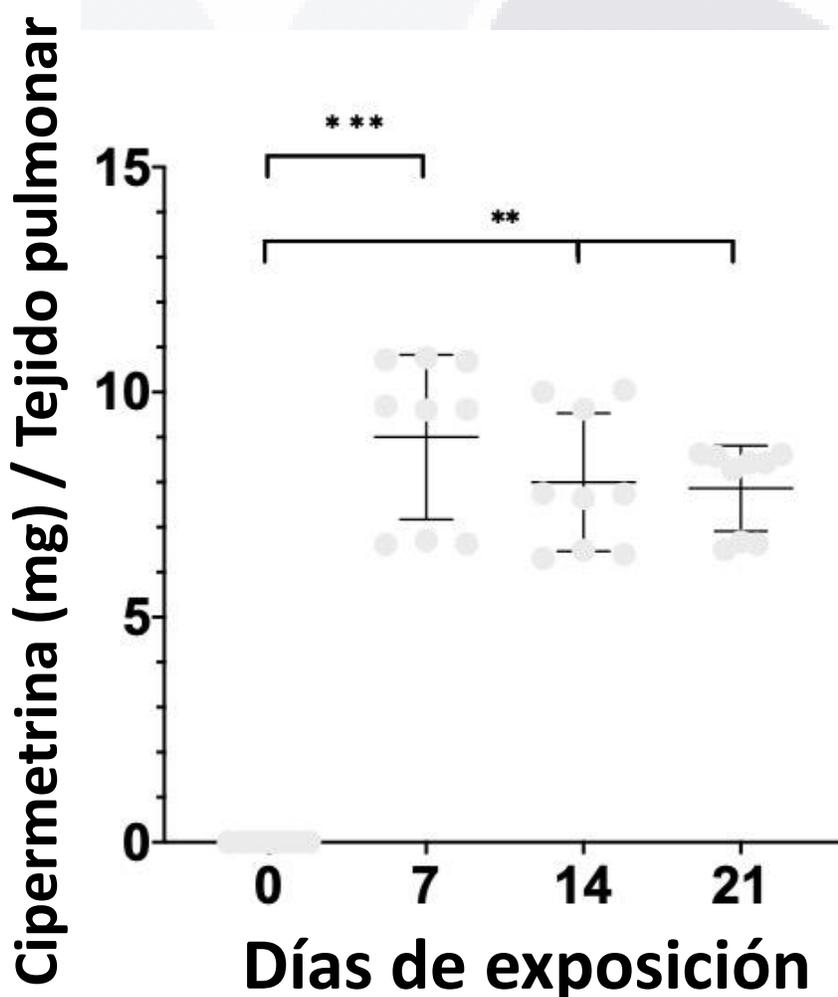


Figura 32. Concentración de cipermetrina en tejido pulmonar a los 0, 7, 14 y 21 días de exposición inhalada aumentando la concentración en tejido pulmonar ($p < 0.001$).

Discusión

La cipermetrina se ha convertido en uno de los plaguicidas con más acceso y uso en el área doméstica, reemplazando al carbamato y a los organofosforados que se consideran más tóxicos. Esto es debido a que la cipermetrina se ha descrito como una sustancia que presenta una fotoestabilidad, no persistencia en el medio ambiente y menor toxicidad para el uso humano, lo que la hace ampliamente aplicable (Cunha et al., 2020). Sin embargo, en otros mamíferos se ha reportado toxicidad de los piretroides provocando diferentes alteraciones en la esteroidogénesis en las enzimas 3β - y 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD); daños histológicos severos en varios órganos incluido el pulmón; y aumento de la actividad sérica al aplicar piretroides mixtos de cipermetrina en mezcla con otros piretroides incluso a dosis bajas. En otro trabajo, se reportó que la administración de cipermetrina en piretroides mixtos es capaz de producir cambios degenerativos epiteliales y alteraciones del estroma en la próstata de ratas (Ravula & Yenugu, 2019). En este proyecto reportamos que la cipermetrina administrada en vía inhalada a dosis bajas es capaz de causar respuesta inflamatoria tipo alergia, daños histológicos en el parénquima pulmonar, y alteraciones tanto en la expresión, como en la liberación de citocinas, del perfil TH2. Estos resultados aportan información que no se ha publicado en anteriores trabajos.

Existe evidencia experimental, que confirma el hecho de que los piretroides sintéticos son potentes neurotoxinas y actúan en múltiples objetivos dentro del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos (Husain et al., 1996). Nema y Bhargava (2018) reportaron que la cipermetrina a un nivel de 25 ppb inducía toxicidad conductual en peces cebra adultos. La actividad motora del grupo tratado se retrasó significativamente, y otro presentaron movimientos erráticos. Lo que afectó su comportamiento exploratorio general. Además, se han realizado investigaciones en los que se ha reportado que otros piretroides, son capaces de inducir un aumento notable en el peso del hipocampo y la región de la protuberancia de la médula, sin afectar el peso de la corteza frontal, cuerpo estriado, hipotálamo y cerebelo en ratas albinas macho adultas. Otra aportación de nuestro estudio es que se administró la cipermetrina por vía inhalada en modelo de exposición de cuerpo completo, simulando la vía en que se expone a los humanos, lo que se diferencia de estudios previos en los que se administra por vía oral (Husain et al., 1996) en la que se han demostrado cambios en el comportamiento de los ratones (Mitchell et al., 1998). A pesar de que se ha demostrado la neurotoxicidad de los piretroides, ninguno de nuestros animales presentó convulsiones,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

movimientos espontáneos o cambios conductuales durante el curso del experimento; es decir, no se presentaron señales de neurotoxicidad, lo que atribuimos a la concentración y forma de exposición de la cipermetrina en las ratas tomando en cuenta que en los trabajos anteriores, las concentraciones administradas de insecticida eran mayores y de forma oral, lo que puede explicar que no hayamos observado de forma clínica manifestaciones de neurotoxicidad.

Aerosol se define como la suspensión de partículas sólidas o líquidas en un medio gaseoso. La eficiencia de depósito pulmonar de un aerosol depende del diámetro de la partícula. En el caso de los aerosoles, las partículas se distribuyen de forma logarítmica normal formando una curva de distribución normal, relacionando el diámetro aerodinámico con la frecuencia de la masa de la partícula, cuyo punto más alto se define como el diámetro aerodinámico medio de la masa (DAMM), lo que significa que la mitad de las partículas serán de menor tamaño y la mitad de mayor tamaño. En este estudio, el dispositivo nebulizador producía partículas cuyo DAMM fue de 5 μm es decir que se tenían partículas de menor y mayor diámetro, lo que contribuye al mecanismo de intoxicación y cambios a nivel pulmonar. La manera en que las partículas suspendidas en un aerosol alcanzan las vías respiratorias depende del diámetro aerodinámico, cuando las partículas son mayores a 2 μm , pueden depositarse por impactación al entrar a la vía aérea, debido a la velocidad que adquieren al entrar al torrente respiratorio y cuando son menores se pueden depositar por sedimentación al retenerse alrededor del 15% en el volumen corriente inspirado, que se intercambia con el aire pulmonar residual en cada ciclo de respiración y permanece más tiempo en la vía aérea provocando depósito y difusión de las partículas en cada respiración. Ambos escenarios se cumplen en el modelo descrito en este estudio (Íñiguez, 2008).

Los Aero alérgenos son aerosoles que representan uno de los principales desencadenantes de reacciones irritativas, inflamatorias y alérgicas en tejido pulmonar. Su principal vía de entrada es la inhalación, de ahí la importancia de administrar la cipermetrina vía inhalada para reproducir su principal mecanismo de exposición. El epitelio respiratorio es la primera línea de defensa contra las partículas inhaladas que contienen los Aero alérgenos como una barrera estructural, pero también existe una interacción con los antígenos y componentes de las partículas inhaladas que desencadena una respuesta inmune innata proinflamatoria, seguida de la interacción con los antígenos inhalados y químicos en

patógenos, alérgenos y contaminantes (Gandhi & Vliagoftis, 2015). La irritación que presentaron los animales en el día 1 corresponde al contacto físico de la cipermetrina con la mucosa nasal y la epidermis que es diferente a la respuesta alérgica que se instaló y se observó. La anatomía de la rata difiere de la del humano; sin embargo, en el caso del sistema respiratorio, se encuentran semejanzas tanto en la estructura como en la función. La rata es productora de moco en el epitelio respiratorio desde la nariz que funciona para humedecer y calentar el aire inspirado igual que en el humano. La tráquea de la rata coincide con la anatomía del humano al presentar cartílagos en forma de "C" y se bifurca hacia los bronquios. En el pulmón de la rata se ha demostrado la presencia de anastomosis precapilares entre las arterias pulmonares y bronquiales al igual que en el humano. En el epitelio respiratorio se han descrito al menos 10 tipos de células diferentes en morfología, entre ellas una clase productora de un líquido viscoso peri ciliar, similar al moco del humano y producción de surfactante pulmonar (Kling, 2011). Estas características morfológicas se pudieron comprobar en nuestro estudio y justifican el uso del modelo en rata para el estudio del daño pulmonar secundario a exposición inhalada. Los signos asociados a daño respiratorio en la rata y que se presentaron en los animales de nuestro estudio incluyen escurrimiento nasal y ocular, "clic" audible a la inspiración, respiración oral (boca abierta) inclinación involuntaria de la cabeza y disnea. Su expresión depende de la severidad del daño. La vía respiratoria a nivel distal presenta bronquiolos terminales que desembocan en bronquiolos respiratorios origen de los conductos alveolares, responsables de llevar el aire a los sacos alveolares que son un conjunto de alveolos con luz en común llamada atrio, y al ser la estructura donde se realiza la hematosis, es susceptible de que, bajo la liberación de estímulos adecuados, se presente infiltrado inflamatorio. La población celular presente son los fibroblastos y macrófagos alveolares que protegen la región respiratoria de la contaminación por microorganismos y por partículas inhaladas. Los alvéolos conservan los mismos elementos estructurales que la mucosa: epitelio y tejido conectivo en el tabique alveolar; y por lo tanto su comportamiento semeja el de una mucosa. Las características inherentes de este tejido lo hacen vulnerable al daño por exposición. En el epitelio respiratorio, en especial al nivel de bronquiolos podemos encontrar células de Clara con forma cilíndrica o cuboide proyectadas hacia la luz bronquial en forma de cúpula abombada o en forma de domo; con microvellosidades, sin cilios. En su citoplasma hay un núcleo de localización basal y en la región apical gránulos de secreción, lo que refleja su función como célula secretora en esta porción del árbol bronquial. Normalmente, ante la exposición de

los pulmones a estímulos irritantes, alérgicos o infecciosos, se produce un incremento significativo al número de células productoras de mucina tanto en ratones como humanos, que es dependiente de la señalización por IL-13. Esta metaplasia mucosa, genera una célula diferenciada que ya no puede entrar al ciclo celular, lo que proporciona protección crítica a la vía respiratoria, pero lleva a pérdida del potencial de reparación (Reynolds & Malkinson, 2010). Las diversas funciones de las células de Clara en la homeostasis pulmonar incluyen el metabolismo xenobiótico, la regulación del sistema inmune y actividad celular progenitora. Se han identificado subpoblaciones de células de Clara que actúan como células madre, específicas del tejido bronquiolar (“tejido-específicas”), metabólicamente activa, con capacidad de reingresar al ciclo celular en respuesta a lesión en el epitelio bronquiolar. Existen dos poblaciones de células de Clara en el bronquiolo del adulto: aquellas que “nacieron” durante el desarrollo pulmonar, y las que resultaron de la proliferación y diferenciación posnatal. Las células de Clara, de forma individual, mantienen la capacidad de refinar su fenotipo en respuesta a alteraciones en el medio pulmonar, influencia micro ambiental a unidades tróficas específicas y exposición a agentes ambientales. En el ratón, las células de Clara responden a la inflamación alérgica, o a la IL-13 del perfil Th2, con lo que se ha sugerido su relación con el linaje de las células productoras de moco (Kuperman et al., 2002; Evans et al., 2004; Larson et al., 2004). Normalmente, ante la exposición de los pulmones a estímulos irritantes, alérgicos o infecciosos, se produce un incremento significativo al número de células productoras de mucina tanto en ratones como humanos, que es dependiente de la señalización por IL-13 y factor de crecimiento epidérmico, que induce la síntesis y acumulación de mucinas como Muc5ac, en el epitelio respiratorio. Esta metaplasia mucosa, genera una célula diferenciada que ya no puede entrar al ciclo celular: Catch-22, una célula productora de moco que proporciona protección crítica a la vía respiratoria y que lleva a pérdida del potencial de reparación en la enfermedad pulmonar crónica (Reynolds & Malkinson, 2010). La estructura histológica del pulmón de los animales de nuestro estudio mostró una evolución de daño en relación con el tiempo de exposición, desde la observación del epitelio cúbico, con revestimiento interno delgado de tejido conectivo, rodeado por una capa de músculo liso y tabiques alveolares íntegros en el grupo control hacia estadios o etapas de daño correspondientes con los cortes en el tiempo del estudio. A los 7 días, se empiezan a observar los cambios morfológicos: hiperplasia de células epiteliales y de músculo liso en bronquiolo, y en el alvéolo inicio de la fase aguda de daño o exudativa, con infiltrado de

neutrófilos y macrófagos, congestión por eritrocitos y edema a expensas de exudado. A los 14 días, se observa la metaplasia caliciforme en bronquiolo y daño manifestado por exfoliación de células epiteliales que tienden a formar conglomerados antes descritos como cuerpos de Creola; y en los alvéolos se observa la fase proliferativa de daño por el engrosamiento de las paredes alveolares, apariencia glandular, inicio de reclutamiento de neutrófilos y macrófagos. Finalmente, a los 21 días, hay una transición de la fase proliferativa aún con amplio infiltrado inflamatorio, pero con tendencia al retorno a la estructura normal (Crosby & Waters, 2010). Cabe mencionar que Ravula y Yenugu (2019) describen que en pulmones de ratas tratadas con dosis alta y dosis baja de plaguicidas piretroides mixtos, se observa hiperplasia severa del tejido linfoide peri-bronquiolar e inflamación peri-bronquiolar, inflamación, fibrosis y hemorragia alveolares. En nuestras observaciones estructurales, se pudo documentar la modificación en las variables cuantificadas por el estudio morfométrico. La variable longitud del epitelio bronquiolar se modificó incrementando hacia los 7 días de exposición y después disminuyó a los 14 y 21 días de tratamiento, y presentó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo expuesto 21 días con el control, 7 y 14 días. Las interrupciones del epitelio bronquiolar no se presentaron en el grupo control, y se fueron presentando en relación con el tiempo de exposición, siendo su mayor pico a los 21 días. La longitud del epitelio del tabique alveolar se comportó de manera similar a la del epitelio bronquiolar, incrementando hacia los 7 y 14 días con tendencia a la recuperación a los 21 días.

A pesar de que existen diferentes presentaciones de cipermetrina para uso doméstico, no se han estudiado lo suficiente sus efectos adversos en el tracto respiratorio. Los estudios reportados tienen que ver con exposición laboral o accidental, y coinciden con nuestros hallazgos, representados por manifestaciones clínicas de dificultad respiratoria, tos, congestión, irritación ocular y comezón al momento de la exposición. Al persistir la exposición hacia la cronicidad, se describe desarrollo de síndrome de distrés respiratorio (Lessenger, 1992).

Conclusiones

En rata Wistar expuesta a cipermetrina en un modelo de intoxicación crónica vía inhalada:

- Se presentó respuesta inflamatoria en pulmón.
- Se caracterizó la respuesta inflamatoria como tipo alergia.
- Se presentaron signos clínicos de hipersensibilidad con mayor severidad entre los 7 y 14 días de tratamiento.
- Se presentó expresión de las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 en pulmón en función del tiempo de exposición.
- Se observó incremento de 5 veces en la concentración de IgE sérica a los 14 días de tratamiento con respecto al control.
- Se presentó incremento en el número de eosinófilos en pulmón con respecto al control a los 21 días de tratamiento.
- No se detectó cipermetrina en suero.
- Se detectó cipermetrina en tejido pulmonar en mayor concentración a los 7 días de exposición.

Bibliografía

- Aldridge, W. N., Clothier, B., Forshaw, P., Johnson, M. K., Parker, V. H., Price, R. J., D.N. Skilleter, R.D. Verschoyle, & Stevens, C. (1978). The effect of DDT and the pyrethroids cismethrin and decamethrin on the acetyl choline and cyclic nucleotide content of rat brain. *Biochemical Pharmacology*, 27(12), 1703–1706.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(78\)90185-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(78)90185-5)
- AlKahtane, A. A., Alarifi, S., Al-Qahtani, A. A., Ali, D., Alomar, S. Y., Aleissia, M. S., & Alkahtani, S. (2018). Cytotoxicity and Genotoxicity of Cypermethrin in Hepatocarcinoma Cells: A Dose- and Time-Dependent Study. *Dose-Response*, 16(2), 155932581876088. <https://doi.org/10.1177/1559325818760880>
- Amweg, E. L., Weston, D. P., & Ureda, N. M. (2005). Use and toxicity of pyrethroid pesticides in the Central Valley, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(4), 966–972. <https://doi.org/10.1897/04-146r1.1>
- Benítez-Bribiesca, L., Pérez-Astudillo, L., & Freyre-Horta, R. (1987). Histochemical stain for major basic protein in eosinophil granulocytes and spermatozoa with alkaline erithrosin B. *PubMed*, 18(3), 213–218.
- Burright, D. (1988). *Methods #70s "Pyrethrum."* OSHA Analytical Laboratory. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://www.osha.gov/sites/default/files/methods/osha-70.pdf>
- Cage, S., Bradberry, S., Meacham, S., & Vale, J. (1998, January 28). *Cypermethrin (UK PID)*. [Www.inchem.org](http://www.inchem.org).
<http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid32.htm>
- Chen, T.-M. B., Malli, H., Maslove, D. M., Wang, H., & Kuschner, W. G. (2012). Toxic Inhalational Exposures. *Journal of Intensive Care Medicine*, 28(6), 323–333.
<https://doi.org/10.1177/0885066611432541>
- Choi, H., Moon, J. K., Liu, K. H., Park, H. W., Ihm, Y. B., Park, B. S., & Kim, J. H. (2006). Risk Assessment of Human Exposure to Cypermethrin During Treatment of Mandarin Fields. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50(3), 437–442. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-1050-3>
- CICOPLAFEST. (1991). *Catálogo oficial de plaguicidas 1991*. Comisión Intersecretarial Para El Control Del Proceso Y Uso De plaguicidas, Fertilizantes Y Sustancias Tóxicas. chrome-

extension://efaidnbmnnnibpccajpcglclefindmkaj/https://biblioteca.semarnat.gob.mx/j
 anium/Documentos/Ciga/agenda/PP03/catalogo.pdf

- Côté, J., Bonvalot, Y., Carrier, G., Lapointe, C., Fuhr, U., Tomalik-Scharte, D., Wachall, B., & Bouchard, M. (2014). A Novel Toxicokinetic Modeling of Cypermethrin and Permethrin and Their Metabolites in Humans for Dose Reconstruction from Biomarker Data. *PLoS ONE*, 9(2), e88517.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088517>
- Cowl, C. T. (2019). Assessment and treatment of acute toxic inhalations. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 25(2), 211–216.
<https://doi.org/10.1097/mcp.0000000000000560>
- Crawford, M. J., Croucher, A., & Hutson, D. H. (1981). The metabolism of the pyrethroid insecticide cypermethrin in rats; excreted metabolites. *Pesticide Science*, 12(4), 399–411. <https://doi.org/10.1002/ps.2780120406>
- Crosby, L. M., & Waters, C. M. (2010). Epithelial repair mechanisms in the lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 298(6), L715–L731.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00361.2009>
- Cunha, E. O., Reis, A. dos, Macedo, M. B., Machado, M. S., & Dallegrave, E. (2020). Ototoxicity of cypermethrin in Wistar rats. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 86(5), 587–592. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2019.02.007>
- Evans, C. M., Williams, O. W., Tuvim, M. J., Nigam, R., Mixides, G. P., Blackburn, M. R., DeMayo, F. J., Burns, A. R., Smith, C., Reynolds, S. D., Stripp, B. R., & Dickey, B. F. (2004). Mucin Is Produced by Clara Cells in the Proximal Airways of Antigen-Challenged Mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 31(4), 382–394. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2004-0060oc>
- Galea, K. S., Mair, C., Alexander, C., de Vocht, F., & van Tongeren, M. (2015). Occupational exposure to respirable dust, respirable crystalline silica and diesel engine exhaust emissions in the london tunnelling environment. *Annals of Occupational Hygiene*, 60(2), 263–269. <https://doi.org/10.1093/annhyg/mev067>
- Galli, S. J., Tsai, M., & Piliponsky, A. M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature*, 454(7203), 445–454. <https://doi.org/10.1038/nature07204>
- Gandhi, V. D., & Vliagoftis, H. (2015). Airway epithelium interactions with aeroallergens: Role of secreted cytokines and chemokines in innate immunity. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00147>

- González-Arias, C. A., Robledo-Marengo, L., Medina-Díaz, I. M., Velázquez-Fernández, J. B., Girón-Pérez, M. I., Quintanilla-Vega, B., Ostrosky-Wegman, P., Pérez-Herrera, N. E., & Rojas-García, A. E. (2010). Patrón de uso y venta de plaguicidas en Nayarit, México. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 26(3), 221–228.
- Hanukoglu, I., & Hanukoglu, A. (2016). Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure–function, tissue distribution, and associated inherited diseases. *Gene*, 579(2), 95–132. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.061>
- Heitzman, R. J. (n.d.). *Cypermethrin*. Wwww.fao.org. Retrieved January 31, 2024, from <http://www.fao.org/3/w4601e/w4601e07.htm#cypermethrin>
- Holtmann, H., & Resch, K. (1995). Cytokines. *Die Naturwissenschaften*, 82(4), 178–187. <https://doi.org/10.1007/bf01143192>
- Husain, R., Husain, R., Adhami, V. M., & Seth, P. K. (1996). Behavioral, neurochemical, and neuromorphological effects of deltamethrin in adult rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48(5), 515–516. <https://doi.org/10.1080/009841096161212>
- Hussien, H. M., Abdou, H. M., & Yousef, M. I. (2013). Cypermethrin induced damage in genomic DNA and histopathological changes in brain and haematotoxicity in rats: The protective effect of sesame oil. *Brain Research Bulletin*, 92(92), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.020>
- INEGI. (2015). *La industria química en México 2014. Serie estadísticas sectoriales*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (México). chrome-extension://efaidnbmnribpcajpcglclefindmkaj/http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/IQM/702825072490.pdf
- Iñiguez, F. (2008). Terapia inhalatoria en los pacientes con ventilación mecánica domiciliaria: Revisión. *Neumología Pediátrica*, 3, 87–99.
- Kaneko, H. (2011). Pyrethroids: Mammalian metabolism and toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2786–2791. <https://doi.org/10.1021/jf102567z>
- Kang, M.-J., Chang Min Yoon, Nam, M., Kim, D.-H., Choi, J.-M., Chun Geun Lee, & Elias, J. A. (2015). Role of Chitinase 3–Like-1 in Interleukin-18–Induced Pulmonary Type 1, Type 2, and Type 17 Inflammation; Alveolar Destruction; and Airway Fibrosis in

- the Murine Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 53(6), 863–871. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0366oc>
- Kinney, L. A., Chromey, N. C., & Kennedy Jr, G. L. (1989). Acute inhalation toxicity of ammonium perfluorononanoate. *Food and Chemical Toxicology*, 27(7), 465–468. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(89\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0278-6915(89)90033-1)
- Kishimoto, T., Taga, T., & Akira, S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell*, 76(2), 253–262. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90333-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90333-6)
- Kling, M. A. (2011). A Review of Respiratory System Anatomy, Physiology, and Disease in the Mouse, Rat, Hamster, and Gerbil. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 14(2), 287–337. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2011.03.007>
- Knaak, J. B., Dary, C. C., Zhang, X., Gerlach, R. W., Tornero-Velez, R., Chang, D. T., Goldsmith Rs, & Blancato, J. N. (2012). Parameters for pyrethroid insecticide QSAR and PBPK/PD models for human risk assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 219, 1–114. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3281-4_1
- Kotecha, S. (2000). Lung growth for beginners. *Paediatric Respiratory Reviews*, 1(4), 308–313. <https://doi.org/10.1053/prrv.2000.0069>
- Kuperman, D. A., Huang, X., Koth, L. L., Chang, G. H., Dolganov, G. M., Zhu, Z., Elias, J. A., Sheppard, D., & Erle, D. J. (2002). Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nature Medicine*, 8(8), 885–889. <https://doi.org/10.1038/nm734>
- Larson, S. D., Plopper, C. G., Baker, G., Tarkington, B. K., Decile, K. C., Pinkerton, K., Mansoor, J. K., Hyde, D. M., & Schelegle, E. S. (2004). Proximal airway mucous cells of ovalbumin-sensitized and -challenged Brown Norway rats accumulate the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(2), L286–L295. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00369.2003>
- Latuszyńska, J., Luty, S., Raszewski, G., Tokarska-Rodak, M., Przebirowska, D., Przyłepa, E., & Haratym-Maj, A. (2001). Neurotoxic effect of dermally-applied chlorpyrifos and cypermethrin in Wistar rats. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 8(2), 163–170.
- Lessenger, J. E. (1992). Five office workers inadvertently exposed to cypermethrin. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 35(4), 261–267.

<https://doi.org/10.1080/15287399209531616>

- Lewerenz, H. J. (1990). Cypermethrin (Environmental Health Criteria 82). 154 Seiten, 16 Tab. World Health Organization, Geneva 1989. *Food / Nahrung*, 34(3), 299–299. <https://doi.org/10.1002/food.19900340333>
- Li, X.-M., Serebrisky, D., Lee, S.-Y., Huang, C.-K., Bardina, L., Schofield, B. H., Stanley, J. Steven., Burks, A. Wesley., Bannon, G. A., & Sampson, H. A. (2000). A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(1), 150–158. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.107395>
- Licona-Limón, P., Kim, L. K., Palm, N. W., & Flavell, R. A. (2013). TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nature Immunology*, 14(6), 536–542. <https://doi.org/10.1038/ni.2617>
- Luty, S., Latuszynska, J., Obuchowska-Przebirowska, D., Tokarska, M., & Haratym-Maj, A. (2000). Subacute toxicity of orally applied alpha-cypermethrin in Swiss mice. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 7(1), 33–41. https://www.researchgate.net/publication/12454044_Subacute_toxicity_of_orally_applied_alpha-cypermethrin_in_Swiss_mice
- Mitchell, J. A., Wilson, M. C., & Kallman, M. J. (1988). Behavioral effects of Pydrin and Ambush in male mice. *Neurotoxicology and Teratology*, 10(2), 113–119. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(88\)90074-8](https://doi.org/10.1016/0892-0362(88)90074-8)
- Montero-Vega, M. T. (2006). Marcadores de inflamación en la enfermedad alérgica. *Allergologia et Immunopathologia*, 34(Supl I), 7–11.
- Morgan, M. K., MacMillan, D. K., Zehr, D., & Sobus, J. R. (2016). Pyrethroid insecticides and their environmental degradates in repeated duplicate-diet solid food samples of 50 adults. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 28(1), 40–45. <https://doi.org/10.1038/jes.2016.69>
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 157–177. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>
- Nakayama, T., Hirahara, K., Onodera, A., Endo, Y., Hosokawa, H., Shinoda, K., Tumes, D. J., & Okamoto, Y. (2017). Th2 Cells in Health and Disease. *Annual Review of Immunology*, 35, 53–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052350>
- Navas, M. C., Rodríguez, E., Gabriela, A., Mora, W. M., Coto-Chinchilla, K., Gamboa, L.,

- Gutiérrez-Porras, M., Jiménez-Delgado, J., Leitón-Villagra, C., Rojas, J. M., Rubi-Carvajal, C., Ricardo, F., Aguilar-Delgado, N., Penón-Portmann, M., Morales-Calderón, C., & Vargas-Sanabria, M. (2010). Embriología del desarrollo de los bronquios y el parénquima pulmonar. *Medicina Legal de Costa Rica*, 27(1), 61–74.
- Nema, S., & Bhargava, Y. (2018). Quantitative assessment of cypermethrin induced behavioural and biochemical anomalies in adult zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, 68, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.05.003>
- Netter, F. H. (2019). *Atlas of Human Anatomy* (7th ed.). Elsevier.
- Nishi, K., Huang, H., Kamita, S. G., Kim, I.-H., Morisseau, C., & Hammock, B. D. (2006). Characterization of pyrethroid hydrolysis by the human liver carboxylesterases hCE-1 and hCE-2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445(1), 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.11.005>
- Norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, (2001). <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-062-zoo-1999>
- O’Neil, M. J. (2007). The Merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. *Choice Reviews Online*, 44(10), 464. <https://doi.org/10.5860/choice.44-5373>
- Oppenheim, J. J. (2001). Cytokines: Past, Present, and Future. *International Journal of Hematology*, 74(1), 3–8. <https://doi.org/10.1007/bf02982543>
- Pauluhn, J. (1996). Risk assessment of pyrethroids following indoor use. *Toxicology Letters*, 88(1-3), 339–348. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(96\)03759-9](https://doi.org/10.1016/0378-4274(96)03759-9)
- Pauluhn, J. (1999). Hazard identification and risk assessment of pyrethroids in the indoor environment. *Toxicology Letters*, 107(1-3), 193–199. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(99\)00047-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(99)00047-8)
- Pauluhn, J. (2018). Upper respiratory tract nociceptor stimulation and stress response following acute and repeated Cyfluthrin inhalation in normal and pregnant rats: Physiological rat-specific adaptations can easily be misunderstood as adversities. *Toxicology Letters*, 282, 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.10.003>
- Phalen, R. F., Mannix, R. C., & Drew, R. E. (1984). Inhalation exposure methodology. *Environmental Health Perspectives*, 56, 23–34. <https://doi.org/10.1289/ehp.845623>
- Prophet, E. B., & Armed Forces Institute of Pathology U.S. (1992). *Laboratory Methods in Histotechnology* (pp. 29–31). Amer Registry of Pathology.

- Raszewski, G., Lemieszek, M., & Łukawski, K. (2015). Cytotoxicity induced by cypermethrin in Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(1), 106–110.
<https://doi.org/10.5604/12321966.1196863>
- Ravula, A. R., & Yenugu, S. (2019). Long term oral administration of a mixture of pyrethroids affects reproductive function in rats. *Reproductive Toxicology*, 89, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.06.007>
- Reynolds, S. D., & Malkinson, A. M. (2010). Clara cell: Progenitor for the bronchiolar epithelium. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.09.002>
- Rokicki, W., Rokicki, M., Wojtacha, J., & Dżeljiłi, A. (2016). The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases. *Polish Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 13(1), 26–30.
<https://doi.org/10.5114/kitp.2016.58961>
- Sánchez, T., & Concha, I. (2018). Estructura y funciones del sistema respiratorio. *Neumología Pediátrica*, 13(3), 101–106. <https://doi.org/10.51451/np.v13i3.212>
- SEMARNAT. (2016). Indicadores Básicos del Desempeño Ambiental. Consumo de Plaguicidas por tipo de producto. México. In https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/indicadores16/conjuntob/indicador/02_agua/2_2_5.html.
- Sepúlveda-Saavedra, J., & Soto-Domínguez, A. (2012). *Sistema respiratorio | Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular, 2e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical*. [Accessmedicina.mhmedical.com](https://accessmedicina.mhmedical.com).
<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1506§ionid=98183423>
- Skolarczyk, J., Pekar, J., & Nieradko-Iwanicka, B. (2017). Immune disorders induced by exposure to pyrethroid insecticides. *Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej*, 71(1). <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.3827>
- Sparks, T. C., Storer, N., Porter, A., Slater, R., & Nauen, R. (2021). Insecticide resistance management and industry: The origins and evolution of the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) and the mode of action classification scheme. *Pest Management Science*, 77(6). <https://doi.org/10.1002/ps.6254>
- Standing Committee on Biocidal Products. (2012). *Cypermethrin cis:trans/40:60 product*

type 8 assessment report. [https://circabc.europa.eu/sd/a/2a9e841c-ed61-4922-93fc-](https://circabc.europa.eu/sd/a/2a9e841c-ed61-4922-93fc-8b2d61742a2/Cypermethrin%20(assessment%20report%20as%20finalised%20on%2012.07.13).pdf)

[8b2d61742a2/Cypermethrin%20\(assessment%20report%20as%20finalised%20on%2012.07.13\).pdf](https://circabc.europa.eu/sd/a/2a9e841c-ed61-4922-93fc-8b2d61742a2/Cypermethrin%20(assessment%20report%20as%20finalised%20on%2012.07.13).pdf)

- Tomlin, C. D. S. (1997). *The pesticide manual: A world compendium* (11th ed.). British Crop Protection Council.
- Ullah, S., Zuberi, A., Alagawany, M., Farag, M. R., Dadar, M., Karthik, K., Tiwari, R., Dhama, K., & Iqbal, H. M. N. (2018). Cypermethrin induced toxicities in fish and adverse health outcomes: Its prevention and control measure adaptation. *Journal of Environmental Management*, 206, 863–871. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.076>
- Wang, C., Yang, Y., Wu, N., Gao, M., & Tan, Y. (2019). Combined toxicity of pyrethroid insecticides and heavy metals: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 17(4), 1693–1706. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00905-w>
- White, S. R., Martin, L. D., Stern, R., Laxman, B., & Marroquin, B. A. (2010). Expression of IL-4/IL-13 receptors in differentiating human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 299(5), L681–L693. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00422.2009>
- Wong, B. A. (2007). Inhalation exposure systems: Design, methods and operation. *Toxicologic Pathology*, 35(1), 3–14. <https://doi.org/10.1080/01926230601060017>
- Yadav, B. (2018). Cypermethrin Toxicity: A Review. *Journal of Forensic Sciences & Criminal Investigation*, 9(4). <https://doi.org/10.19080/jfsci.2018.09.555767>
- Zhou, Y., Huang, H., Zhou, J., & Wang, L. (2018). Beta-cypermethrin exposure affects female reproduction by enhancing oxidative stress in mice uterine tissue. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 98, 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.08.011>