



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

TÍTULO

**“Estudio de la toxicidad aguda del POLI-1 sobre hígado,
riñón y sistema inmune”**

PRESENTA: L. A. Q. B. María Cruz Reyes Echeverría

Que para obtener el grado de Maestría en Ciencias en el área de Toxicología.

ASESORES: Dr. Andrés Quintanar Stephano (responsable)

Dra. Eva María Salinas Miralles

Dr. José Luis Quintanar Stephano

Aguascalientes, Mayo del 2009.

Dr. Francisco Javier Álvarez Rodríguez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Presente

Los abajo firmantes, miembros del Comité Tutorial de la alumna María Cruz Reyes Echeverría, estudiante de la Maestría en Ciencias en el Área de Toxicología, le comunicamos que hemos revisado y aprobado el contenido de la tesis "Estudio de la Toxicidad aguda del POLI-1 sobre hígado, riñón y sistema inmune" misma que defenderá en el examen de titulación correspondiente.

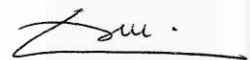
Lo anterior es para que continúen los trámites administrativos correspondientes y se le asigne la fecha del examen de grado.

Agradeciendo de antemano las atenciones prestadas a la presente, quedamos de usted.

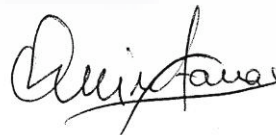
Atentamente
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags., a 22 de mayo del 2009.



José Luis Quintanar Stephano
Miembro del Comité Tutorial



Eva Maria Salinas Miralles
Miembro del Comité Tutorial



Andrés Quintanar Stephano
Tutor responsable



Centro de Ciencias Básicas

**L.A.Q.B. MARÍA CRUZ REYES ECHAVERRÍA
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA
TOXICOLOGÍA,
P R E S E N T E .**

Estimado (a) Sr. (ta): Reyes:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis titulada **“Estudio de la Toxicidad aguda del POLI-1 sobre hígado, riñón y sistema inmune”**, de acuerdo con su contenido y para dar cumplimiento a los establecido en el Artículo 162 (Fracciones I, II y III) y Artículo 175 (Fracciones I y II) del Reglamento de docencia de la U.A.A., me permito comunicarle que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 22 de mayo de 2009
“SE LUMEN PROFERRE”
EL DECANO

DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ



c. c. p.- Archivo

FJAR,mjda

AGRADECIMIENTOS

En la preparación de esta tesis recibí ayuda y aliento de muchas persona. Hay una enorme lista de amigos y académicos de los cuales recibí importantes aportaciones. Sin embargo, el primer crédito se lo otorgo al sistema nacional de becas del CONACYT que contribuyó en el seguimiento de mis estudios.

Agradezco a mis tutores, los doctores Andrés Quintanar Stephano, José Luis Quintanar Stephano y Eva María Salinas Miralles, de quienes recibí críticas constructivas y al mismo tiempo compartieron sus conocimientos.

De manera especial agradezco a mi familia quien siempre está conmigo.

RESUMEN

El uso de fármacos con potencial uso terapéutico, tiene como prerrequisito saber si la sustancia de interés posee los efectos farmacológicos esperados y conocer sus efectos tóxicos sobre los diversos tejidos y sistemas corporales. Así, en el estudio de cualquier xenobiótico es importante conocer los sitios y los mecanismos de acción a través de los cuales estas sustancias ejercen sus diversos efectos biológicos. Los efectos de la hormona vasopresina (AVP) sobre sus células y tejidos blanco son mediados por al menos 3 tipos de receptores (V_{1a} , V_{1b} y V_2), localizados en la membrana celular de diversos tejidos corporales, entre los que destacan, para fines de nuestro estudio, los túbulos renales, algunas células del sistema inmune y los hepatocitos. Basados en estudios de anclaje (*docking*) se han sintetizado varios compuestos con posible efecto bloqueador de los receptores de la AVP entre los que se encuentra el (3a-Acetoxi-5H-pirrol(1,2-a) (3,1)benzoxazin-1,5-(3aH)-diona (POLI-1). Este compuesto, es capaz de disminuir los signos clínicos de la encefalomiелitis experimental autoinmune (EEA), posiblemente a través del bloqueo de los receptores de AVP localizados en las células del sistema inmune. Dado el potencial terapéutico del POLI-1, es de gran importancia conocer sus posibles efectos tóxicos, sobre todo en aquellos tejidos que se sabe poseen receptores de AVP. **OBJETIVO.** Estudiar los efectos tóxicos agudos del POLI-1 sobre el hígado, riñón y sistema inmune. **MATERIAL Y MÉTODOS.** Se utilizaron ratas machos de la cepa Lewis. Los animales se dividieron en los siguientes grupos: 1) CONTROL INTACTO, 2) Dimetilsulfóxido (DMSO) 100 μ l/ vía intramuscular (I.M.), los grupos 3), 4) y 5) recibieron una sola dosis de POLI-1 de 4, 8 y 16 mg/kg de P.C./I.M. respectivamente. Cada grupo se dividió en dos subgrupos de 6 animales cada uno. Cada grupo fue su propio control al tomarse las muestras basales 24 horas antes de la administración de las sustancias de estudio. Todos los animales fueron sacrificados a las 24 horas de las inyecciones correspondientes. De cada grupo, al primer subgrupo se realizaron las pruebas bioquímicas: transaminasa glutámico oxaloacética (TGO), la transaminasa glutámico pirúvica (TGP), fosfatasa alcalina (FA), proteínas totales (PT), albúmina (ALB), glucosa (GLU), urea sérica y glucógeno hepático, sanguíneas (formula roja, número de plaquetas y conteo diferencial de leucocitos) e histopatológicas (sangre, hígado y riñón). En el segundo subgrupo se estudiaron los efectos del POLI-1 sobre las funciones renales (formación de orina, consumo de agua y análisis de orina de 24 horas respectivamente).

El grupo CONTROL INTACTO solamente se utilizó como referencia de los pesos de las glándulas adrenales, bazo, timo y el glucógeno hepático. **ESTADÍSTICA.** Los valores se expresaron como la Media \pm EEM (error estándar de la media). El análisis se realizó con la prueba de ANOVA de una sola cola seguido por la prueba de comparación de Tukey-Kramer o t-Student según se aplique. Las diferencias significativas fueron consideradas con una $p < 0.05$. **RESULTADOS.** Las diferentes variables estudiadas, mostraron que el POLI-1 incrementó la actividad de la TGO, disminuyó la albúmina y las proteínas totales séricas, aumentó el glucógeno hepático, disminuyó el porcentaje del hematocrito y la concentración de hemoglobina e indujo cambios discretos en la histología hepática. La histología hepática, sugiere que los cambios observados pudieron deberse a: 1) los efectos tóxicos del POLI-1 y 2) al efecto bloqueador del POLI-1 de los receptores de AVP que se traduce en el incremento del glucógeno hepático y los cambios histológicos. **CONCLUSIONES.** El hecho de que solo algunas de las variables estudiadas se vieran afectadas por los efectos agudos del POLI-1, sugiere: 1) Que los efectos agudos del POLI-1 no son muy relevantes desde el punto de vista toxicológico. 2) El incremento en el depósito de glucógeno hepático sugiere que el POLI-1 posee un efecto inhibitor específico sobre la glucogenólisis. Esta observación puede ser relevante, pues sugiere por primera vez que la AVP pudiera estar jugando un papel sobre el control del metabolismo hepático de los carbohidratos. 3) El hecho de que el porcentaje del hematocrito y la concentración de hemoglobina disminuyeran en los animales tratados con el POLI-1, sugiere que la AVP pudiera jugar algún papel en el metabolismo de los eritrocitos. 4) El hecho de que las variables relacionadas con la histología y la función renal no se alteraran en respuesta a las diferentes dosis del POLI-1, indica que este compuesto no posee efectos tóxicos ni antagonista de los receptores de AVP renales. En conjunto, los resultados muestran que a corto plazo el POLI-1 no posee efectos tóxicos significativos y sugiere que puede intervenir en el metabolismo del glucógeno hepático y de la hemoglobina a nivel de los hematíes.

INDICE DE CONTENIDOS

		Página
	CARTAS DE LIBERACIÓN	i
	AGRADECIMIENTOS	iii
	RESUMEN	iv
	INDICE DE CONTENIDO	vi
	INDICE DE FIGURAS	xi
	INDICE DE TABLAS	xii
	INTRODUCCIÓN	1
1.	ARGININA VASOPRESINA (AVP).	1
1.1	Tipos de receptores de AVP.	2
1.2	Función y localización de los receptores de AVP.	2
1.3	Mecanismos de acoplamiento de los receptores de AVP.	3
2.	EFFECTOS DE LA AVP SOBRE EL SISTEMA INMUNE.	4
3.	VAPTANES.	5
4.	EL POLI-1.	7
4.1	El POLI-1 y estudios de anclaje.	8
4.2	El POLI-1 y metabolitos propuestos.	9
4.3	El POLI-1 y estudios biológicos.	10
5.	HIGADO.	11
5.1	Patofisiología.	12
5.2	Organización funcional y estructural.	12
5.3	El glucógeno y el cortisol.	15
5.4	Los aminoácidos se pueden convertir en glucosa, oxidarse completamente o dar origen a cetoácidos.	15
5.5	Glucógeno hepático.	15
5.6	Mecanismos de toxicidad.	16
5.7	Mecanismos de daño hepático.	17
5.8	Regeneración de los hepatocitos.	19
5.9	Transaminasa glutámico pirúvica (TGP).	20
5.10	Transaminasa glutámico oxaloacética (TGO).	20

5.11	Señal de lesión hepática.	21
6.	RIÑÓN.	22
6.1	Estructura y funciones renales.	22
6.2	Organización básica de la nefrona, sistema colector y vasculatura renal.	24
6.3	Insuficiencia renal producida por xenobióticos.	24
6.3.1	Insuficiencia renal aguda (IRA).	25
6.3.1.1	IRA prerrenal (azoemia prerrenal).	25
6.3.1.2	IRA parenquimatosa.	26
6.3.1.3	IRA posrenal (obstructiva).	26
6.3.2	Insuficiencia renal crónica (IRC).	27
6.4	Sitios de daño y acciones nefrotóxicas de los xenobióticos.	28
6.4.1	Sitios de daño.	28
6.4.1.1	Glomérulos.	28
6.4.1.2	Túbulos proximales.	28
6.4.1.3	Asa de Henle, túbulos distales y túbulos colectores.	28
6.4.2	Daño renal por los xenobióticos.	31
6.4.2.1	Estrés oxidativo y sustancias alquilantes.	31
6.4.2.2	Alteración del volumencelular y homeostasis de iones.	31
6.4.2.3	Modificación del citoesqueleto y la polaridad celular.	32
6.4.2.4	Alteración de las mitocondrias y los lisosomas.	32
6.4.2.5	Cambio en la concentración de calcio intracelular.	32
6.4.2.6	Activación de las Fosfolipasas.	32
6.4.2.7	Activación de las Endonucleasas.	32
6.5	Xenobioticos nefrotóxicos.	33
7.	LA SANGRE.	34
7.1	Glóbulos rojos.	34
7.1.1	Catabolismo de los hematíes.	35
7.1.2	Alteraciones eritrocitarias.	35
7.2	Leucocitos.	36
7.2.1	Neutrófilos.	36
7.2.1.1	Neutropenias (disminución de neutrófilos circulantes).	37

7.2.2	Eosinófilos.	38
7.2.3	Basófilos.	38
7.2.4	Monocitos.	38
7.2.5	Linfocitos.	39
7.2.5.1	Funciones de los linfocitos.	40
7.2.6	Plaquetas.	40
	JUSTIFICACIÓN	41
	HIPÓTESIS	42
	OBJETIVO GENERAL	43
	OBJETIVOS PARTICULARES	43
	METODOLOGÍA	44
1.	Animales.	44
2.	Grupos.	44
3.	Obtención de muestras basales.	45
3.1	Sangre basal.	45
3.2	Pruebas de toxicidad hepática.	45
3.3	Pruebas de toxicidad renal.	45
3.4	Pruebas de toxicidad del sistema inmune.	46
3.4.1	Biometría hemática.	46
3.4.2	Fórmula blanca.	46
4.	Preparación y administración del POLI-1 y obtención de sangre experimental.	47
4.1	Preparación del POLI-1.	47
4.2	Administración del POLI-1.	47
4.3	Sangre experimental.	47
5.	Extirpación de órganos.	47
6.	Procesamiento del hígado para la medición de glucógeno hepático.	47
6.1	Determinación de glucosa libre.	48
6.2	Determinación de glucosa total.	49
7.	Fijación y corte de tejidos.	49
7.1	Fijación en parafina.	50
7.2	Preparación del tejido en cubos de parafina.	50

7.3	Cortes histológicos.	51
8.	Tinción con hematoxilina-eosina (H-E) para tejidos.	51
9.	Producción de orina y consumo de agua basales de 24 horas.	52
10.	Producción de orina y consumo de agua experimentales de 24 horas.	53
11.	Pruebas urinarias de toxicidad renal.	53
	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	54
	RESULTADOS	55
	EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AGUDA AL POLI-1.	55
1.	PESOS ADRENALES, BAZO Y TIMO.	55
2.	HÍGADO.	56
2.1	Actividad de las enzimas: transaminasa glutámico oxaloacética (TGO), transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y fosfatasa alcalina (FA).	56
2.2	Concentraciones séricas de proteínas totales (PT), albúmina (ALB) y glucosa (GLU).	58
2.3	Glucógeno hepático.	59
2.4	Histopatología hepática.	60
3.	RIÑÓN	65
3.1	Efectos del POLI-1 sobre la producción de orina y el consumo de agua y de 24 horas.	65
3.2	Efecto del DMSO y el POLI-1 sobre algunos componentes de la orina de 24 horas.	66
3.3	Efecto del POLI-1 sobre la concentración de urea sérica.	67
3.4	Histopatología renal.	67
4.	SISTEMA INMUNE.	69
4.1	Efecto del POLI-1 sobre el porcentaje de los leucocitos sanguíneos.	69
4.2	Efecto del POLI-1 sobre plaquetas y eritrocitos circulantes.	69
	DISCUSIÓN	74
	CONCLUSIONES	78
	ANEXOS O APÉNDICE	79

1.	Materiales y reactivos para la determinación de glucógeno hepático.	79
1.1	Preparación del reactivo de <i>O</i>-Toluidina.	80
1.2	Preparación del buffer de citratos 0.1 M de pH = 4.2.	80
1.3	Preparación de la solución madre de glucosa de 10 µg/µL (10 mg/ml) de concentración.	80
1.4	Preparación de la solución final de glucosa de 1 µL/µL de concentración.	81
1.5	Estandarización de la curva patrón de Glucosa.	81
2.	Materiales para la tinción de leucocitos con el colorante de Giemsa.	.82
3.	Materiales y reactivos necesarios para la fijación y corte tejidos (Prophet et al., 1994).	82
3.1	Materiales y reactivos necesarios para la fijación de tejidos en parafina.	82
3.2	Materiales y reactivos necesarios para la preparación de tejidos en cubos de parafina.	82
3.3	Materiales y reactivos para hacer los cortes histológicos.	83
3.4	Materiales y reactivos necesarios para la tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) en tejidos.	83
	GLOSARIO	84
	BIBLIOGRAFÍA	91

INDICES DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Molécula de AVP.....	1
Figura 2. Mecanismos de acoplamiento de los receptores V ₁ y V ₂ de AVP.....	3
Figura 3. Efecto de los receptores de la AVP sobre el desarrollo de la encefalomiелitis experimental autoinmune (EEA) en ratas Lewis.....	5
Figura 4. Síntesis del POLI-1.....	7
Figura 5. Enantiomería del POLI-1.....	8
Figura 6. El POLI-1 y el Tolvaptán (antagonista de los receptores de AVP no peptídico tipo V ₂) poseen en su estructura anillos aromáticos y átomos de nitrógeno.....	8
Figura 7. Anclaje del POLI-1 sobre los receptores V _{1a} , V _{1b} y V ₂	9
Figura 8. El POLI-1 y sus metabolitos propuestos.....	10
Figura 9. Comparación del efecto protector contra la encefalomiелitis experimental autoinmune (EEA) del un coctel de antagonistas de los receptores de AVP V1880, V2138 y V2255 SIGMA) (1.5 µg/kg de P.C./12 horas) con las drogas POLI-1 (1 mg/kg de P.C./12 horas) y POLI-2 (300 mg/kg de P.C./12 horas).....	10
Figura 10. Diagrama esquemático del hígado.....	11
Figura 11. Representación esquemática de la organización estructural de los lobulillos hepáticos.....	12
Figura 12. Vascularización hepática y sistema biliar.....	13
Figura 13. Transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y catabolismo de aminoácidos... 20	
Figura 14. Transaminasa glutámico oxaloacética (TGO) y catabolismo de aminoácidos.....	21
Figura 15 A. Estructura del riñón humano.....	23
Figura 15 B. Organización del sistema vascular del riñón y organización de la nefrona.....	23
Figura 16. Diagrama esquemático de la ultraestructura celular de las nefronas.....	24
Figura 17. Resorción de los constituyentes del líquido tubular en la nefrona y probables lugares de acción de las principales clases de diuréticos.....	30

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Subtipos de receptores de AVP (V_{1a} , V_{1b} y V_2), localización, función y antagonistas no peptídicos.....	6
Tabla 2. Características generales de la insuficiencia renal y ejemplos de xenobióticos que la producen.....	25
Tabla 3. Sitios de daño y mecanismos generales de nefrotoxicidad de los xenobióticos.....	30
Tabla 4. Efectos renales tóxicos producidos por los xenobióticos.....	33
Tabla 5. Enzimas utilizadas en estudios de nefrotoxicidad.....	34
Tabla 6. Efectos del DMSO y POLI-1 sobre el peso las glándulas adrenales, bazo y timo.....	55
Tabla 7. Efectos del DMSO y el POLI-1 sobre algunos componentes de la orina de 24 horas.....	66
Tabla 8. Efecto del DMSO y el POLI-1 sobre el porcentaje diferencial de los leucocitos sanguíneos.....	69

INTRODUCCIÓN

1. ARGININA VASOPRESINA (AVP).

La AVP también llamada vasopresina u hormona antidiurética (ADH) (figura 1), es sintetizada principalmente en los somas neuronales magnocelulares y parvocelulares de los núcleos paraventriculares y en las neuronas magnocelulares de los núcleos supraópticos del hipotálamo. Este nonapéptido se sintetiza a partir de una gran molécula precursora llamada preproresosifina, que además de la AVP contiene a la neurofisina II y un glucopéptido. La AVP de origen mangnocelular es transportada por los axones del tracto hipotálamo-neuro-hipofisiario hasta sus terminaciones nerviosas en el lóbulo posterior de la glándula pituitaria (neurohipófisis), desde donde es secretada por exocitosis a la circulación general y es la responsable de los conocidos efectos antidiurético y vasopresor (Ganong, 2005). La deficiencia de AVP neurohipofisiaria da lugar a la situación conocida como diabetes insípida. Por otro lado, la AVP de origen parvocelular de los núcleos paraventriculares, es co-expresada con la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y transportadas por axones cortos que terminan en la porción externa de la eminencia media del hipotálamo, en donde son liberadas y transportadas por el sistema circulatorio portal hipotálamo-hipofisiario al lóbulo anterior de la hipófisis, donde estimulan la síntesis y secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Otros efectos fisiológicos importantes de la AVP han sido descritos en el humano, entre los que destacan: 1) inducción de la glucogenólisis en los hepatocitos, 2) liberación de dos factores de coagulación como el factor VIII y Von Willebrand de las células endoteliales vasculares y plaquetas (Yamaguchi et al., 2004), 3) agregación plaquetaria (Thibonnier y Roberts, 1985) y 4) hipertrofia del miocardio (Cas et al., 1995).

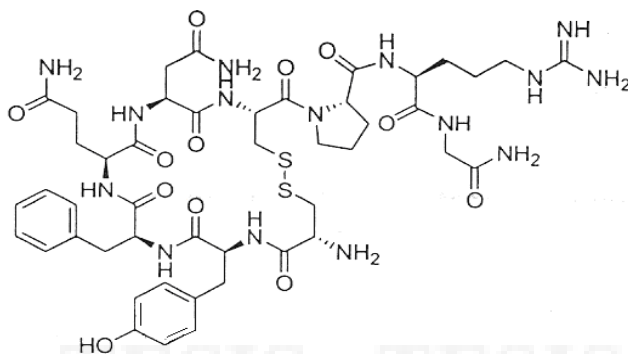


Figura 1. Molécula de AVP (Shimada et al., 2006).

La AVP se ha localizado en otros sitios del sistema nervioso como en los núcleos supraquiasmáticos, en terminaciones vasopresinérgicas que proyectan desde los núcleos paraventriculares al tallo cerebral y médula espinal, en donde al parecer participan en la regulación del sistema cardiovascular. También, la AVP se ha localizado en testículos, ovarios, útero, glándula adrenal, ganglio cervical superior, bazo y timo, sin embargo, la función de la hormona en estos tejidos, no ha sido establecida (Torres y Johnson, 1997).

1.1 Tipos de receptores de AVP.

Los receptores periféricos de AVP se han clasificado según el sistema de segundo mensajero. En este sistema el segundo mensajero está acoplado al receptor. La afinidad de una serie de análogos de AVP cuya selectividad es mayor por un tipo de receptor que por otro (Jard et al., 1986) ha conducido a la distinción de los receptores del tipo V_{1a} (también denominado V_1), los receptores del tipo V_{1b} (también denominado V_3) y los receptores del tipo V_2 .

La subclasificación de los receptores V_1 en V_{1a} y V_{1b} se debe a que los receptores de AVP de adenohipófisis comparten un mecanismo de transducción de señal con los receptores V_{1a} clásicos y además, a que varios análogos de AVP con actividad vasoconstrictora liberan ACTH.

1.2 Función y localización de los receptores de AVP.

Los receptores V_{1a} median los efectos vasoconstrictores de la AVP, aunque también se han identificado en los hepatocitos, en donde estimulan la glucogenólisis y la síntesis de urea (Jard, 1998; Decaux et al., 2008), y en algunos tipos celulares del sistema inmune como monocitos, macrófagos, células B y linfocitos T $CD4^+$ $CD8^+$ y T $CD8^+$ (Block et al., 1981; Elands et al., 1990; Hu et al., 2003; Hansenne et al., 2004); se ha observado que la AVP participa en la activación de los linfocitos T (Bell et al., 1992) y reemplaza a la IL-2 para la producción de interferón- γ (INF- γ) (Torres y Johnson, 1988). Los receptores V_{1b} se han localizado en los corticotropos hipofisarios donde estimulan la liberación de ACTH. Los receptores V_2 ejercen su función antidiurética en las células de los túbulos colectores de las nefronas. En la **tabla 1** se muestran los diversos tipos de receptores de AVP que se han identificado, los tejidos u

órganos donde se han localizado y los efectos fisiológicos que la AVP tiene sobre cada uno de ellos.

1.3 Mecanismos de acoplamiento de los receptores de AVP.

Los receptores de AVP son proteínas de siete dominios alfa-helicoidales transmembranales unidos por tres “loops” intracelulares y tres “loops” extracelulares, con un extremo amino-terminal extracelular y una cola carboxi-terminal citoplasmática (Decaux, 2008). Los tres tipos de receptores transmembranales de AVP ejercen sus efectos a través de la activación de los receptores acoplados a proteínas G, en donde activan diversas vías de señalización (**figura 2**). Así, los receptores de AVP tipo V_{1a} y V_{1b} , acoplados a la proteína $G_{q/11}$, activan la ruta de la fosfolipasa C, tal activación resulta de la hidrólisis de fosfatidilinositol y la movilización de calcio intracelular. Los receptores tipo V_2 están acoplados a la proteína G_s , activan la ruta de la Adenilato ciclasa (AC) (Hansenne et al., 2004) por el incremento de la concentración AMPc dentro de las células renales distales (Thibonnier, 1988); al aumentar la concentración del AMPc se activa la proteincinasa A en la superficie luminal de los túbulos colectores, donde, se promueve la inserción de canales de agua de tipo acuaporina 2 (AQP-2) y finalmente un incremento de la reabsorción de agua (Ganon, 2005).

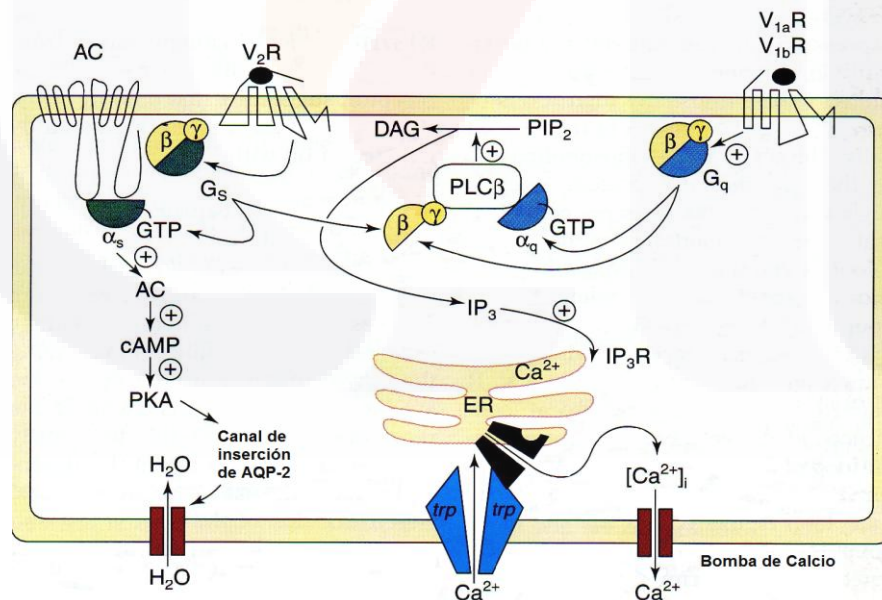


Figura 2. Mecanismos de acoplamiento de los receptores V_1 y V_2 de AVP. El lado izquierdo muestra la secuencia de señalización del receptor tipo V_2 en las células principales del ducto colector renal y el lado derecho muestra la señalización de los receptores tipo V_1 . Abreviaciones: Arginina vasopresina (AVP), Adenilil ciclasa (AC), monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), proteína cinasa A (PKA), canal de agua regulado por AVP llamado acuaporina 2 (AQP-2), fosfolipasa $C\beta$ (PLC β), guanidin trifosfato (GTP), fosfolipasa $V\beta$ (PLV β), fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP $_2$), diacilglicerol (DAG), inositol (1,4,5)-trifosfato (IP $_3$), receptor inositol (1,4,5)-trifosfato (IP $_3$ R), retículo endoplásmico (ER), calcio (Ca^{+2}). (Birnbauer, 2000)

Por otro lado, se ha encontrado que el receptor V_2 presenta dos variantes de RNAm denominadas *variante larga* (V_{2a}) y *variante corta* (V_{2b}). Donde la variante larga codifica para el receptor funcional mediante acoplamiento a la proteína G_s y la proteína traducida de la variante corta es incapaz de activar la enzima adenilato ciclasa en células transfectadas. Ambas variantes se expresan en el túbulo colector (Urrea, 2003) aunque la variante corta presenta mayor nivel de transcripción del RNAm y su cantidad de transcrito corresponde a un 15% de la cantidad de transcrito de la variante larga (Firsov et al., 1994).

En el sistema nervioso central (SNC) hay receptores de AVP de tipo V_2 (Hirasawa et al., 1994; Kato et al., 1995) y la expresión de su RNAm en el hipocampo disminuye durante el desarrollo (Kato et al., 1995). Por el método de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) el RNAm de ambas isoformas (V_{2a} y V_{2b}) y el transcrito primario del receptor V_2 en rata disminuye durante el desarrollo en la corteza cerebral frontal, el tronco cerebral y el cerebelo (en las células de Purkinje) aunque permanece constante en el riñón (Vargas, 2004).

2. EFECTOS DE LA AVP SOBRE EL SISTEMA INMUNE.

Los estudios de la participación de la AVP en el control del sistema inmune son escasos, sin embargo estudios de nuestro laboratorio, sugieren fuertemente la participación de la AVP en la regulación de las respuestas inmunes adaptativas humoral y celular. Así en la rata, la lobectomía neurointermedia hipofisaria (LNI) además de inducir diabetes insípida, disminuye la severidad de los signos clínicos y el número de lesiones típicas de la encefalomiелitis experimental autoinmune (EEA) (Quintanar-Stephano et al., 2004; 2005a). Mientras que en animales LNI o hipofisectomizados (HYPOX) la administración de desmopresina (análogo sintético de la AVP) causa agravamiento de los signos clínicos e histopatológicos de EEA (Quintanar-Stephano et al., 2005b). Evidencia adicional del papel de la AVP en el control del sistema inmune esta dada por resultados en ratas intactas inmunizadas para EEA y tratadas con antagonistas peptídicos (antagonistas derivados de la molécula de AVP) de los receptores V_{1a} de AVP, los cuales disminuyen la severidad de los signos clínicos de la enfermedad (Quintanar-Stephano et al., 2006) (**figura 3**). Sin embargo, efectos contradictorios se han obtenido en algunos de nuestros experimentos realizados en

condiciones similares (usando antagonistas peptídicos de AVP en ratas inmunizadas con EEA), en donde, se incrementa la severidad de la EEA. Aunque la causa de estos efectos no se conoce, se han reportado resultados discordantes utilizando los mismos antagonistas de los receptores de AVP en otros modelos experimentales. Un hallazgo característico de la administración a largo plazo de estos antagonistas, es que, inicialmente inducen el efecto esperado (bloqueo de los receptores de AVP), mientras que la administración crónica induce un efecto agonista (Goodman y Gilman, 2003; Decaux et al., 2008).

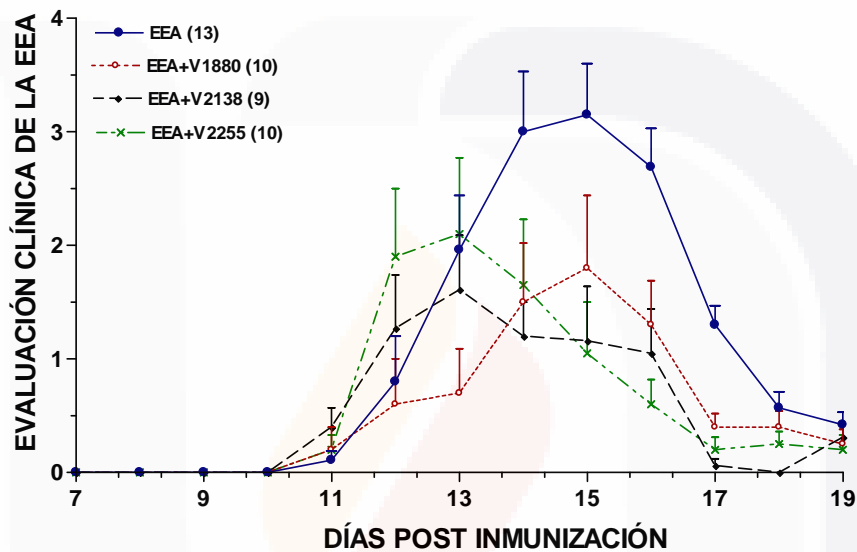


Figura 3. Efecto de los receptores de la AVP sobre el desarrollo de la encefalomiелitis experimental autoinmune (EEA) en ratas Lewis. Los antagonistas peptídicos derivados de la molécula de AVP son: V1880, V2138 y V2255. Entre paréntesis se muestra el número de animales de cada grupo. Los puntos representan la media \pm error estándar de la media (EEM) de los grados diarios de los signos clínicos de la EEA durante los días 15-17 post-inmunización. (Quintanar-Stephano et al., 2006).

Por el potencial terapéutico que ofrecen los fármacos con propiedades bloqueadoras efectivas de los receptores de AVP, se han buscado alternativas en la síntesis de compuestos de origen no peptídicos (no derivados de la molécula de AVP), que tengan solo efectos antagonistas sobre los diferentes tipos de receptores de AVP.

3. VAPTANES.

Recientemente se han descrito un grupo de moléculas no peptídicas, es decir, sustancias sintéticas no derivadas de la molécula de AVP, que poseen propiedades antagonistas de los receptores de AVP llamadas *vaptanes* (**Tabla 1**). El efecto

antagonista de los vaptanes es dado por su capacidad de competir por los receptores de AVP sin perder su actividad antagonica. En la actualidad se han desarrollado antagonistas especificos para los receptores V_{1a} , V_{1b} y V_2 de AVP, este hecho ha permitido iniciar pruebas clinicas en donde se pretende controlar algunas enfermedades relacionadas con la AVP (Dcaux et al., 2008).

Tabla 1. Subtipos de receptores de AVP (V_{1a} , V_{1b} y V_2), localización, función y antagonistas no peptídicos.

	Función	Antagonista no peptídico	Desarrollo clínico
V_{1a}			
Músculo liso vascular Plaquetas Cerebro	Vasoconstricción Agregación Memoria, adaptación al estrés, reconocimiento social, ritmicidad circadiana. Regulación de la temperatura, regulación de la presión sanguínea y frecuencia cardiaca	Relcovaptan	Síndrome de Raynaud
Hepatocito Miométrio Renal	Glucogenólisis y síntesis de urea Contracción uterina Estimulación de la síntesis de prostaglandinas, disminución del flujo sanguíneo renal medular, contracción de las células mesangiales glomerulares	Relcovaptan	Dismenorrea, labor pretérmino
Corteza adrenal	Estimulación de secreción de aldosterona y glucocorticoides (cortisol)	OPC-21268	Hiperplasia adrenal macronodular independiente de ACTH
V_{1b}			
Células corticotropas hipofisarias Médula adrenal Cerebro Páncreas	Liberación de ACTH/ β -endorfinas Adaptación al estrés Liberación de insulina	SSR-149415	Desórdenes depresivos
V₂			
Membrana basolateral de los túbulos colectores renales	Reabsorción de agua libre (inserción de canales de acuaporina 2 en la membrana apical; inducción de la síntesis génica de acuaporina 2)	Moravaptan Lixivaptan Conivaptan Satavaptan	Hiponatremia (solo SIADH) Hiponatremia (SIADH, cirrosis, ICC) Hiponatremia, ICC Hiponatremia, ICC, cirrosis (prevención de la formación de ascitis).
Neumocitos tipo	Estimulación de reabsorción de sodio (a	Tolvaptan	Hiponatremia, ICC, enfermedad renal poliquística

II Endotelio vascular Músculo liso vascular	través de la activación de ENaC) Liberación de los factores VIII y Von Willebrand Vasodilatación		
---	---	--	--

Abreviaturas: ACTH- Hormona adrenocorticotrópica, SIADH-Síndrome de secreción inadecuada de la hormona antidiurética. ICC- Insuficiencia cardíaca crónica. ENaC- Canal epitelial de sodio (Decaux, 2008).

Actualmente, el uso de los vaptanes se encuentra en etapa preclínica por lo que su adquisición comercial no ha sido posible. Esta situación nos ha llevado a buscar alternativas en los laboratorios nacionales que puedan sintetizar compuestos con propiedades antagonistas de los receptores de AVP, una de las cuales es el POLI-1.

4. El POLI-1.

La 3a-Acetoxi-5H-pirrolo(1,2-a) (3,1)benzoxazin-1,5-(3aH)-diona (POLI-1) es un compuesto perteneciente a la serie del ácido o-carboxílico. Esta molécula fue sintetizada por el Dr. José Correa (2006) en el Laboratorio de Bioquímica de la ESM del IPN.

El POLI-1 se sintetiza a partir de la reacción del anhídrido maléico y ácido antranílico del cual se obtiene la imida: 4-(2'-carboxi-fenilamino)-4-oxo-(Z)-2-ácido butenónico, y por medio de una serie de reacciones químicas se deriva el 3a-Acetoxi-5H-pirrolo(1,2-a) (3,1)benzoxazin-1,5-(3aH)-diona (POLI-1) como se muestra en la **figura 4**. La reacción es irreversible debido a que los grupos α,β -insaturados poseen alta reactividad. La molécula posee un carbono quiral lo que le permite tener enantiómeros de forma S y R (**figura 5**).

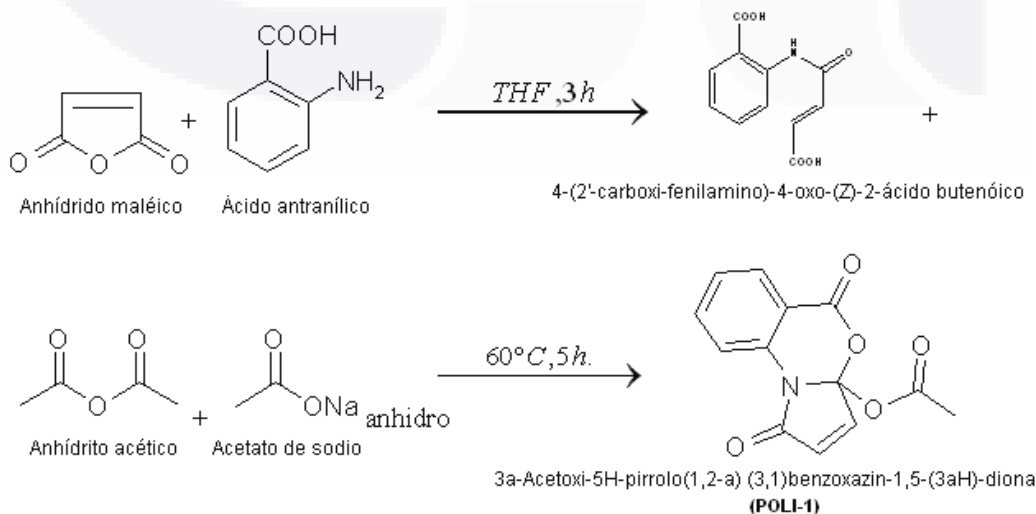


Figura 4. Síntesis del POLI-1 (Correa et al, 2006).

Forma S del POLI-1

Forma R del POLI-1

Figura 5. Enantiomería del POLI-1.

Físicamente, el POLI-1 se caracteriza por ser cristales sólidos de color blanco con un peso molecular de 259 moles. Es hidrofóbico, soluble en una mezcla de etanol-agua (1:10), dimetilsulfóxido (DMSO) y solventes lipídicos (Rosendo y Correa, 2009) (comunicación personal).

4.1 El POLI-1 y estudios de anclaje.

La presencia de anillos aromáticos y átomos de nitrógeno (**figura 6**) en la molécula POLI-1 y de algunos vaptanes, son algunas de las características que les dan la capacidad de acoplarse a los receptores de AVP.

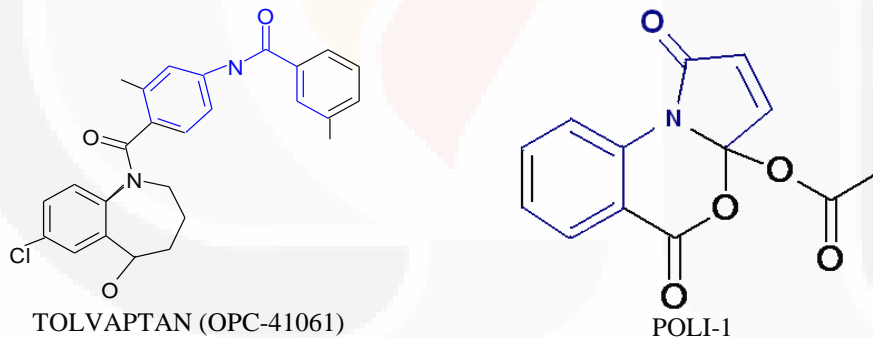


Figura 6. El POLI-1 (Correa et al., 2006) y el Tolvaptán (antagonista de los receptores de AVP no peptídico tipo V_2) (Decaux, 2008) poseen en su estructura anillos aromáticos y átomos de nitrógeno.

Con el uso de receptores V_{1a} , V_{1b} y V_2 de AVP modelados (Ślusarz et al., 2006) y proporcionados por colaboración con el Dr. Correa, el estudio del anclaje de la molécula del POLI-1 simula la formación del complejo sitio activo-inhibidor. Los hallazgos muestran que el sitio de reconocimiento del POLI-1 es una región rica en aminoácidos aromáticos y sugiere que posee afinidad por los tres tipos de receptores de AVP (**figura 7**) debido al sistema de anillos aromáticos que potencialmente pueden

unirse al sitio de reconocimiento de los receptores de AVP. Además, la constante de disociación y energía libre de Gibbs del POLI-1 indican que este compuesto presenta mayor afinidad y especificidad por el receptor tipo V_2 que por los receptores tipo V_{1a} y V_{1b} (Rosendo y Correa, 2009) (comunicación personal).

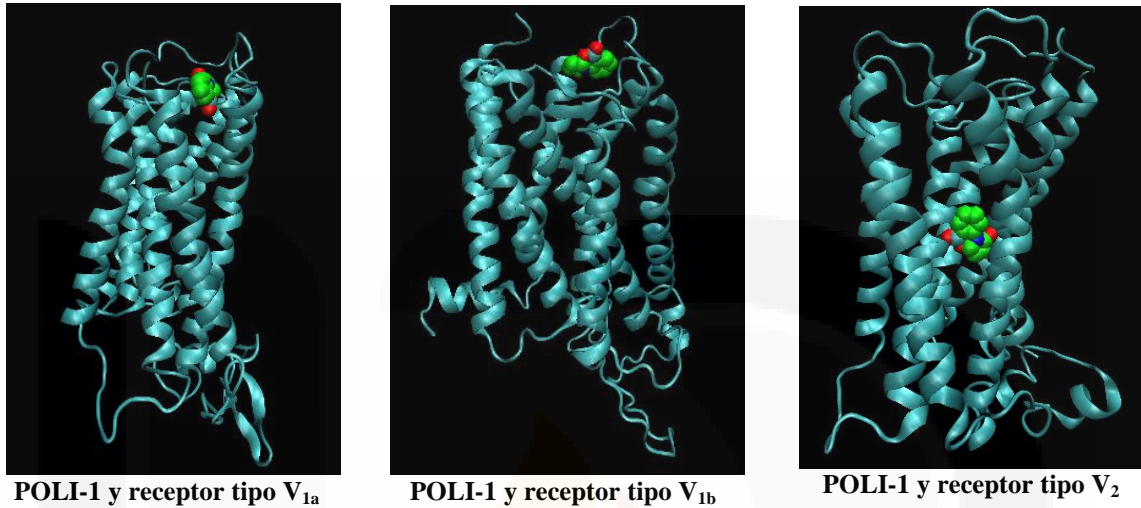


Figura 7.- Anclaje del POLI-1 sobre los receptores V_{1a} , V_{1b} y V_2 (Rosendo y Correa, 2009) (comunicación personal).

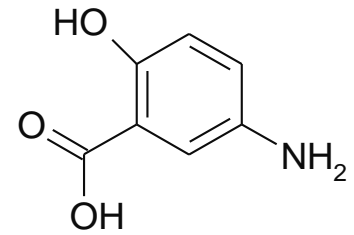
4.2 El POLI-1 y metabolitos propuestos.

A continuación se muestran cinco compuestos como posibles metabolitos del POLI-1 (figura 8).

POLI-1

2{[2z]-3 Carboxipropil 2 enoil
amino} ácido benzoico

z-(2,5 dioxo-2,5-dihidro-
1Hpirrol) ácido benzoico



Ácido benzoico

3^a-hidroxi-5H-pirroló[1,2-a][3,1]benzoxazina-1,5 (3aH)dion

1,3^a-hidroxi-3H-benzo[d]pirrulo one epóxido

Figura 8. El POLI-1 y sus metabolitos propuestos (Rosendo y Correa, 2009) (comunicación personal).

Así pues, es el potencial del POLI-1 como antagonista de los receptores de AVP el que cobra importancia para su uso en el tratamiento de diversos trastornos relacionados con la AVP.

4.3 POLI-1 y estudios biológicos.

Estudios del efecto antagonista del POLI-1 sobre los receptores de AVP, usando el modelo de EEA, indican una disminución significativa de la severidad clínica de la EEA (Figura 9) (Quintanar-Stephano et al., 2007).

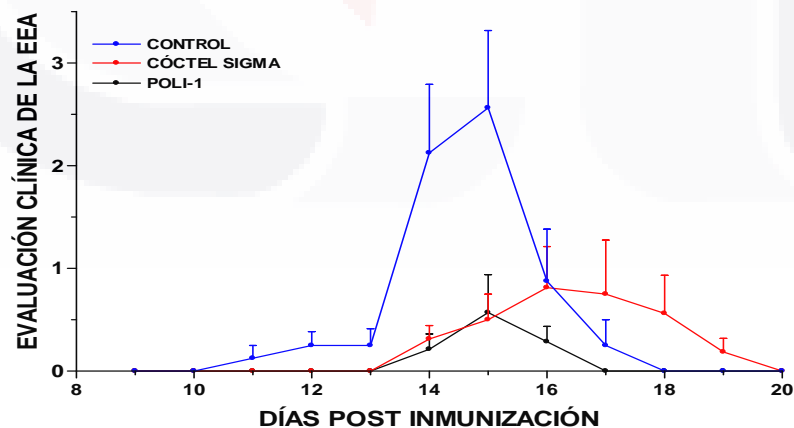


Figura 9. Comparación del efecto protector contra la encefalomiелitis experimental autoinmune (EEA) de un cóctel de antagonistas de los receptores de AVP V1880, V2138 y V2255 SIGMA) (1.5 µg/kg de P.C./12 horas) y el POLI-1 (1 mg/kg de P.C./12 horas). Los puntos representan la media ± error estándar de la media (EEM) de los grados diarios de los signos clínicos de la EEA. Los tratamientos farmacológicos iniciaron una semana antes de las inmunizaciones hasta la terminación del experimento (20 DPI). n = 7 animales/grupo (Quintanar-Stephano et al., 2007).

Estos estudios sugieren que el POLI-1 puede tener potencial terapéutico en problemas de exceso de AVP y/o en el control del sistema inmune, por lo que resulta importante profundizar en el estudio de sus efectos fisiológicos, farmacológicos y toxicológicos.

5. HIGADO.

El hígado recibe un abastecimiento doble de sangre: es irrigado por la arteria hepática y por la sangre de la vena porta proveniente del bazo, páncreas, estómago e intestinos, antes de pasar a la circulación general a través de la vena suprahepática (Young y Heath, 2000) (**figura 10**).

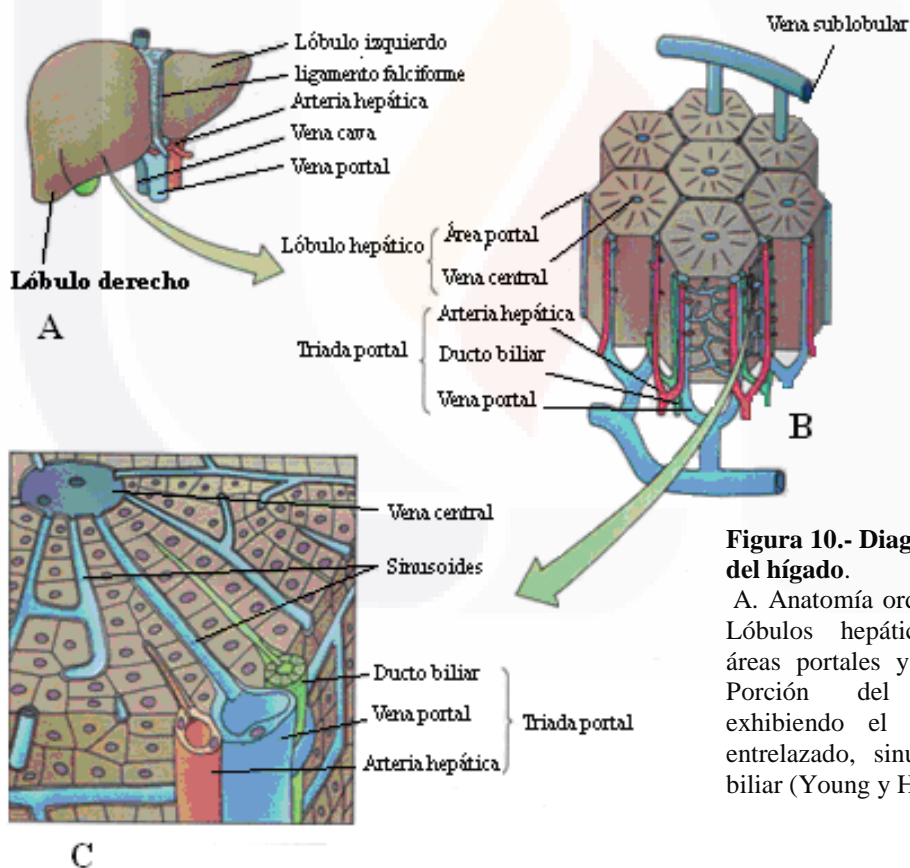


Figura 10.- Diagrama esquemático del hígado.

A. Anatomía ordinaria del hígado. B. Lóbulos hepáticos exhibiendo las áreas portales y la vena central. C. Porción del lóbulo hepático exhibiendo el área portal, hígado entrelazado, sinusoides y canalículo biliar (Young y Heath, 2000).

La importancia funcional del hígado radica en su gran capacidad metabólica y biotransformadora. Esto es, a) realiza funciones metabólicas esenciales para el mantenimiento de la homeostasis, b) es el primer órgano que recibe los nutrientes y xenobióticos provenientes del sistema digestivo, c) se encarga de la incorporación,

almacenamiento y conversión metabólica de aminoácidos, lípidos, vitaminas y carbohidratos, y de su liberación final a la sangre y a la bilis y d) gracias a su alta tasa de biotransformación convierte sustancias hidrofóbicas en derivados hidrosolubles que pueden ser excretados en la bilis y en la orina (Drucker, 2005).

5.1 Patofisiología.

El daño de las células hepáticas por la exposición aguda o crónica a diversos agentes tóxicos se caracteriza por la capacidad que estos tienen de inducir cambios significativos en las principales funciones del hígado. El daño celular ocasionado puede ser de diversa magnitud y dependerá de la capacidad de inhibir a los sistemas de transporte y secreción de metabolitos, o por alteraciones en la bioactivación o desintoxicación de las células, alteraciones que pueden conducir a la muerte celular y, si el daño es continuo, al reemplazo de las células muertas por tejido fibroso.

5.2 Organización funcional y estructural.

Como se muestra en la **figura 11**, el hígado se divide clásicamente en lóbulos hexagonales orientados alrededor de las venas centrales. En cada una de las esquinas del hexágono se encuentra una triada o tracto portal que contiene una rama de la vena porta, una arteriola hepática y un ducto biliar, acompañados de nervios y vasos linfáticos (Bowman y Rand, 1984).

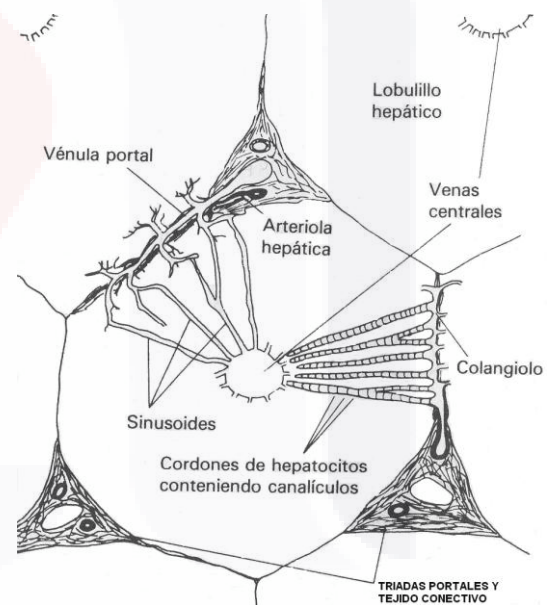


Figura 11. Representación esquemática de la organización estructural de los lobulillos hepáticos (Bowman y Rand, 1984).

Entre la vena central y el tracto portal se localizan cordones de células del parénquima hepático o hepatocitos, los cuales reciben el flujo de sangre proveniente del tracto portal mediante endotelios vasculares o sinusoides. Los nutrientes y xenobióticos establecen contacto con los hepatocitos a través de aperturas o fenestraciones de los sinusoides. De la misma forma, los productos de desecho

metabólico y las proteínas sintetizadas por los hepatocitos son secretados a los capilares para su drenaje a las venas centrales y de allí a la circulación sistémica.

La heterogeneidad metabólica en las zonas del parénquima hepático se manifiesta por su angioarquitectura que define el flujo sanguíneo y, con ello, los gradientes en la concentración de oxígeno, nutrientes y sales biliares (**Figura 12**). La zona 1 altamente oxigenada por su cercanía al tracto portal (9-13% O₂); la zona 2, de oxigenación intermedia, y la zona 3, cercana a las vénulas terminales o centrales, de menor oxigenación (4-5% O₂) (Young y Heath, 2000).

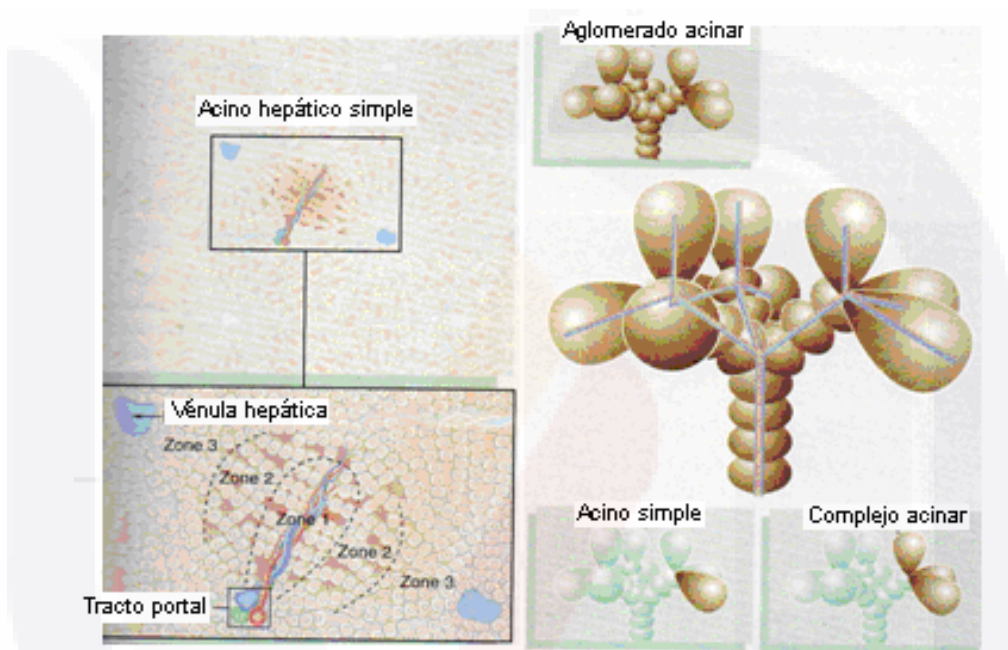


Figura 12. *Vascularización hepática y sistema biliar.* El diagrama esquemático muestra el arreglo de la vascularización hepática y sistema colector biliar. T. Tracto portal, V. Vena hepática. (Young y Heath, 2000).

Así pues, el hígado funciona como filtro de sangre removiendo nutrientes, productos anabólicos, catabólicos y toxinas. Por su alta capacidad vascular, funciona además como regulador del volumen plasmático y niveles circulantes de glucosa, colesterol y amonio, además de que tiene una función significativa en la regulación del balance hidroelectrolítico (Jaramillo et al., 2006).

A lo largo del acino hepático, los hepatocitos presentan diferencias morfológicas y bioquímicas, que se reflejan de manera directa en su función especializada. Como resultado del gradiente de oxígeno portal-central, la mayoría de los eventos patológicos y toxicológicos del hígado muestran preferencia por la zona 1. Por ejemplo, el daño

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

periportal es causado por el alcohol alílico, mientras que el tetracloruro de carbono (CCl₄) (Sokal et al., 1992) y el acetaminofén provocan mayormente daño centrilobular (Gregus y Klaassen, 2001).

Los hepatocitos en la zona 1 están adaptados para realizar actividades oxidativas. Los procesos dominantes son la gluconeogénesis, la β oxidación de ácidos grasos, el catabolismo de aminoácidos y ureagénesis, la síntesis de colesterol, así como la secreción de ácidos biliares. La alta concentración de sales biliares en esta zona forma bilis dependiente de sales biliares (Gumucio y Miller, 1981). La distribución metabólica se acompaña por cambios anatómicos como: mayor número de mitocondrias que tienden a ser más grandes, abundan los lisosomas y el aparato de Golgi, las fenestras (poros) son más grandes, pero menos numerosas, hay mayor cantidad de células de Kupffer, linfocitos, células estelares y terminaciones nerviosas simpáticas (Jaramillo et al., 2006). Hay un delgado reborde de hepatocitos vecino a las vénulas hepáticas terminales que eliminan el amonio de la sangre, mediante la síntesis de glutamina (Drucker, 2005).

Los hepatocitos en la zona 3 son el sitio de detoxificación y biotransformación de fármacos. En esta zona se llevan a cabo procesos metabólicos como glucólisis y la lipogénesis. El delgado reborde de hepatocitos vecino a las vénulas centrales elimina el amonio de la sangre, mediante la síntesis de glutamina. La formación de bilis no depende de sales biliares. En esta zona el retículo endoplásmico liso (REL) es más abundante y los núcleos son más grandes.

Entre la zona 1 y 3 se distribuyen el restante de los hepatocitos, con características morfológicas y bioquímicas intermedias, que constituyen la zona 2. Entre las distintas zonas no existen barreras anatómicas y la división es arbitraria con ausencia de marcadores zonales específicos. Los gradientes de glucosa y de oxígeno son interdependientes y tienen efectos sobre varias enzimas. Los sensores de gradiente de oxígeno son mediados por proteínas que contienen el heme. La diferencia en el contenido enzimático que se establece entre las zonas es gradual y dinámico, además, cambia según el estado metabólico (Drucker, 2005).

La susceptibilidad de los hepatocitos a daño por drogas se debe a que el citocromo P-450 (enzima con gran número de isoformas inducidas o inhibidas por agentes químicos determinados, y clave en la biotransformación y eliminación de un gran número de xenobióticos) es responsable de la biotransformación de fase I,

particularmente la isoenzima CYP2E1 (isoenzima de la familia del citocromo P-450 tipo 2) (Drucker, 2005). El citocromo P-450 se encuentra concentrado dentro de las mismas células que contienen menor cantidad de glutatión (tripéptido reductor de relevancia antioxidante) (Gumucio y Miller, 1981),

5.3 El glucógeno y el cortisol.

La ACTH produce la liberación de cortisol por la corteza suprarrenal en respuesta a estrés, ya sea físico o mental. El cortisol promueve la síntesis de glucosa a partir del glucógeno encontrado en músculos o en hígado, inhibe la síntesis de proteínas de los tejidos periféricos y aumenta la degradación de estas para que sean utilizadas como aminoácidos (sobre todo alanina) por el hígado. Los aminoácidos libres van a los hepatocitos para: la formación de proteínas hepáticas y plasmáticas, síntesis de enzimas necesarias para la glucogenólisis, gluconeogénesis y glucogénesis. En condiciones de estrés, se utilizan ácidos grasos como fuente de energía y como consecuencia se eleva la concentración de glucosa, aminoácidos y lípidos (Guyton y Hall, 2006). La hipoglucemia es un activador potente del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) (Allende, 2001).

5.4 Los aminoácidos se pueden convertir en glucosa, oxidarse completamente o dar origen a cetoácidos.

Tras la liberación del grupo amino, los 20 aminoácidos se oxidan completamente a CO₂ y agua. Cada aminoácido sigue una vía de degradación específica. Sin embargo, todas estas vías convergen en tres procesos metabólicos generales: gluconeogénesis, cetogénesis y ureagénesis. Excepto la leucina, todos los aminoácidos pueden aportar átomos de carbono para la síntesis de glucosa. La degradación de todos los aminoácidos produce la liberación de amoniaco, que se transporta al hígado, incorporado sobre todo a las moléculas de glutamina y alanina. Una vez en el hígado, se desintoxica mediante su transformación a urea, una molécula metabólicamente inerte. La urea resultante de la degradación de las proteínas se excreta por el riñón (Levy y Berne, 2006).

5.5 Glucógeno hepático.

La cantidad de glucógeno en los hepatocitos está sujeto a variaciones diurnas y metabólicas. Se ha encontrado que en ratas Wistar de entre 230-290 g de peso corporal

la concentración de glucógeno hepático es de 2.58 ± 0.24 mg/100 mg de tejido húmedo (Allende et al., 2001).

Después de una ingesta rica en carbohidratos, el glucógeno es almacenado inicialmente en la zona 1 y después más centralmente (durante la glucogenólisis). De cualquier modo, el glucógeno desaparece primero de la zona 3.

Se ha sugerido que el almacenamiento inicial del glucógeno en la zona 1, se debe a elevados niveles de glucosa-6-fosfato encontradas en estas células. En la misma zona se encuentran las enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, que presumiblemente determina la velocidad de síntesis del glucógeno, así como la fructosa-1,6-difosfatasa y glucógeno sintetasa. Lo contrario se presenta en la zona centrilobular (zona 3), en donde las funciones glucolíticas y de glucuronidación son las más importantes. Las enzimas involucradas en estos procesos se encuentran en grandes cantidades como la pirúvico quinasa y la glucógeno fosforilasa. En la zona 1 los depósitos de glucógeno son grandes agregados dentro de los hepatocitos, mientras que en las células de la zona 3 el glucógeno se encuentra disperso homogéneamente dentro del citoplasma (Gumucio y Miller, 1981).

Variaciones funcionales regionales no sólo ocurren en los hepatocitos sino también en las células no parenquimatosas como: las células estelares hepáticas, células de Kupffer, células endoteliales, y del epitelio del ducto biliar, en las cuales el fenotipo celular, los marcadores de superficie, la expresión de citocinas o mediadores inmunes, o el contenido y tamaño de organelos, difieren de acuerdo con la distribución regional. Igualmente, también se observan cambios regionales en la composición de la matriz extracelular, presentando variaciones en el contenido de fibras de colágena, de acuerdo con la localización centrilobulillar o periportal de las células que la sintetizan.

5.6 Mecanismos de toxicidad.

Las células hepáticas pueden ser vulnerables a daños por agentes tóxicos o a diversas condiciones metabólicas. Por su alta capacidad metabólica, la bioactivación de agentes tóxicos y generación de especies reactivas, el hígado constituye el primer órgano de “choque” en donde actúan algunos xenobióticos (Drucker, 2005). Algunos de estos, causan daño a los hepatocitos debido a que son las únicas células del cuerpo que poseen la capacidad de incorporarlos de una manera selectiva, como la incorporación de faloidina y microcistina, drogas que rompen el citoesqueleto celular.

La toxicidad de un agente químico se presenta cuando el producto tóxico final (ya sea un producto o subproducto de su biotransformación), reacciona con la molécula diana, o bien, alteran el microambiente biológico en el cual opera la molécula, lo que desencadena una serie de eventos secundarios que llevan a la disfunción o daño a diversos niveles de la célula (nucleares, moléculas blanco y organelos), daño que puede extenderse a otros tejidos, órganos y aun al organismo entero. Además, las interacciones entre los diversos tipos de células del hígado (por ejemplo, hepatocitos, células estelares, células de Kupffer, células endoteliales) pueden incrementar el efecto tóxico de los xenobióticos al activar mecanismos de la respuesta inmune mediada por citocinas (Jaramillo et al., 2006).

Es sabido que la respuesta del hígado a cualquier agente tóxico es influida por factores genéticos y ambientales, así, el daño aparece cuando los agentes tóxicos están presentes durante un periodo determinado y en concentraciones lo suficientemente altas para rebasar la capacidad defensiva y de regeneración del órgano.

5.7 Mecanismos de daño hepático.

Durante el daño hepático, ya sea agudo (hepatitis viral, toxinas, xenobióticos, rechazo del hígado transplantado) o crónico (alcoholismo, agentes químicos, hepatitis viral, desórdenes metabólicos o colestásicos), las células hepáticas se exponen a cantidades elevadas de citocinas, ácidos biliares y estrés oxidativo, lo que conlleva generalmente la muerte de los hepatocitos, mientras que otros tipos de células, como las estelares hepáticas, se activan y resisten la muerte celular. No obstante, el hepatocito cuenta con algunos mecanismos protectores para prevenir la muerte celular, que van desde sistemas enzimáticos (como la glutatión S-transferasa, superóxido dismutasa), agentes antioxidantes (como el glutatión y las vitaminas E y C), y las enzimas de biotransformación de tipo I y II que inactivan agentes tóxicos (Woolf, 1999). El balance entre los mecanismos de daño o protección definirá el resultado final.

El hígado posee un alto contenido de citocromo P-450 que puede generar compuestos electrofílicos capaces de producir toxicidad, necrosis celular y cáncer. Dichos metabolitos reactivos son extremadamente inestables y principalmente reaccionan en la misma célula que los forma, de ahí que el hígado es afectado por un gran número de xenobióticos. Sólo cuando la formación de metabolitos reactivos

excede la capacidad protectora del hígado ocurrirán los cambios en los constituyentes celulares que dan lugar a la aparición de las lesiones tóxicas respectivas.

Uno de los mecanismos principales de daño hepático radica en la biotransformación y formación de metabolitos reactivos que actúan como radicales libres a partir de los agentes hepatotóxicos (la forma como inician y prolongan el daño tisular es motivo de estudio). Para que el agente presente toxicidad deberá afectar moléculas de función crítica, pues se ha visto que un número diverso de proteínas hepáticas pueden ser modificadas por metabolitos reactivos sin mostrar un alto grado de toxicidad general. Uno de los efectos causados en los componentes celulares por los radicales libres es la peroxidación de lípidos, la cual puede afectar muchas reacciones enzimáticas claves; el otro efecto directo de los radicales libres es mediante su unión covalente a biomoléculas funcionales lo que induce inhibición parcial o total de su actividad normal. Como consecuencia de la ruptura peroxidativa de los lípidos de membrana, hay disminución en la fluidez de la membrana plasmática con el consiguiente deterioro en la actividad de las proteínas embebidas en ella. En las membranas de los organelos subcelulares la alteración de las funciones mitocondriales ocurre probablemente a través de la oxidación de los nucleótidos de piridina y la alteración en la incorporación de calcio, mientras que en el retículo endoplásmico se presentan afectaciones en la actividad del citocromo P-450 y de la glucosa 6-fosfatasa. La membrana de los lisosomas también es afectada provocando su ruptura, con la consecuente liberación de enzimas hidrolíticas y el agravamiento del daño celular (Jaramillo et al., 2006).

Entre los daños subcelulares mencionados, la disfunción mitocondrial se considera uno de los mecanismos más importantes de hepatotoxicidad. En eventos como el estrés oxidativo, la isquemia/reperfusión, exposición al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), sobrecarga de calcio, y una variedad de tóxicos, los cambios en las propiedades de la membrana mitocondrial se relaciona con la muerte celular por necrosis o apoptosis. El mecanismo molecular propuesto para este fenómeno es una disminución en NAD(P)H, un incremento en el calcio libre, y de especies reactivas de oxígeno, lo que promueve los cambios membranales antes mencionados, permitiendo la entrada de solutos, desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (con la consecuente disminución de ATP), y liberación del citocromo c, proteínas proteolíticas y proteínas proapoptóticas presentes en el espacio intermembranal (Treinen, 2001).

Además de los componentes electrofílicos, responsables directos del daño, se han propuestos otros mecanismos celulares que bajo ciertas condiciones contribuyen a la inducción del daño. Por ejemplo, el óxido nítrico (NO) (participa en el intercambio de señales entre los hepatocitos y las células inmunes) define el daño o la protección del hepatocito al inhibir la activación de la apoptosis. El balance entre el daño o la protección define la respuesta homeostática al agente tóxico (Gardner et al., 1998),

Otros mecanismos que modulan la respuesta del hepatocito al daño se basan en la señalización intracelular. Una vez efectuado el daño hepático se activan rutas de transducción de señales acopladas a receptores, proteincinasas activadas por mitógeno y la señalización por Fas, así como la generación de segundos mensajeros tales como la ceramida y el óxido nítrico. El resultado final es la activación de factores de transcripción tales como la proteína activadora-1, c-Myc, o el factor nuclear Kappa-b y la expresión de otros agentes de estrés (Jaramillo et al., 2006).

5.8 Regeneración de los hepatocitos.

Uno de los mecanismos más importantes en la protección de las funciones hepáticas es su capacidad regenerativa. El proceso de regeneración presenta un mecanismo dinámico de proliferación celular compensatorio que responde a los estímulos provenientes de la toxicidad aguda. Así, después del daño por necrosis o de la hepatectomía parcial, los hepatocitos se replican de una manera casi sincrónica para compensar la disminución en la masa funcional. Los hepatocitos adultos participan en la regeneración hepática a través de divisiones mitóticas de las células mononucleadas o por la citocinesis de células binucleadas después de la replicación del ADN. La regeneración hepática secundaria a daño tóxico se produce después de la muerte celular extensiva. La diferencia entre este tipo de regeneración hepática y la producida por la hepatectomía está dada por los tiempos en los que se sucede la replicación celular.

En condiciones normales estas células se encuentran quiescentes o en reposo, lo que indica que los mecanismos de represión de la replicación se encuentran fuertemente activos y se pierden tan pronto el hígado sufre daño físico o químico. Sin embargo, cuando el hepatocito está afectado como sucede en la enfermedad de hígado graso alcohólico, el alcohol interfiere con la regeneración hepática y, a pesar de generar el estímulo para la proliferación después de la ingesta de alcohol y la consecuente muerte celular, el resto de los hepatocitos adultos sobrevivientes no pueden replicarse.

La reparación tisular es compleja y se desarrolla en diversas etapas gobernadas por moléculas de señalización celular tales como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y receptores nucleares que son los que determinan la expresión de genes promitogénicos y la división celular (Jaramillo et al., 2006).

5.9 Transaminasa glutámico pirúvica (TGP).

Es también llamada alanino aminotransferasa (ALT), es una enzima que transfiere grupos aminos entre la L-alanina y glutamato que se encuentra en necesidades fisiológicas. En el hígado se presenta principalmente y en grandes cantidades aunque en pequeñas cantidades en el corazón, músculo y riñón. Cuando el hígado es dañado o se inflama los niveles de esta enzima se elevan en sangre.

En la rata la concentración sérica de TGP (UI/L) en machos va de 17.5 a 30.2 (Gad y Chengelis, 1992).

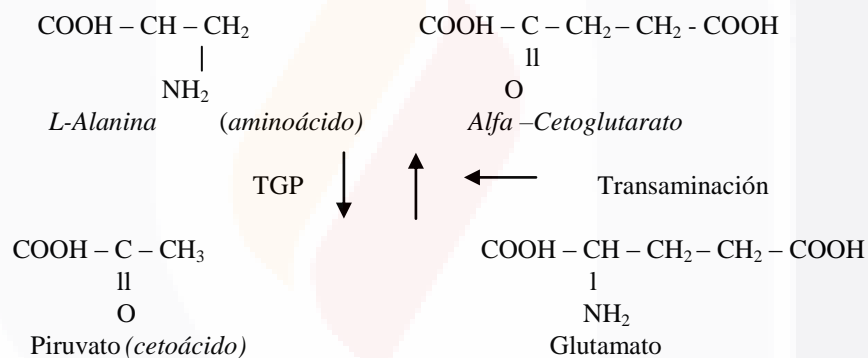


Figura 13. Transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y catabolismo de aminoácidos.

5.10 Transaminasa glutámico oxaloacética (TGO).

Es también llamada aspartato aminotransferasa (AST), esta enzima cataliza la transferencia de grupos amino y ceto entre el aspartato (α -aminoácido) y oxaloacetato (α -cetoácido). Se encuentra en citoplasma y mitocondrias del hígado y otros tejidos corporales como corazón, músculo, riñón, cerebro y pulmones. Cuando un tejido corporal u órgano tal como el hígado o el corazón son dañados, la AST adicional es liberada a la sangre. La cantidad de AST en sangre es directamente relacionada a daño tisular. Los niveles de suero de AST se elevan en algún grado en al menos todos los tipos de daño hepático aunque en algunas causas no hepáticas también se eleva. En rata la concentración sérica de TGO está entre 45.7 y 80.8 UI/L (Gad y Chengelis, 1992).

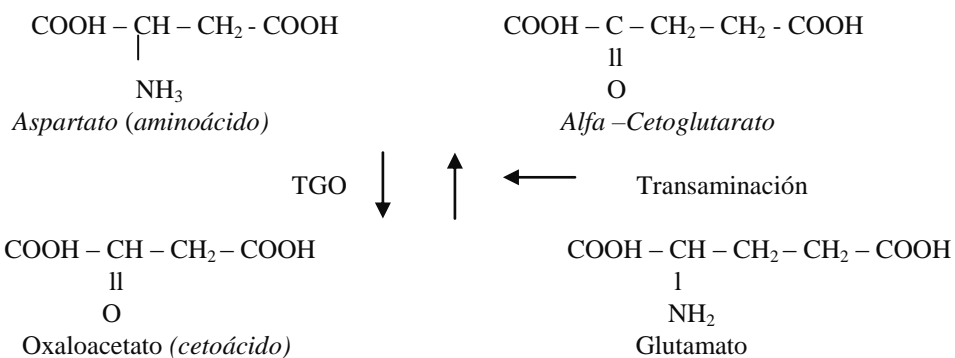


Figura 14. Transaminasa glutámico oxaloacética (TGO) y catabolismo de aminoácidos.

5.11 Señal de lesión hepática.

La señal de lesión hepática tradicionalmente utilizado es la elevación TGP o ALT. Sin embargo, esta enzima no es un marcador específico y no representa necesariamente daño hepático ya que en muchos casos su elevación retorna a la normalidad a pesar de continuar con la administración del xenobiótico debido a la tolerancia adaptativa como ocurre con la isoniazida (Navarro y Senior, 2006).

En 2001 la FDA y la Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades Hepáticas definieron como daño hepático el aumento de los niveles de TGP más de tres veces el límite superior del rango normal y de una fosfatasa alcalina (FA) de más de dos veces el límite superior de la normalidad, o un aumento de la bilirrubina total (BT) de más de dos veces el límite superior de la normalidad si van asociadas a cualquier elevación de la TGP o FA. Esto es:

- 1) TGP > 3 veces limite superior normal con FA > 2 veces limite superior normal.
- 2) BT > 2 veces limite superior normal asociada a cualquier elevación de TGP o FA.

Se indica daño hepático a las elevaciones en los niveles séricos de enzima (TGP, TGO y FA), mientras que los incrementos en los niveles de BT y bilirrubina conjugada (BC) indican la función hepática. Los niveles de BT o BC (bilirrubina directa o unida a ácido glucurónico) refleja la capacidad del hígado para hacer el pasaje de la bilirrubina del plasma a la bilis. Otros parámetros de función hepática es la síntesis de proteínas, como la concentración de albúmina (ALB) y el tiempo de protrombina (TP).

Los patrones de daño hepatocelular se caracterizan por una elevación inicial y de predominio de la TGP y pueden evolucionar a la insuficiencia hepática aguda, en cambio los patrones de daño colestásico, se caracterizan por un aumento en primer lugar

de los niveles séricos de FA y raramente evolucionan a la insuficiencia hepática aguda. Estos patrones de lesión no se excluyen mutuamente y pueden ser mixtos o intermedios.

El TP es útil para vigilar la función hepática de los pacientes con insuficiencia hepática aguda ya que pueden detectarse anomalías a las pocas horas del daño hepático, aunque la vida media de los factores de la coagulación es menor en comparación con otras proteínas como la albúmina (Johnston, 1999).

En rata las concentraciones sanguíneas de glucosa está entre 50 y 135 mg/dL, la de proteína total está entre 4.70 y 8.15 g/dL y la de albúmina está entre 2.70 y 5.10 g/dL y la actividad de la fosfatasa alcalina está entre 56.8 y 128 UI/L, (Gad y Chengelis, 1992).

Es importante reconocer el patrón de daño hepático, ya que ciertos fármacos tienden a crear lesión predominantemente de acuerdo a un patrón u otro, además no son mutuamente excluyentes, y un patrón mixto de lesión puede ocurrir en muchos casos.

6. RIÑÓN.

La integridad funcional de los riñones es esencial para el mantenimiento de la homeostasis (Bowman y Rand, 1984). Entre sus funciones está: a) la regulación del equilibrio hidroelectrolítico, b) excreción de productos de desecho derivados del metabolismo celular, c) regulación de la presión arterial a través del sistema renina-angiotensina, d) reabsorción de sustancias útiles para las células como la glucosa y los aminoácidos, e) participación en la regulación del equilibrio ácido-básico y f) eliminación de xenobióticos, algunos de los cuales pueden dañar la estructura y por lo tanto las funciones renales. Al igual que en el hígado, los daños causados por los xenobióticos pueden ser reversibles o irreversibles

6.1 Estructura y funciones renales.

Los riñones se localizan retroperitonealmente, en la pared abdominal posterior. En un corte longitudinal del riñón, se identifican dos regiones: la externa llamada corteza y la interna llamada médula (**figuras 15A y 15B**). La corteza tiene apariencia granular, mientras que la médula está compuesta por las

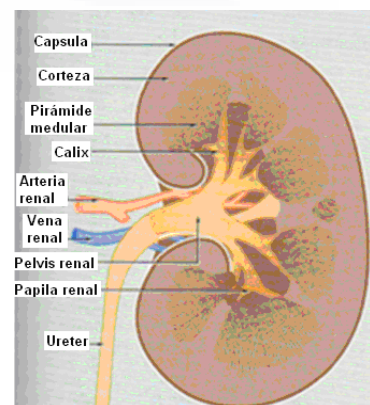


Figura 15A.- Estructura del riñón humano (Young y Heath, 2000).

llamadas pirámides renales (8-18 en el humano y una en la rata) (Young y Heath, 2000).

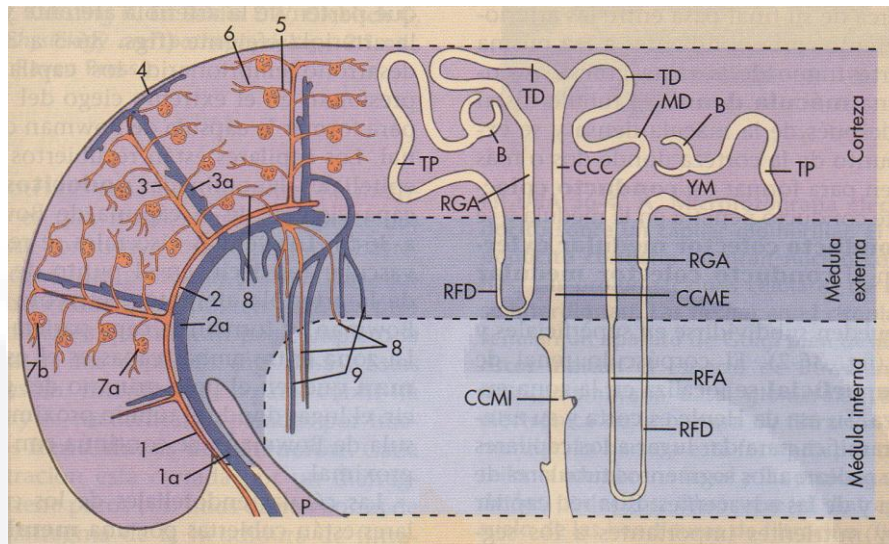


Figura 15 B.- Organización del sistema vascular del riñón y organización de la nefrona.

Numeración y abreviaturas: 1, Arterias interlobulares; 1a, venas interlobulares; 2, arterias arciformes; 2a, venas arciformes; 3, arterias interlobulillares; 3a, venas interlobulillares; 4, vena estrellada; 5, arteriolas aferentes; 6, arteriolas eferentes; 7a, 7b, redes capilares glomerulares; 8, vasos rectos descendentes; 9, vasos rectos ascendentes. A la izquierda se representa una nefrona superficial y a la derecha una nefrona yuxtamedular (YM). El asa de Henle comprende la porción recta del túbulo proximal (TP), la rama fina descendente (RFD), la rama fina ascendente (RFA) y la rama gruesa ascendente (RGA). B, Cápsula de Bowman; CCC, conducto colector cortical; CCME, conducto colector medular externo; CCMI, conducto colector medular interno; MD, mácula densa; P, pelvis; TD, túbulo distal. (Berne y Levy, 2006).

La unidad básica estructural y funcional de los riñones es la nefrona, formada por un sistema de filtración de plasma, llamado glomérulo, y un sistema tubular largo dividido en varias porciones, por donde fluye el filtrado glomerular. Cada segmento del sistema tubular presenta funciones particulares de reabsorción y secreción de diversas sustancias incluyendo los xenobióticos. El producto final de las funciones de la nefrona es la formación de la orina. Los nombres de las diversas porciones tubulares de la nefrona son: túbulo contorneado proximal, asa de Henle, túbulo contorneado distal y túbulo colector (Goodman y Gilman, 2003). (**figuras 15B y 16**). Estas divisiones se basan en la morfología de las células epiteliales de la nefrona (**figura 16**).

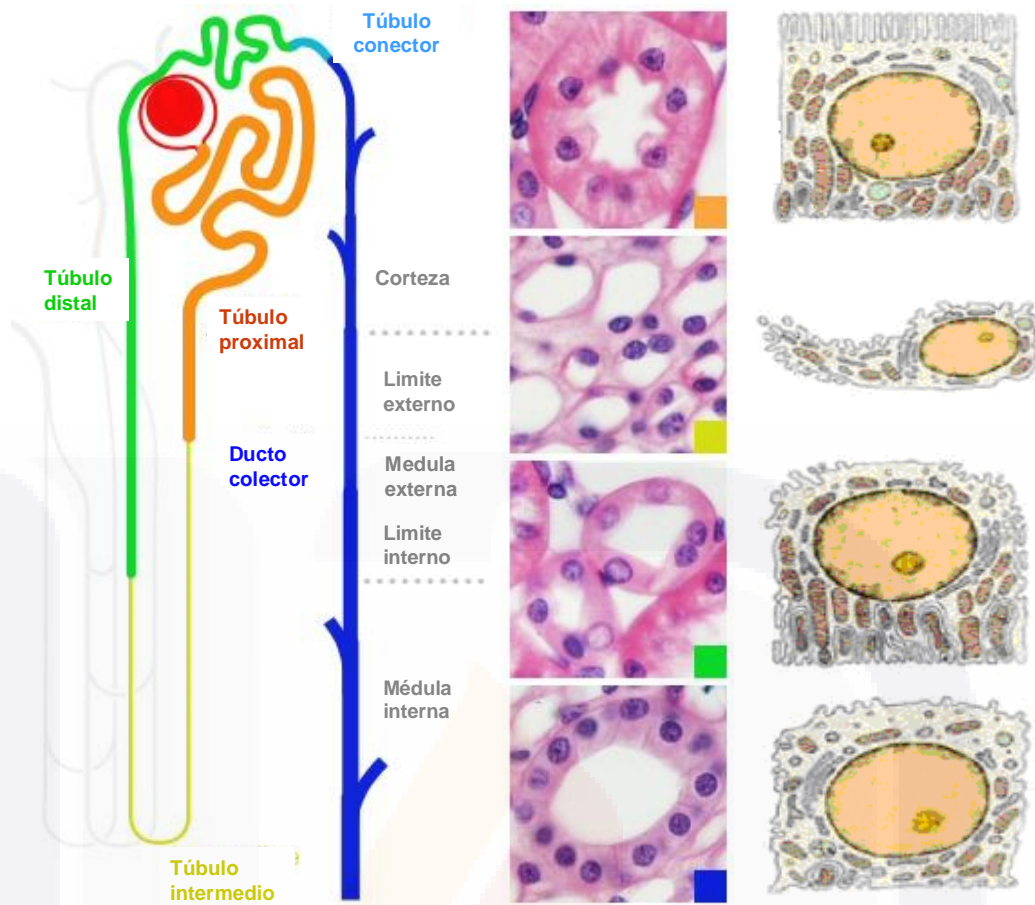


Figura 16.- Diagrama esquemático de la ultraestructura celular de las nefronas. Internet (*Junqueira y Carneiro, Basic Histology, a text and atlas, p. 393, Figure 19-16*) (modificado).

6.2 Organización básica de la nefrona, sistema colector y vasculatura renal.

La formación de orina ocurre a lo largo de la nefrona por tres procesos: a) ultrafiltración del plasma por el glomérulo (filtración glomerular), b) reabsorción de agua y solutos desde el ultrafiltrado (reabsorción tubular) y c) secreción de solutos hacia el líquido tubular (secreción tubular). Estos procesos se desarrollan de manera continua y simultánea (Berne y Levy, 2006).

La regulación hormonal de las funciones renales es de vital importancia para la formación de orina. Entre las hormonas más importantes se encuentran la aldosterona y otras hormonas esteroideas, la eritropoyetina y la hormona antidiurética.

6.3 Insuficiencia renal producida por xenobióticos.

La isquemia renal induce alteraciones funcionales, que dependiendo de su intensidad y duración, producirán diversos grados de lesión, los cuales pueden ser reversibles o irreversibles. Así, la reducción prolongada del flujo sanguíneo disminuirá

la tasa de filtrado glomerular la cual puede ser de aparición brusca, dando lugar a lo que se conoce como insuficiencia renal aguda (IRA), o bien desarrollarse paulatinamente para convertirse en un problema crónico, dando lugar a la insuficiencia renal crónica (IRC) (Jaramillo et al., 2006). En la **Tabla 2** se resumen los tipos de insuficiencia renal, sus causas más frecuentes, los mecanismo involucrados en su desarrollo y los agentes nefrotóxicos más comunes que las producen.

Tabla 2.- Características generales de la insuficiencia renal y ejemplos de xenobióticos que la producen.

INSUFICIENCIA RENAL	PATOGENIA	MECANISMO INVOLUCRADO	AGENTES NEFROTÓXICOS
a)Aguda	Hipoperfusión/hipofiltración Necrosis tubular aguda Bloqueo del flujo del filtrado glomerular Nefritis túbulointersticial	Vasoconstricción renal Lesión glomerular Lesión tubular directa Obstrucción intratubular Inmunitario, inflamatorio	AINES Medios de contraste radiográficos Acetaminofeno Metales pesados Medios de contraste radiográficos β-lactámicos, AINES, tetraciclinas
b)Crónica	Nefritis túbulo intersticial crónica Necrosis papilar	Inmunitario, inflamatorio Isquemia, lesión celular	Cisplatino, Litio, Cadmio, Plomo AINES

Abreviatura: AINES: Anti inflamatorios no esteroideos (Jaramillo et al., 2006).

6.3.1 Insuficiencia renal aguda (IRA).

La IRA es un síndrome caracterizado por el deterioro rápido de la función renal, que origina la acumulación de sustancias nitrogenadas, junto con otras manifestaciones que incluyen alteraciones en la regulación de electrolitos, equilibrio ácido-base, balance de líquidos y oliguria. De acuerdo con la ubicación de la causa, la IRA puede ser de tres tipos: a) prerrenal, b) parenquimatosa, y c) postrenal.

6.3.1.1 IRA prerrenal (azoemia prerrenal). Es la forma más frecuente de insuficiencia renal y puede ser causada por hipotensión sistémica o hipovolemia. En ambos casos, ocurre una disminución en la presión de filtración glomerular. De manera general, en estos casos no ocurre lesión histológica, por lo que al corregir la causa desencadenante se recuperan las funciones renales.

6.3.1.2 IRA parenquimatosa. El daño agudo de los riñones puede originar necrosis tubular aguda (NTA). La necrosis puede ser producida por diversos grados de isquemia secundaria a la acción de sustancias tóxicas sobre las células tubulares que causan daño estructural (IRA nefrotóxica) y secundariamente por alteraciones en las funciones glomerulares y del sistema capilar peritubular. Las lesiones, dependiendo del daño, pueden ser reversibles una vez que se han eliminado los agentes nefrotóxicos.

Las células de los túbulos proximales son más propensas al daño producido por la isquemia, debido a que su metabolismo depende exclusivamente de la fosforilación oxidativa mitocondrial para la síntesis de ATP. La isquemia celular produce alteraciones en el transporte de iones y en la integridad de las membranas, conduciendo a la necrosis celular. Las funciones de las células epiteliales se alteran durante la isquemia, sin embargo, las lesiones mediadas por los radicales libres son mayores durante la perfusión y la reoxigenación del tejido.

Los agentes nefrotóxicos se concentran en la luz tubular debido al proceso de absorción tubular de agua, por lo que la porción luminal de las células tubulares quedan expuestas a elevadas concentraciones de estas sustancias. La acción xenobiótica dependerá de la naturaleza del tóxico, de su concentración, de la duración de la exposición, así como de otras condiciones como la afinidad de estos compuestos por los diferentes componentes celulares.

En algunos casos, los xenobióticos interfieren con la secreción normal tubular de aniones y cationes orgánicos debido a que tienen la propiedad de unirse al epitelio tubular, interfiriendo con los sistemas de secreción tubular. Por ejemplo: el cadmio (Kim et al, 1998), el antioxidante etoxiquina y el insecticida organofosforado paratión.

6.3.1.3 IRA postrenal (obstructiva). Se produce por la obstrucción de las vías urinarias en el trayecto que va de la pelvis renal a la uretra. En este caso, la acumulación de orina aumenta retrógradamente la presión intraluminal de los túbulos de la neurona, lo que disminuye la tasa de filtración glomerular.

Por otra parte, durante la falla renal aguda, la unión corticomedular ha sido identificada como un lugar particularmente susceptible de daño (principalmente la porción descendente del túbulo proximal y la porción medular ascendente gruesa del asa

de Henle) debido a que es una zona de alta actividad metabólica (por la reabsorción activa de sodio), flujo sanguíneo y tensión de oxígeno bajos.

6.3.2 Insuficiencia renal crónica (IRC).

Muchas formas de daño renal agudo progresan hacia la insuficiencia renal crónica. A diferencia del daño renal agudo, el daño renal crónico frecuentemente es irreversible y se caracteriza por destrucción progresiva de las nefronas, acompañado de hipertrofia estructural y funcional de las nefronas restantes. Los cambios adaptativos del sistema vascular generan aumento de la presión en los capilares glomerulares y, en consecuencia, se incrementa también la presión neta de filtración. Otras características de la adaptación son el aumento del volumen glomerular así como la longitud y diámetro tubular, especialmente de la porción proximal. Sin embargo, estas adaptaciones no son efectivas a largo plazo porque predisponen al aumento de trabajo y a la esclerosis de los glomérulos menos afectados, lo que a su vez conduce a su destrucción final.

El impacto final de la IRC es el deterioro de las funciones de los diversos sistemas orgánicos debido al acumulo de los diversos productos finales del metabolismo. Por otra parte, la insuficiencia renal suele acompañarse de malnutrición grave, alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, así como el uso ineficiente de la energía.

El balance del sodio se puede mantener normal hasta las etapas tardías de la IRC. Los riñones también son capaces de mantener el equilibrio normal de agua, aunque con la insuficiencia disminuye su capacidad para concentrar la orina causando poliuria. La eliminación urinaria de potasio aumenta a causa de la disminución de la reabsorción tubular. En fases avanzadas de la IRC, se puede mantener la concentración normal de potasio plasmático, sin embargo, como en el caso del sodio, existe muy poca reserva renal para adaptarse a los cambios de consumo de potasio en la dieta.

Cuando la tasa de filtrado glomerular es muy baja, se alteran los mecanismos renales para el mantenimiento del equilibrio ácido-básico, en la que prevalece el pH bajo. En fases avanzadas de la IRC, la acidosis renal se debe a la retención de fosfatos, sulfatos y otros aniones. El avance hacia la insuficiencia renal crónica se relaciona principalmente con procesos fisiopatológicos desencadenados por la lesión inicial.

6.4 Sitios de daño y acciones nefrotóxicas de los xenobióticos.

Algunos xenobióticos pueden actuar en sitios específicos de la nefrona y afectar de manera selectiva su estructura o función. El daño selectivo es un fenómeno complejo que puede ser atribuido a diferentes causas, entre ellas, las diferencias del flujo sanguíneo regional, el transporte y acumulación de los xenobióticos en las células, la reactividad de los receptores celulares, el equilibrio de reacciones de bioactivación-destoxificación, el metabolismo energético y la eficacia de los mecanismos de regeneración y reparación celular (Jaramillo et al., 2006).

6.4.1 Sitios de daño.

6.4.1.1 Glomérulos. Los xenobióticos pueden funcionar como haptenos al fijarse, mediante interacciones electrostáticas, a las cargas aniónicas de los capilares glomerulares, lo que desencadena la formación de anticuerpos por el sistema inmune. Luego, las reacciones de los anticuerpos con los antígenos de superficie celular conducen a la formación de depósitos inmunitarios, respuesta inflamatoria y daño glomerular.

6.4.1.2 Túbulos proximales. Son el sitio con mayor frecuencia de daño renal por los xenobióticos. Esto se debe parcialmente a la acumulación selectiva de las sustancias químicas en este segmento de la nefrona. La secreción de aniones, cationes orgánicos, transporte celular de metales pesados y sustancias conjugadas con glutatión (GSH) permiten su acumulación en las células tubulares proximales (Fowler, 1996; Tang y Shaikh, 2001). La reactividad de los xenobióticos con los blancos moleculares subcelulares determina su toxicidad. Además, la bioactivación de sustancias por el citocromo-P450 se realiza principalmente en este segmento de la nefrona.

6.4.1.3 Asa de Henle, túbulos distales y túbulos colectores. El daño producido por los xenobióticos a las estructuras más lejanas de los túbulos es poco frecuente. En estos sitios, los cambios funcionales se manifiestan principalmente como alteraciones del transporte de sodio y de la capacidad de concentración y acidificación de la orina. Cuando el filtrado glomerular alcanza la porción medular del túbulo colector, la urea se mueve hacia el intersticio de las pirámides aumentando la osmolalidad. En el túbulo colector, la absorción de agua es facilitada por la AVP, afectando secundariamente las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

concentraciones de urea en el intersticio medular. Por el contrario, cuando el líquido tubular llega a los tubos colectores medulares muy diluidos, en ausencia de vasopresina, la urea se mueve desde el intersticio hacia el lumen tubular, lo que disminuye el gradiente osmótico en el intersticio de las pirámides. La cantidad de urea en el intersticio medular y en la orina varía con la cantidad de urea filtrada y esto varía con la ingesta dietética de proteínas. Por tanto, una dieta abundante en proteínas incrementa la capacidad de los riñones para concentrar la orina (Jaramillo et al, 2006).

En los túbulos distales hay dos porciones: la cortical y la medular, a través de las cuales el filtrado pasa desde la corteza a la pelvis renal. Los cambios en la osmolalidad y el volumen de agua que se reabsorbe en los conductos colectores dependen de la cantidad de AVP que actúa sobre dichos túbulos. La AVP proveniente de la hipófisis posterior incrementa la permeabilidad de los túbulos colectores al agua. La AVP induce en la porción medular antidiuresis máxima; el filtrado glomerular en este punto es hipotónico, por lo que en presencia de AVP, el agua se mueve al espacio intersticial desde donde pasa a los capilares peritubulares, produciéndose así una orina concentrada. De lo contrario en ausencia de AVP, el epitelio de los túbulos colectores resulta impermeable al agua y por tanto el líquido permanece hipotónico fluyendo así grandes cantidades de filtrado a la pelvis renal en forma de orina diluída (Bowman y Rand, 1984).

Es importante mencionar que existen diferentes tipos de diuresis como la diuresis acuosa y osmótica. Entre los fármacos que producen toxicidad aguda en las partes más distales de la nefrona se encuentran la anfotericina B, el cisplatino y el metoxifluorano. Estos medicamentos inducen poliuria resistente a la acción de la hormona antidiurética.

Otros compuestos que producen efecto diurético son los que se muestran a continuación:

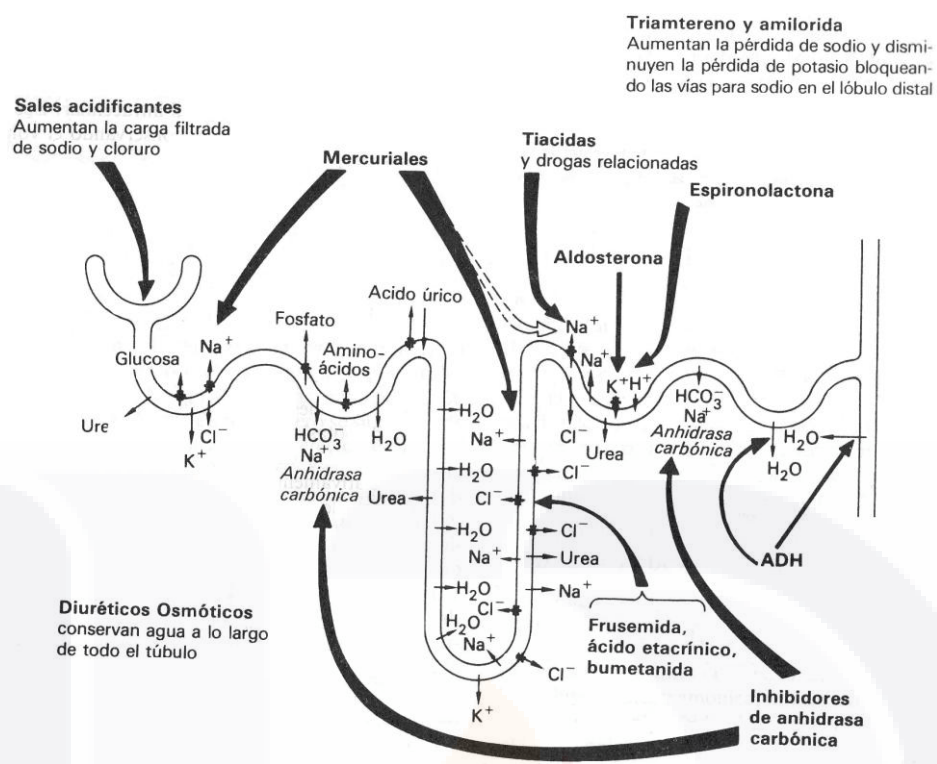


Figura 17.- Resorción de los constituyentes del líquido tubular en la nefrona y probables lugares de acción de las principales clases de diuréticos. El transporte activo de constituyentes de líquido tubular está indicado por +- . (Bowman y Rand, 1984)

Los riñones pueden ser dañados de manera aguda o crónica por muchos xenobióticos, los cuales actúan de diferentes maneras. En la tabla 3 se presentan algunos de los mecanismos generales de daño producidos por estas sustancias.

Tabla 3.- Sitios de daño y mecanismos generales de nefrotoxicidad de los xenobióticos.

MECANISMOS DE NEFROTOXICIDAD	SITIOS DE DAÑO	XENOBIÓTICOS
1) Alteraciones del flujo sanguíneo renal	Las sustancias químicas pueden afectar la reactividad de los vasos sanguíneos, alterando el FSR y disminuyendo la VFG	AINES Bloquean la síntesis de prostaglandinas vasodilatadores en los riñones
2) Acción tóxica en las células tubulares	Los xenobióticos entran en contacto con las células tubulares mediante procesos de reabsorción y secreción. Así, pueden dañar: organelos, enzimas, la síntesis de ATP, etc., y generar daño funcional o muerte celular	Aminoglucósidos Micotoxinas Metales pesados Tetracloruro de carbono
3) Daño inmunológico	Al actuar como haptenos, las sustancias químicas pueden dañar los glomérulos y las células intersticiales	Meticilina Rifampicina
4) Obstrucción de túbulos o ureteros	Los xenobióticos pueden precipitarse y formar cristales en la luz de los túbulos de la nefrona o en los ureteros, al concentrarse la orina o	Sulfonamidas Metisergida

	cambiar el pH del filtrado glomerular	
5)Acción cancerígena	Algunas sustancias o sus metabolitos pueden generar cáncer	Paracetamol Aflatoxinas

Abreviaturas. FSR: Flujo sanguíneo renal, VFG: velocidad de filtración glomerular y AINES: Anti Inflamatorios no esteroideos (Jaramillo et al., 2006).

6.4.2 Daño renal por los xenobióticos.

El daño renal por los xenobióticos puede ocurrir por diferentes mecanismos (Jaramillo et al., 2006), entre los que se encuentran:

6.4.2.1 Estrés oxidativo y sustancias alquilantes. Algunos xenobióticos son biotransformados en intermediarios reactivos (agentes alquilantes) capaces de producir daño celular. Los metabolitos con deficiencia de electrones (electrófilos) se unen covalentemente a compuestos nucleófilos (con alto contenido de electrones) de las células, como proteínas y lípidos. Esto interfiere la actividad biológica de las macromoléculas iniciándose así el daño celular. Además, ciertas sustancias pueden inducir estrés oxidativo al aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), como el anión superóxido y los radicales hidroxilo. Las ERO reaccionan con diversos componentes de las células induciendo daño tóxico por mecanismos como: 1) peroxidación de lípidos, fenómeno que modifica la fluidez, permeabilidad y el transporte membranar, 2) inactivación de enzimas de oxidación de grupos sulfidril o amino de las proteínas de membrana, 3) despolimerización de polisacáridos y 4) rotura de cromosomas y filamentos de ADN. Cada uno de estos mecanismos puede producir lesión o muerte celular.

6.4.2.2 Alteración del volumen celular y la homeostasis de iones. Algunos tóxicos pueden alterar el volumen de agua y la concentración intracelular de iones al interactuar con la membrana plasmática alterando su permeabilidad iónica o inhibiendo la producción de energía; por ejemplo, la pérdida de ATP disminuye o inhibe la función de los transportadores iónicos a través de la membrana, por ejemplo, cuando disminuye la concentración intracelular de ATP, disminuye también la actividad de la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPasa, lo que genera salida de iones de K^+ , entrada de iones de Na^+ y Cl^- lo que causa tumefacción y lisis celular.

6.4.2.3 Modificación del citoesqueleto y la polaridad celular. Algunas sustancias dañan la membrana plasmática mediante: 1) pérdida del borde en cepillo, 2) formación de vesículas y 3) alteración de la polaridad. Esto puede ser causado por los xenobióticos que actúan en los componentes del citoesqueleto y por interacciones entre éste y la membrana plasmática, por alteraciones del metabolismo energético y alteraciones de la homeostasis del Ca^{+2} y de los fosfolípidos.

6.4.2.4 Alteración de las mitocondrias y los lisosomas. Ciertos xenobióticos producen disfunción de las mitocondrias, lo que daña los procesos celulares que dependen de ATP. A su vez, los lisosomas son el blanco de diversas sustancias que inducen daño celular al romper su membrana y liberar enzimas proteolíticas. La liberación de proteasas (hidrolasas) hacia el citosol degrada sustratos como proteínas de membrana y del citoesqueleto, lo que puede conducir a la muerte de la célula. Entre las sustancias que afectan a los lisosomas se encuentran los aminoglucósidos y la gasolina sin plomo.

6.4.2.5 Cambio en la concentración de calcio intracelular. El calcio (Ca^{+2}) participa en diversas funciones celulares. Su concentración en el citoplasma se mantiene en contra de un gradiente de concentración muy grande (10,000:1) por medio de bombas y canales localizados en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico. El aumento de concentración del Ca^{+2} libre intracelular activa fosfolipasas y proteasas, además, puede producir alteraciones de la estructura y función del citoesqueleto.

6.4.2.6 Activación de las fosfolipasas. Se ha sugerido que la activación de la fosfolipasa A_2 (PLA_2), familia de enzimas que hidrolizan el enlace acilo de los fosfolípidos, generan ácido araquidónico y lisofosfolípidos que poseen actividad tóxica para las células, al alterar la permeabilidad de la membrana y desacople de la respiración mitocondrial. Sin embargo, la participación de la PLA_2 en el daño celular es controvertida, ya que no es claro si los cambios en la actividad de la enzima son causa de lesión y muerte celular, o consecuencia de las mismas.

6.4.2.7 Activación de las endonucleasas. Se ha postulado que su activación participa en la muerte celular. Después de la isquemia renal se ha observado la formación de estructuras escalonadas en el ADN, un marcador de activación de endonucleasas, lo que

se ha relacionado con necrosis celular en riñones isquémicos de ratas y segmentos de túbulo proximales de nefronas aisladas luego de un estado de hipoxia.

6.5 Xenobióticos nefrotóxicos.

Los metales pesados, los hidrocarburos halogenados, los destilados del petróleo, las micotoxinas y diversos medicamentos, son algunas de las muchas sustancias que afectan adversamente a los riñones. Muchos de estos compuestos también ejercen acciones nocivas en otros órganos y tejidos (Raucy et al., 1993). En el tabla 4 se presentan algunos efectos renales tóxicos causados por xenobióticos y sus mecanismos de acción.

Tabla 4. Efectos renales tóxicos producidos por los xenobióticos

EFFECTOS RENALES	CAUSAS
Aumento volumen urinario Disminución de la osmolalidad	Alteraciones de la capacidad de los riñones para concentrar orina (posible deficiencia de ADH). Ejemplos: colchicina, vinblastina y vincristina
Glucosuria (aumento de la concentración de glucosa en orina)	Daño producido por los xenobióticos sobre la reabsorción proximal de glucosa. Ejemplos: metales pesados y tetraciclinas caducas
Albuminuria (presencia de albúmina en la orina)	Daño en los capilares glomerulares (permeabilidad aumentada). Ejemplo: cadmio
Excreción urinaria de proteínas de peso molecular bajo (β_2 -microglobulinas)	Lesión en las células de los túbulo proximales. Ejemplos: aminoglucósidos
Aumento concentraciones de urea y creatinina en la sangre	Disminución de la velocidad de filtración de la sangre en los glomérulos. Ejemplo: cromo

(Jaramillo et al., 2006)

Es importante aclarar que el aumento de las concentraciones séricas de urea y creatinina no necesariamente reflejan daño renal, ya que también se presentan en estados de deshidratación y cuando aumenta el catabolismo de las proteínas.

En ratas macho la urea sanguínea está entre 5 y 29 mg/dL, la concentración de albúmina (ALB) está entre 2.70 y 5.10 g/dL (Gad y Chengelis, 1992).

En el tabla 5 se describen algunas enzimas cuyas alteraciones indican daño renal por xenobióticos.

Tabla 5. Enzimas utilizadas en estudios de nefrotoxicidad

SITIO DE DAÑO	SUSTANCIA TÓXICA	ENZIMA
Glomérulos	Anticuerpos anti-membrana basal	Calicreína
Túbulo proximal	Cloruro mercuríco	Fosfatasa alcalina
	Cadmio	γ -glutamyltranspeptidasa
Túbulo distal	Folatos	Lactato deshidrogenasa
Papila	Etileneimina	N-Acetilglucosaminidasa

(Bach et al., 1982)

7. LA SANGRE.

La sangre contiene un 78% de agua y un 22% de elementos sólidos. En ella se distinguen elementos formes en los que se incluyen los hematíes, leucocitos y plaquetas y un elemento líquido, el plasma de color ámbar y transparente, formado en un 90% de agua. En él se encuentran una gran diversidad de sustancias, como proteínas, vitaminas, hormonas, lípidos, glúcidos, diversos iones, sustancias minerales, etc.

7.1 Glóbulos rojos.

Son las células sanguíneas más abundantes de la sangre. En la rata su diámetro es de 6.3 μm y su conteo es de $8.9 \times 10^6/\text{mm}^3$ (RGR) (Waynforth y Flecknell, 1992), en ratas Wistar/Lewis albino el conteo de glóbulos rojos (RGR) esta entre 7.20 y 9.60 $\times 10^6/\text{mm}^3$ y el valor del hematocrito (Hto) está entre 42.5 y 49.4 % (Gad y Chengelis, 1992).

Su función principal es el transporte de oxígeno, por medio de la hemoglobina (Hb), desde los pulmones a los tejidos y en menor grado de CO_2 , desde los tejidos a los pulmones. En condiciones normales los glóbulos rojos tienen el mismo tamaño y forma redondeada y bicóncava (cuando se ven de perfil). En algunas condiciones patológicas se altera la forma, el color y el tamaño. En ocasiones presentan inclusiones como: los cuerpos de Hoxell Holy, los corpúsculos de Heinz, y el puentado basófilo. La Hb consta de cuatro cadenas de globina semejantes y cuatro moléculas de grupos heme. Las moléculas heme se sintetizan en las mitocondrias de los eritroblastos a partir del aminoácido glicina y del ácido succínico. Para su síntesis, se requiere de la acción de la enzima ala-sintetasa y como coenzima a la vitamina B_6 , formándose una serie de precursores del grupo heme llamados porfirinas. Para que el grupo heme esté completamente formado, en la última porfirina de la cadena, la protoporfirina III, se

incorpora un átomo de hierro en forma ferrosa (previamente transportado al interior de la célula por la transferrina) (Baker et al., 1979). En la rata Wistar la hemoglobina presenta 5 cadenas de globina, 2 son cadenas alfa no alélicas y 3 son cadenas beta, aunque solo 4 aparecen durante la etapa adulta. Su concentración es de 11.4 a 19.2 mg/dl y varía en función de la cepa, edad, sexo y estado de salud de los animales. En ratas Wistar/Lewis albino la concentración de hemoglobina está entre 12 y 17.5 g/dL (Gad y Chengelis, 1992).

7.1.1 Catabolismo de los hematíes. Cuando los eritrocitos han envejecido ocurren cambios en su estructura que favorecen su ruptura y fagocitosis principalmente por los macrófagos de la médula ósea y el bazo. La Hb liberada se divide en globina y grupos heme. La Hb se degrada en sus aminoácidos componentes, mientras que el grupo heme pierde el hierro, que es transferido al plasma y de ahí a la médula ósea, donde se incorpora a los eritroblastos para ser utilizado en la síntesis de hemoglobina.

Cuando la Hb une una molécula de oxígeno se le llama oxihemoglobina y cuando se une el CO₂ se llama carboxihemoglobina. Al perder el hierro, el grupo heme se transforma (por una serie de pasos), en bilirrubina, que pasa al hígado en forma libre (bilirrubina indirecta) unida a la albúmina; ahí se conjuga con ácido glucurónico (bilirrubina conjugada o directa) para ser eliminada, por la bilis a las heces en forma de estercobilina, o bien, por vía renal en forma de urobilina (Casas et al., 1994).

7.1.2 Alteraciones eritrocitarias. A la disminución de hemoglobina funcional total circulante, con o sin disminución de glóbulos rojos se define como anemia. Las anemias pueden clasificarse en base a dos criterios (Casas et al., 1994): índices eritrocitarios y etiopatogenia.

Los índices eritrocitarios están en función del volumen corpuscular medio (VCM) y de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). En este contexto, las anemias se pueden clasificar en microcíticas, normocíticas y macrocíticas, y en normocromas e hipocromas. En ratas Wistar/Lewis albino el VCM está entre 57 y 65 v³, el valor de hemoglobina corpuscular media (HCM) está entre 14.6 y 21.3 vvg, la CHCM está entre 26 y 38% (Gad y Chengelis, 1992).

De acuerdo a la etiopatogenia (clasificación más importante conceptualmente) existen dos grandes grupos: anemias regenerativas y anemias no-regenerativas (Casas et al., 1994).

La causa de las anemias regenerativas o periféricas es periférica, se da una desaparición acelerada de hematíes circulantes ya sea por hemorragia (aguda o crónica) o destrucción excesiva (hemólisis). Las anemias hemolíticas son congénitas (membranopatías, enzimopatías y hemoglobinopatías) o adquiridas (ya sea por procesos mecánicos, inmunitarios, tóxicos o parasitarios).

La causa de las anemias no-regenerativas o anemias centrales se da por alteraciones en la médula ósea, en las que se presenta una insuficiente producción cuantitativa o cualitativa de glóbulos rojos. Se dividen en: 1) trastornos cuantitativos de la eritropoyesis (aplasia medular e insuficiencia renal crónica) y 2) trastornos cualitativos de la eritropoyesis: ferropénicas, megaloblásticas (anemias carenciales) y anemias diseritropoyéticas.

7.2 Leucocitos.

Son las únicas células sanguíneas que poseen núcleo y se clasifican según sus características morfológicas en:

- 1.- *Granulocitos*: Polimorfonucleares Neutrófilos, eosinófilos y basófilos.
- 2.- *Agranulocitos Mononucleares*: Linfocitos y monocitos.

7.2.1 Neutrófilos.

Los PMN son células de aprox. 11 μ m de diámetro. El núcleo es enrollado o torcido con apariencia multilobulada. Los gránulos citoplásmicos se tiñen de manera característica con las tinciones de Wright y Giemsa. En la rata, los gránulos son menos densos que en otras especies y poseen las enzimas fosfatasa alcalina y peroxidasas (Baker et al., 1979).

Los neutrófilos se originan en la médula ósea a partir de una célula madre y, después de diferentes estadios de maduración, pasa al torrente circulatorio. En el humano, la vida media de los neutrófilos, desde sus precursores identificables en la médula ósea hasta su muerte, oscila entre los 10 y 14 días, sin embargo, solo 7 horas aproximadamente circulan en la sangre periférica. Esto es debido a que la función principal de los neutrófilos se realiza en los tejidos. Cuando los neutrófilos pasan a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

estos, no regresan a la circulación. Los neutrófilos muertos son fagocitados por los macrófagos (Casas et al., 1994).

La función principal de los neutrófilos es la defensa del organismo contra las infecciones mediante el fenómeno de la fagocitosis, fenómeno que ocurre en los tejidos, fuera de la circulación.

En la rata, la leucocitosis neutrofílica se refiere a un aumento absoluto de neutrófilos sanguíneos por encima del valor normal de $2.4 \times 10^3/\text{mm}^3$ (Waynforth y Fecknell, 1992). La neutrofilia puede establecerse por varias razones:

- 1.- Aumento en su producción en la médula ósea: tiene lugar en infecciones, inflamaciones, neoplasias y administración de litio.
- 2.- Incremento en la secreción de glucocorticoides.
- 3.- Desplazamiento de neutrófilos desde los vasos sanguíneos periféricos, ejercicio físico, periodo postprandial, secreción de adrenalina, etc.

Se considera que existe neutropenia cuando el número absoluto de neutrófilos en sangre periférica está por debajo de $1500/\text{mm}^3$. El término agranulocitosis se utiliza para las neutropenias graves provocadas por fármacos (Casas et al., 1994).

7.2.1.1 Neutropenias (disminución de neutrófilos circulantes). Según su gravedad se dividen en tres grados: leves, moderadas y graves. Las neutropenias pueden ocurrir por:

- 1.- Disminución de la producción por la médula ósea o defectos en su liberación a la sangre.
- 2.- Aumento de utilización y paso rápido de la sangre a los tejidos.

Sea cual sea la causa que provoca esta deficiencia, la neutropenia favorece la tendencia a las infecciones.

La agranulocitosis está asociada a medicamentos y otros xenobióticos como el cloranfenicol, el tiouracilo y la fenilbutizona. Este tipo de neutropenia es precoz e intensa. Si el tratamiento se prolonga, induce daño hepático y septicemia.

En ratas Wistar/Lewis albino el porcentaje de neutrófilos está entre 9 y 34% del total de leucocitos (Gad y Chengelis, 1992).

7.2.2 Eosinófilos.

Estas células de tamaño semejante a los neutrófilos, contienen un núcleo que en la rata, es anular. Su concentración en sangre periférica es del 1% del total de leucocitos. Los gránulos citoplásmicos son grandes y redondos y usualmente llenan el citoplasma (Baker et al., 1979). Los gránulos poseen numerosas enzimas como la fosfolipasa D y lisofosfolipasa. En ratas Wistar/Lewis albino el porcentaje de eosinófilos está entre 0 y 2.50% del total de leucocitos (Gad y Chengelis, 1992).

7.2.3 Basófilos.

Los basófilos son los granulocitos más pequeños (10 a 14 μm) de la sangre periférica. Presentan un núcleo que posee generalmente dos o tres lóbulos unidos por puentes cromatínicos. Poseen gránulos ricos en mucopolisacáridos, ácidos sulfatados, histamina, heparina, glucógeno, peroxidasa y fosfatasa ácida. No poseen fosfatasa alcalina. Son equivalentes circulantes de las células cebadas, estas últimas, se encuentran en los espacios perivascuales. En estos lugares, presentan algunas diferencias en la composición granular.

Los basófilos participan como mediadores de las respuestas inflamatorias, en especial las de hipersensibilidad, en donde la histamina, que es liberada bajo estímulos apropiados juega un papel preponderante. Además en su membrana poseen receptores capaces de fijar anticuerpos IgE, que al activarse provocan la degranulación celular.

En ciertas circunstancias, como en infecciones, intoxicación por drogas o venenos, quemaduras, algunos tipos de anemia, leucemias, defectos genéticos y pueden presentar alteraciones morfológicas (Casas et al., 1994). En ratas Wistar/Lewis albinos el porcentaje de Basófilos está entre 0 y 1.50% del total de leucocitos (Gad y Chengelis, 1992).

7.2.4 Monocitos.

En la sangre periférica, son más grandes que los leucocitos. Tienen un núcleo enrollado, abundante citoplasma y algunas granulaciones azurofilícas. En ocasiones puede ser difícil distinguir entre los monocitos y linfocitos grandes. En la rata, los monocitos tienen características generales semejantes a los de otras especies animales (Baker et al., 1979). Son de forma variable, redondos, ovalados o con seudópodos.

El núcleo es central o excéntrico, de forma oval o en herradura, de cromatina laxa y lineal, y está desprovisto de nucleolos. El citoplasma es amplio y con un número variable de granulaciones. Estas granulaciones son de dos tipos: primarias, que contienen peroxidada, fosfatasa ácida y arilsulfatasa; y secundarias, que no contienen peroxidasa, fosfatasa alcalina ni lactoferrina.

Los monocitos se producen en la médula ósea y, en un plazo aproximado de 24 horas pasan a la sangre, en donde permanecen entre 4 y 10 horas, para luego migrar a los tejidos, en donde se convierten en macrófagos (Casas et al., 1994).

La función principal de los monocitos y macrófagos es la fagocitosis, que realizan de manera semejante a los neutrófilos. Actúan como defensa contra microorganismos, en la eliminación de células viejas, dañadas o tumorales y como células presentadoras de antígenos

Se considera que en la rata hay monocitosis cuando las cifras sanguíneas están por arriba de $0.02 \times 10^3/\text{mm}^3$ (Waynforth y Flecknell, 1992). La monocitosis puede ocurrir en respuesta a algunos xenobióticos.

En ratas Wistar/Lewis albino el porcentaje de monocitos está entre 0 y 5% del total de leucocitos (Gad y Chengelis, 1992).

7.2.5 Linfocitos.

Según su tamaño se clasifican en grandes y pequeños, con diámetros que van de 6 a 15 μm . En la rata constituyen el 75% de los leucocitos circulantes en donde predominan los linfocitos pequeños. Los núcleos de los linfocitos poseen una cromatina de apariencia gruesa. El citoplasma puede ser escaso o abundante y se tiñe de color que va de un azul oscuro a azul pálido con el colorante de Wright. Al igual que los monocitos, también contienen gránulos azurofílicos (Baker et al., 1979).

En su forma madura, los linfocitos pequeños constituyen la mayor parte de la población linfocitaria. El núcleo ocupa la mayor parte del área celular, su cromatina es condensada y presenta varios nucleolos. El citoplasma puede poseer gránulos. Los linfocitos grandes son de tamaño heterogéneo, con núcleos ligeramente mas grandes que el de los linfocitos pequeños. La diferencia de tamaño celular se debe a la mayor cantidad de citoplasma. La cromatina nuclear es semejante a la de los linfocitos pequeños y el núcleo puede tener una pequeña depresión.

Tanto los linfocitos pequeños como los grandes son subpoblaciones funcionales que se dividen en tres grupos: linfocitos T, linfocitos B y linfocitos asesinos naturales (NK). Estas tres subpoblaciones tienen características que permiten diferenciarlos, ya que poseen diferentes tipos de enzimas, receptores de superficie y antígenos de membrana.

Aunque morfológicamente no se pueden tipificar con seguridad, se sabe que los NK pertenecen a la población de linfocitos grandes granulosos y están relacionados con la inmunidad innata.

7.2.5.1 Funciones de los linfocitos. Son las principales células implicadas en la inmunidad adquirida, que en colaboración con otras células del sistema inmune (células presentadoras de antígenos), sus receptores membranales reconocen diferentes determinantes antigénicos. La estimulación de los linfocitos B, en colaboración con los linfocitos T cooperadores, da lugar a la formación de anticuerpos.

Las diferentes subpoblaciones de linfocitos T, a través de las interleucinas (mediadores solubles producidos principalmente por los linfocitos), regulan las funciones inmunitarias (activación, supresión, citotoxicidad, etc.). En ratas Wistar/Lewis albina el porcentaje de linfocitos está entre 65 y 84.5% del total de leucocitos (Gad y Chengelis, 1992).

7.2.6 Plaquetas.

También llamadas trombocitos, son células desprendidas del citoplasma de los megacariocitos adultos. Son los elementos formes más pequeños entre 1 y 4 μm y están desprovistas de núcleo, solamente son fragmentos celulares. En frotis sanguíneos se observan a menudo aglomeradas, debido a su gran capacidad de agregación. La vida media de las plaquetas es aproximadamente de 8-11 días. En la sangre periférica se presentan como células discoidales, ovaladas, redondeadas o fusiformes y de superficie lisa. Las plaquetas están formadas por cuatro capas: zona periférica o membrana citoplásmica, capa de sol-gel, zona de organelos, y sistema de membranas.

Las plaquetas intervienen en la coagulación sanguínea (hemostasia). Forman los llamados tapones hemostáticos primarios y participan en la hemostasia secundaria (Casas et al., 1994). En ratas Wistar/Lewis albino el conteo plaquetario está entre 160 y 470 $\times 10^3/\text{mm}^3$ (Gad y Chengelis, 1992).

JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de fármacos para uso terapéutico ha constituido un aspecto fundamental en el avance de la medicina. En este contexto, es de interés estudiar fármacos que sirvan para tratar enfermedades en las que la AVP juega un papel fundamental.

Debido al potencial uso del POLI-1 como fármaco para el tratamiento de alteraciones relacionadas con la AVP, fundamentando en los estudios de anclaje (*docking*) que muestra una gran afinidad entre el POLI-1 y los receptores de AVP y en la semejanza entre los sitios activos de la molécula del POLI-1 y los antagonistas no peptídicos de AVP, es importante estudiar las propiedades farmacológicas y toxicológicas de este compuesto sobre aquellos tejidos que sabe poseen receptores de AVP como el hígado, riñón y sistema inmune.

HIPÓTESIS

Si el POLI-1 tiene efectos tóxicos, los daños serán más evidentes en los órganos que se encargan de eliminarlo del cuerpo (hígado y riñón) y en los tejidos que se sabe poseen receptores de AVP (riñón, hígado y sistema inmune), por lo que su administración dará lugar a cambios en la bioquímica y en la histología de los tejidos y órganos afectados en función de la dosis.



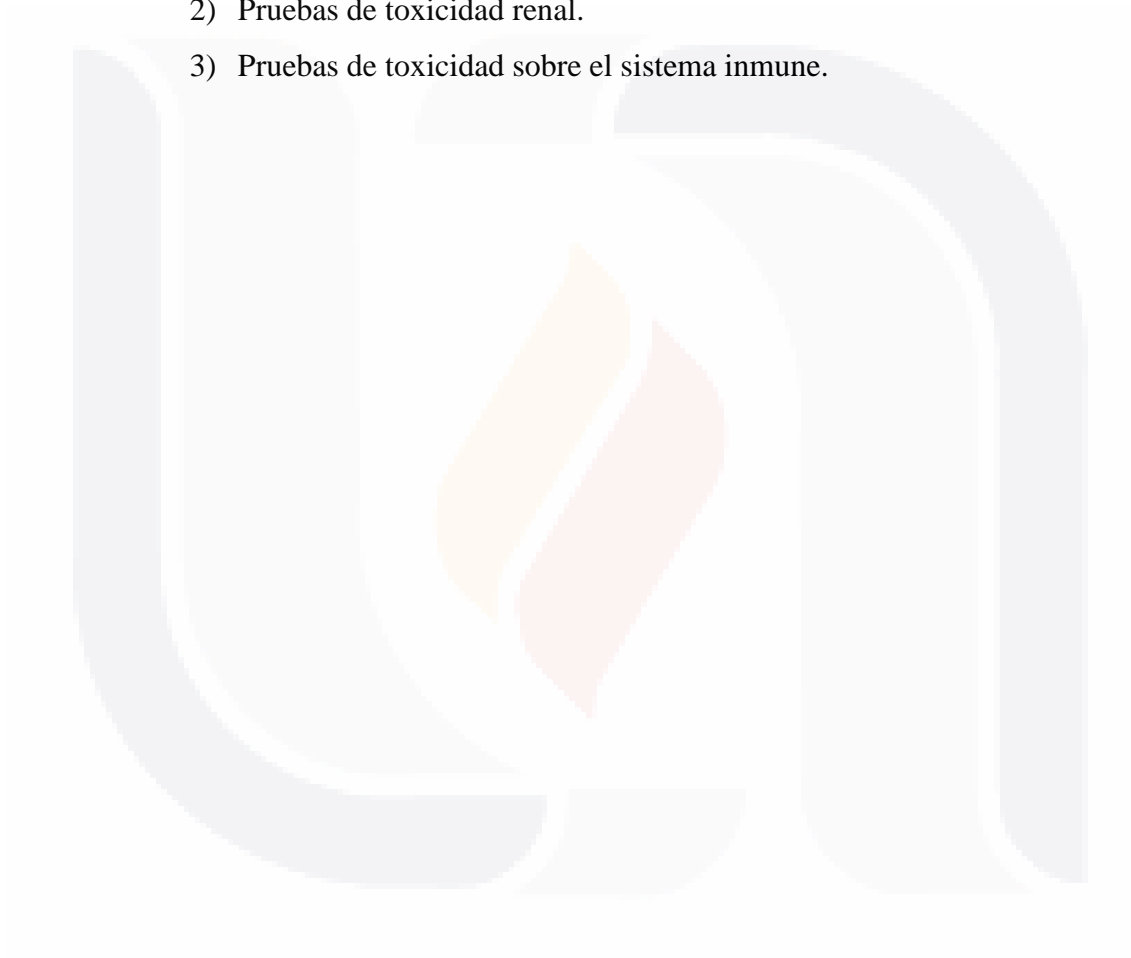
OBJETIVO GENERAL

Estudiar la toxicidad aguda del POLI-1 sobre el hígado, riñón y sistema inmune.

OBJETIVOS PARTICULARES

Estudiar la toxicidad aguda del POLI-1 a través de:

- 1) Pruebas de toxicidad hepática.
- 2) Pruebas de toxicidad renal.
- 3) Pruebas de toxicidad sobre el sistema inmune.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

METODOLOGÍA

1. Animales.

Ratas machos de la cepa Lewis de entre 250 – 300 g de peso corporal fueron utilizadas en este proyecto. Los animales se mantuvieron en el bioterio en condiciones controladas de temperatura (22-24°C) y ciclos de 12 horas luz-12 horas oscuridad (encendido a las 7 de la mañana). La dieta consistió en alimento para rata (Purina Chow) y agua corriente *ad libitum*. Los animales se trataron de acuerdo a los estándares de cuidados humanitarios aceptados internacionalmente “Guide to care and use of laboratory animals, ILAR (USA), 1996”.

2. Grupos.

Los grupos se formaron de 12 animales cada uno:

- 1) CONTROL INTACTO
- 2) Control Dimetilsulfóxido (DMSO) (dosis única de 100 µL vía intramuscular (I.M.) y sacrificio a las 24 horas.
- 3) POLI-1 (dosis única de 4 mg/kg de peso corporal (P.C.)/ I.M. y sacrificio a las 24 horas).
- 4) POLI-1 (dosis única de 8 mg/kg de P.C./I.M. y sacrificio a las 24 horas).
- 5) POLI-1 (dosis única de 16 mg/kg de P.C./I.M. y sacrificio a las 24 horas).

Cada grupo se subdividió en dos grupos de 6 animales cada uno. En el primero se realizaron las pruebas bioquímicas, sanguíneas e histopatológicas y en el segundo se estudiaron los efectos sobre las funciones renales a través de la formación de orina, consumo de agua y análisis de orina.

El grupo CONTROL INTACTO solamente cuenta con 6 animales, estos se utilizaron para comparar los pesos de las glándulas adrenales, el timo y el bazo y para medir el glucógeno hepático.

3. Obtención de muestras basales.

3.1 Sangre basal. Al primer subgrupo de los grupos 2, 3, 4 y 5 bajo anestesia con éter se les extrajo 1.5 mL de sangre de la arteria de la cola, posteriormente los animales se dejaron descansar 24 horas.

La sangre se trató de la siguiente manera: en un microtubo con 40 μ L de EDTA (anticoagulante) se vertieron 400 μ L de sangre. Esta sangre se utilizó para contar el porcentaje de leucocitos y biometría hemática (como se muestra abajo). En otro microtubo se vació el ml restante de sangre, se dejó coagular y se centrifugó a 10,000 RPM/10 minutos. El suero obtenido se utilizó para realizar las pruebas de toxicidad hepática y renal como se indica a continuación:

3.2 Pruebas de toxicidad hepática. Se realizaron en el analizador VITROS DT I y II siguiendo las instrucciones de uso VITROS (Johnson y Johnson, 2003). El método requirió de 25 μ L de suero (muestra) y las variables transaminasa glutámico oxaloacética (TGO), la transaminasa glutámico pirúvica (TGP), proteínas totales (PT), albúmina (ALB), fosfatasa alcalina (FA) y glucosa (GLU) fueron valoradas.

Primero el slide VITROS correspondiente a la variable se deja a temperatura ambiente por lo menos por 15 minutos, después el slide se coloca del empaque y se coloca en el analizador VITROS DT respectivo. Se colocan 25 μ L de suero de la muestra con una micropipeta, inmediatamente el analizador hace la cuantificación de forma automática y el valor es proporcionado minutos después en la pantalla.

3.3 Prueba de toxicidad renal. Se midió urea sérica en el analizador VITROS DT I siguiendo las instrucciones de uso VITROS (Johnson y Johnson, 2003).

Primero el slide VITROS de urea sérica (BUN/Urea) se deja a temperatura ambiente por lo menos por 15 minutos, después el slide se coloca del empaque y se coloca en el analizador VITROS DT I. Se colocan 25 μ L de suero de la muestra con una micropipeta, inmediatamente el analizador hace la cuantificación de forma automática y el valor es proporcionado minutos después en la pantalla.

3.4 Pruebas de toxicidad del sistema inmune.

3.4.1 Biometría hemática: En analizador Abbott Cell-Dyn 1700 (siguiendo el método descrito en el Manual de Entrenamiento Cell-Dyn 1700 de Abbott laboratories de México, S.A. de C.V.) se midió la fórmula roja. Para el análisis el microtubo con sangre entera anticoagulada con EDTA se colocó en la sonda de aspiración del analizador Abbott Cell-Dyn 1700. Se oprime el botón de aspiración y el analizador aspira 30 μ L de la muestra. El analizador valora de manera automatizada: hematócrito (Hto), hemoglobina (Hb), recuento absoluto de glóbulos rojos (RGR), plaquetas (PLT), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), volumen corpuscular medio (VCM) y distribución del tamaño de los eritrocitos (DTE). Los resultados aparecen en la pantalla de forma automatizada minutos después y se mandan imprimir.

3.4.2 Fórmula blanca: En frotis sanguíneos teñidos con el colorante de Giemsa se hizo un conteo diferencial de 150 células para obtener el porcentaje de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), eosinófilos (EOS), basófilos (BAS), monocitos (MON) y linfocitos (LIN). Para esto se realizó lo siguiente:

- 1.- En un microtubo se coloca EDTA al 1% y sangre recién extraída procurando que la relación de ambos sea 1:10 (EDTA 1%: sangre).
- 2.- Se agita suavemente procurando que la sangre no coagule.
- 3.- En una laminilla de vidrio se colocan 7 μ L de sangre, se hace una extensión de sangre y se deja secar a temperatura ambiente.
- 4.- Para fijar las muestras, en un frasco tipo Coplin con etanol al 96° se colocan las laminillas y se dejan fijar por 5 minutos.
- 5.- Se sacan las laminillas a temperatura ambiente.
- 6.- Se sumergen las laminillas en un frasco tipo Coplin con colorante de Giemsa y se incuban por 20 minutos.
- 7.- Se sacan las laminillas y después se sumergen varias veces en agua destilada hasta quitar el exceso de colorante.
- 8.- Se seca y prepara para el conteo diferencial. Para esto se cuentan 150 células en un contador celular y se saca el porcentaje de leucocitos sanguíneos.

4. Preparación y administración del POLI-1 y obtención de sangre experimental.

4.1 Preparación del POLI-1. En base a la dosis que corresponde a los animales de cada grupo se pesó el POLI-1, se colocó en un microtubo y se disolvió en 100 μ L DMSO (pH=7), se agitó en vortex hasta su completa disolución.

4.2 Administración del POLI-1. A las 24 horas del sangrado basal, los animales del subgrupo 1 del grupo 2, se les inyectó vía I.M. con 100 μ L de DMSO. Mientras que el subgrupo 1 de los grupos 3, 4 y 5 se inyectaron con el POLI-1 a razón de 4, 8 y 16 mg/kg de P.C./I.M. respectivamente.

A las 24 horas de las inyecciones correspondientes, los animales fueron pesados y anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg de P.C./vía intraperitoneal.) y sacrificados siguiendo el siguiente protocolo:

4.3 Sangre experimental. Los animales fueron colocados sobre la mesa de cirugía, se abrió el abdomen y a través de la arteria aorta abdominal fueron exanguinados con una jeringa de 10 ml. La sangre se dividió en una muestra para biometría hemática y la otra para la obtención de suero (centrifugando la sangre a razón de 1,300 RPM por 15 minutos en centrífuga clínica). Las muestras de sangre y suero obtenidas se procesaron igual que las muestras basales.

5. Extirpación de órganos. Hígado: se extirpó y se tomó un fragmento para estudio histológico (formol neutro al 10%), el resto fue rápidamente colocado en una bolsa de plástico debidamente etiquetada y sellada y se congeló a -20°C hasta la determinación de glucógeno hepático según el método de Murat y Serfaty (1974). Riñón: se obtuvo un fragmento representativo y se fijó en formol neutro al 10%. Adrenales, timo y bazo fueron extirpados, pesados en una balanza analítica y se fijaron en formol neutro al 10% y sus pesos fueron expresados en mg de tejido/100 g de P.C.

6. Procesamiento del hígado para la medición de glucógeno hepático.

El método utilizado se basa en el trabajo realizado por Murat y Serfaty (1974). En el fragmento de hígado de cada muestra almacenado en congelación (-20°C) las determinaciones se hacen por triplicado como se describe a continuación:

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- a. En un vidrio de reloj sobre un baño de hielo el fragmento de hígado se pone a descongelar.
 - b. Con un bisturí, el fragmento de hígado parcialmente descongelado se corta en un cuadro pequeño.
 - c. Para eliminar el exceso de agua del hígado, el fragmento se toma entre los dedos.
 - d. Con la ayuda de las pinzas de disección pequeñas el hígado se coloca en un pedazo de papel encerado previamente pesado en la balanza analítica.
 - e. El peso del fragmento debe estar alrededor de 0.250 g para el estudio.
 - f. Se registra la cantidad de hígado pesado.
 - g. En un tubo de ensayo completamente cubierto de hielo (baño de hielo) se mete el hígado ya pesado y se debe tener cuidado que no se congele.
 - h. El tubo de ensayo con hígado se saca del baño de hielo y se le agrega 1.5 mL del buffer de citratos. Se tritura con el homogeneizador (Polytron) las veces suficientes hasta su completa trituración.
 - i. El hígado homogeneizado se vuelve a colocar en el baño de hielo para evitar la degradación del glucógeno.
 - j. Los pasos 1 al 9 se repiten en cada muestra. Antes de cada muestra, el homogeneizador se lava en agua corriente, agua destilada y se seca.
 - k. El homogenado de hígado obtenido se utiliza para medir glucosa libre (GL) y glucosa total (GT).

6.1 Determinación de glucosa libre.

- a. En un tubo de ensayo de 5 mL se vierten 25 μ L del homogenado de hígado y se mezcla en agitador Vortex.
- b. Se añaden 250 μ L de agua destilada y 750 μ L de *O*-Toluidina. Nuevamente se mezcla en agitador Vortex.
- c. De inmediato colocar en baño María por 20 minutos.
- d. Se obtiene la absorbancia en el espectrofotómetro a 630 nm y utilizando celdillas de vidrio óptico. Se toma como blanco agua destilada.
- e. Se registra en una hoja la lectura de la absorbancia. De las tres lecturas de cada muestra hacer un promedio y extrapolarlo con la curva de calibración para obtener la concentración de glucosa total de cada muestra.

Nota. Si la concentración de glucosa es muy alta se puede diluir la muestra de hígado para hacer la determinación.

6.2 Determinación de glucosa total.

- a. En un microtubo colocar 0.001 g de la enzima amiloglucosidasa y 500 μL de buffer de citratos (1 mg de amiloglucosidasa/ml de buffer). Se tapa y se mezcla en agitador Vortex.
- b. En el mismo microtubo se agregan 500 μL del homogenado de hígado (mezclado anteriormente) y se mezcla en agitador Vortex.
- c. Se colocan los microtubos en un agitador para medios y se pone a incubar a 40 rotaciones por minuto a temperatura ambiente por 2 horas 30 minutos.
- d. Después, las muestras se mezclan en agitador Vortex.
- e. En un microtubo de 5 se colocan 25 μL de la muestra, 250 μL de agua destilada y 750 μL de *O*-Toluidina.
- f. Se mezcla en agitador Vortex y se coloca en baño María por 20 minutos.
- g. Inmediatamente después se coloca el tubo de vidrio en baño de hielo por 1 o 2 minutos.
- h. Se saca y se mezcla en agitador Vortex.
- i. Se lee en el espectrofotómetro a 630 nm la absorbancia en celdillas de vidrio óptico y se toma como blanco agua destilada.
- j. Se registra en una hoja la lectura de la absorbancia. Las tres lecturas de cada muestra se utilizan para hacer un promedio y se extrapolarlo con la curva de calibración para obtener la concentración de glucosa total de cada muestra.

Cálculos

Para cada muestra el Glucógeno = GT – GL

Fórmula:

Glucógeno = {(Promedio de [glucosa total obtenida] \div 2) (0.1)} – {[promedio de glucosa libre] \div 1)(0.1)}

Nota: Glucógeno hepático es expresado en mg/100 mg de tejido húmedo.

7. Fijación y corte de tejidos.

Para procesar los fragmentos de hígado y riñón fijados en formol neutro al 10% se realiza lo siguiente de acuerdo al método descrito por Prophet et al., (1994).

7.1 Fijación en parafina.

- a. Los tejidos fijados previamente en formol neutro al 4% durante 48 horas (mínimo) se colocan en canastillas y se etiqueta a cada uno con un pedazo de papel.
- b. Se lavan los tejidos a chorro con agua corriente durante 2 horas.
- c. Deshidratación del tejido y fijación en parafina. Primero se debe revisar que los reactivos estén limpios y listos para usar.

Después del lavado, se colocan las canastillas con los tejidos en el recipiente número 1 del procesador de tejidos Leica TP 1020, el cual contiene el menor porcentaje de etanol. Se debe procurar que al colocar la canastilla y la tapa ambos estén sujetos firmemente.

- d. En un programa prediseñado en tiempo, los tejidos se enbeben en parafina en el procesador de tejidos Leica TP 1020 de la siguiente forma: primero se deshidrata el tejido con un incremento gradual de la concentración de etanol (al 70%, 80%, 85%, 90%, 95% y 100%), posteriormente se sumerge en Xilol y finalmente en parafina.

7.2 Preparación del tejido en cubos de parafina.

Esta preparación se hace en un dispensador de parafina Leica EG 11400.

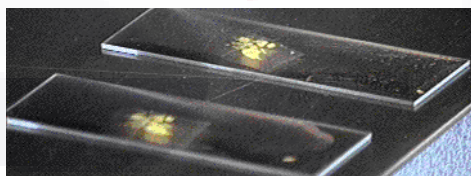
- a. Se colocan en un compartimento del dispensador de parafina las canastillas con los tejidos parafinizados para precalentar moderadamente.
- b. Se acomoda cada tejido y se corta con el bisturí teniendo cuidado de no manejar cada tejido por mucho tiempo.
- c. En la base de aluminio (barra de Leuckart) del dispensador de parafina se acomoda cada tejido, se colocan dos escuadras de aluminio (barra de Leuckart) alrededor de los tejidos formando un cubo de tamaño uniforme.
- d. Se levanta a la altura del dispensador de parafina la base de aluminio y se oprime la palanca dispensadora de parafina. Al caer la parafina, se procura llenar completamente el cubo, no derramar por los bordes exceso de parafina y se evita principalmente la formación de burbujas.
- e. Rápidamente se coloca el cubo en el compartimento frío del dispensador de parafina hasta que se solidifique y enfríe.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- f. Tanto la base y la escuadra se quitan y los bloques de tejido con parafina se guardan hasta su posterior uso.

7.3 Cortes histológicos.

Es importante considerar: Colocar una navaja nueva y limpia en el micrótopo, ajustar el grosor de cada corte a 5 micras (μ) y colocar los tejidos en el congelador minutos antes de usar.

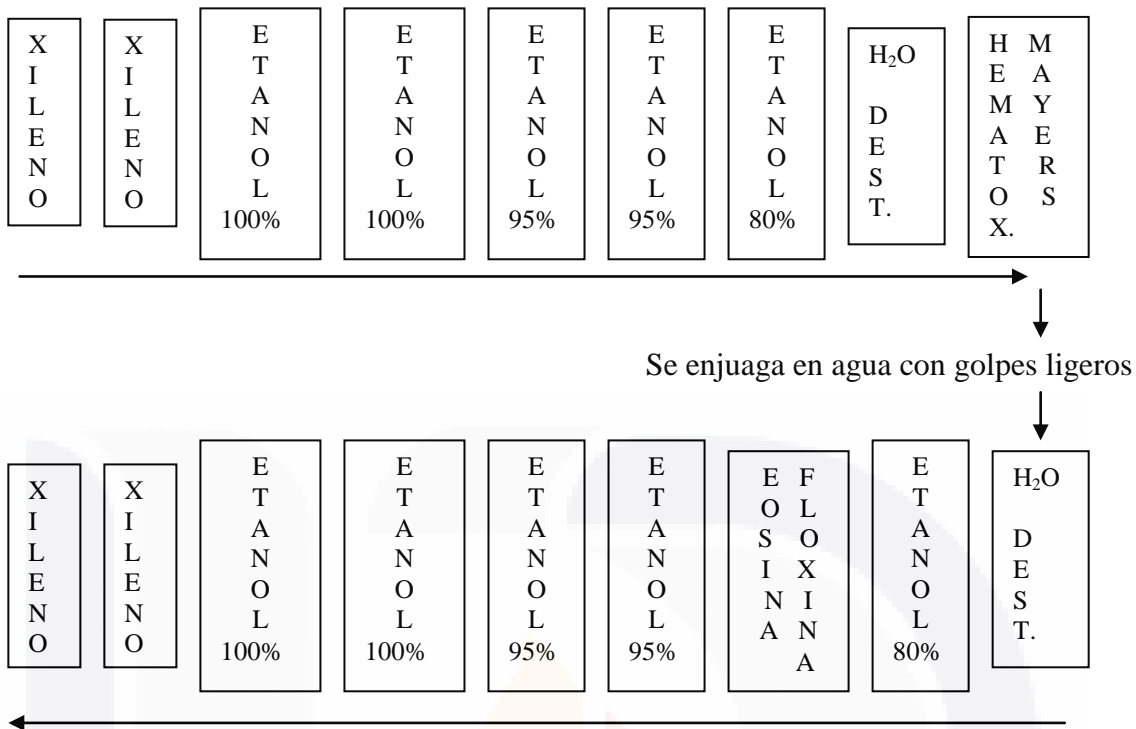
- a. Se acomoda en el microtopo Leica RM 2125 el bloque de tejido con parafina de acuerdo al corte a realizar. Se debe procurar no manejar por mucho tiempo el tejido durante los cortes. En caso de que la parafina se caliente, colocar un hielo sobre el tejido y secar el agua, limpiar la navaja y seguir con el corte.
- b. Se repite para cada muestra de cada grupo.
- c. Al hacer los cortes del tejido, inmediatamente, se extienden en el baño de agua (45-50°C) Leica 26103. A simple vista el tejido mejor conservado se toma de abajo hacia arriba con una laminilla y con ayuda del palillo de madera o pincel separar los cortes a menos conservados. En este paso se debe procurar no fundir la parafina y rotular cada laminilla.
- d. Se colocan en una canastilla las laminillas con los cortes de los tejidos y se meten en una estufa a 60°C por 3 horas.
- e. Se sacan de la estufa, se dejan secar e hidratar en agua destilada.
- f. Los tejidos están listos para teñir.



8. Tinción de hematoxilina-Eosina (H-E) para tejidos.

Los tejidos de hígado y riñón se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) (Prophet et al., 1994) siguiendo el orden que se describe a continuación:

- a. Primero se desparafiniza el tejido.
- b. Se sigue la siguiente línea de tención.



c. Se sumergen dos o tres veces en cada solución el tiempo necesario.

Los cortes obtenidos y teñidos con H-E se estudiaron con un microscopio fotónico (NIKON OPTIPHOT II).

9. Producción de orina y consumo de agua basales de 24 horas.

Para la determinación de estas variables los animales del subgrupo 2 de los grupos 2, 3, 4 y 5 se colocaron en jaulas metabólicas por 24 horas, en estado de ayuno. El procedimiento fue el siguiente:

Los biberones llenos de agua se pesaron en una balanza gravimétrica (peso inicial). En las jaulas metabólicas perfectamente limpias y con un colector de orina en el fondo se colocaron los animales y biberones por 24 horas. Pasado este tiempo se retiran de las jaulas metabólicas los animales, biberones y el colector de orina. Los animales se dejaron descansar 24 horas.

Los biberones nuevamente se pesaron (peso final) y se obtuvo el consumo de agua en 24 horas en mililitros al restar el peso inicial y final de los biberones (1 mL \approx 1 gr de agua). El volumen de orina de 24 horas se midió y a esta se le determinó las pruebas urinarias de toxicidad renal.

10. Producción de orina y consumo de agua experimentales de 24 horas.

A las 36 horas de iniciar el experimento, los animales el subgrupo 2 se inyectaron con DMSO (grupo 2) y POLI-1 (grupo 3, 4 y 5 a las dosis correspondientes), se llevó a cabo el mismo procedimiento llevado a cabo para las muestras basales de producción de orina, consumo de agua de 24 horas y las pruebas urinarias de toxicidad renal.

11. Pruebas urinarias de toxicidad renal.

A las muestras de orina colectadas se les realizó un examen general de orina (EGO) (parte química) con tiras reactivas del sistema Seralyzer, Ames Bayer para uroanálisis (Multistix® 10 SG). Las mediciones se realizaron en el fotómetro reflector Seralyzer Clinitek® (Ames) y se analizaron las siguientes variables: glucosa, bilirrubinas, cuerpos cetónicos, densidad, pH, proteínas, urobilinógeno, nitritos y leucocitos. Esto se lleva a cabo humedeciendo la tira reactiva con orina, rápidamente con un papel se quita el exceso de muestra en la tira y se coloca en el analizador (fotómetro reflector Seralyzer), los valores aparecen después de unos minutos y finalmente son impresos por el analizador.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores se expresaron como la Media \pm EEM (error estándar de la media). El análisis se realizó con la prueba de ANOVA de una sola cola seguido por la prueba de Tukey-Kramer o t-Student según se aplique. El programa utilizado fue el InStat2.

Diferencias significativas fueron consideradas con una $p < 0.05$. Las gráficas se realizaron en el programa PRISMA 3.0.



RESULTADOS

EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AGUDA AL POLI-1.

1. PESOS DE ADRENALES, BAZO Y TIMO.

En la tabla 6 se muestran los efectos del DMSO (vehículo) y de las diferentes dosis del POLI-I sobre los pesos de las glándulas adrenales, del bazo y timo. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los pesos de los órganos de los diferentes grupos.

Tabla 6. Efectos del DMSO y POLI-1 sobre el peso de las glándulas adrenales, bazo y timo.

	GLÁNDULAS ADRENALES (mg de tejido/100g de P.C.)	BAZO (mg de tejido/100g de P.C.)	TIMO (mg de tejido/100g de P.C.)
CONTROL INTACTO	14.65 ± 1.2 ^a	189.3 ± 11.1 ^a	86.3 ± 8.84 ^a
DMSO	16.41 ± 1.11 ^a	208.23 ± 7.54 ^a	90.31 ± 15.44 ^a
POLI-1 (4 mg/kg de P.C.)	17.85 ± 0.85 ^a	220.59 ± 12.49 ^a	93.52 ± 4.29 ^a
POLI-1 (8 mg/kg de P.C.)	16.35 ± 1.27 ^a	189.86 ± 9.59 ^a	69.75 ± 12.72 ^a
POLI-1 (16 mg/kg de P.C.)	17.58 ± 1.45 ^a	230.71 ± 16.36 ^a	92.24 ± 5.9 ^a

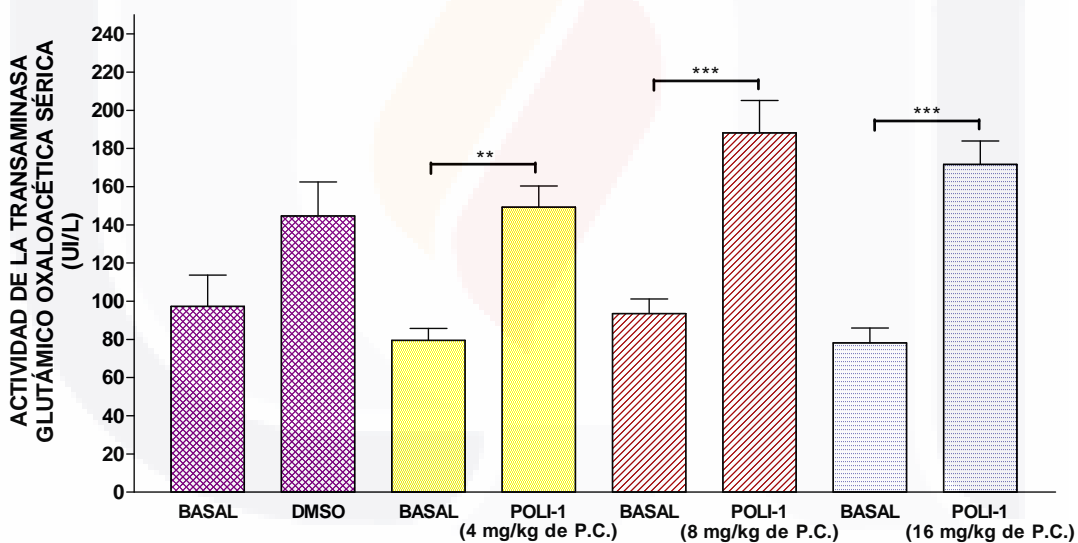
La dosis administrada de DMSO es 100 µl/rata/I.M. y las del POLI son 4, 8 y 16 mg/kg de P.C. /I.M.). Los valores se expresan como la media ± EEM, n = 6 ratas/grupo. Para fines de comparación, un grupo CONTROL INTACTO fue incluido en el experimento. a = No significativo en comparación con los demás grupos.

2. HÍGADO.

2.1 Actividad de las enzimas: transaminasa glutámico oxaloacética (TGO), transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y fosfatasa alcalina (FA).

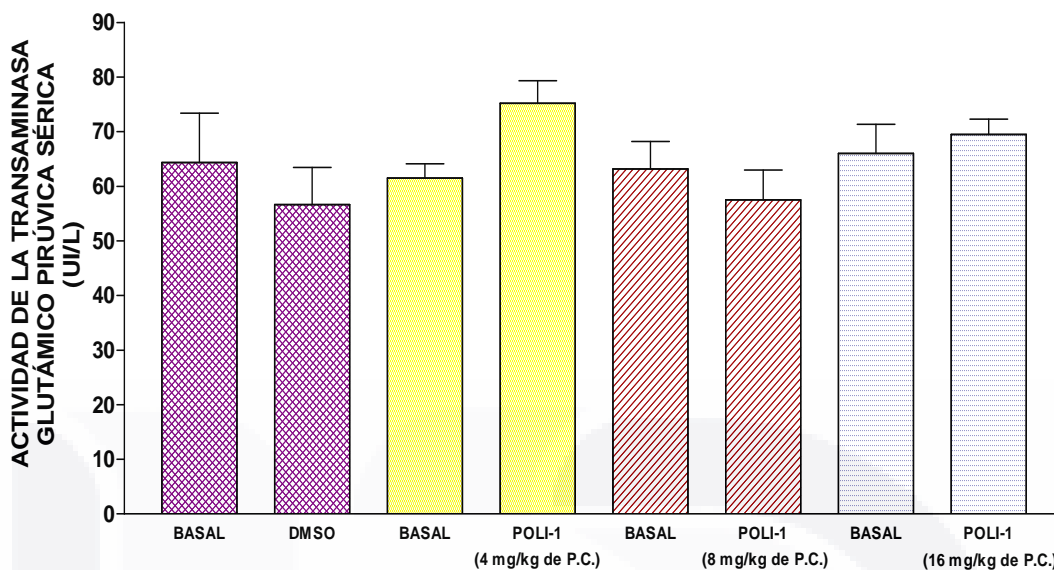
En las gráficas 1, 2 y 3 se muestran los efectos del DMSO y de las diferentes dosis del POLI-1 sobre la actividad enzimática. Para la determinación de la actividad basal de las diferentes enzimas, cada grupo fue su propio control. Los animales fueron sangrados por la arteria de la cola (1 ml) 24 horas antes de la administración de los compuestos y por la aorta abdominal 24 horas después de la administración del DMSO y las diferentes dosis del POLI-1.

Obsérvese, en la gráfica 1, que mientras la actividad de la TGO no se afectó significativamente en respuesta al DMSO, la actividad se incrementó significativamente en respuesta a las diferentes dosis del POLI-1.

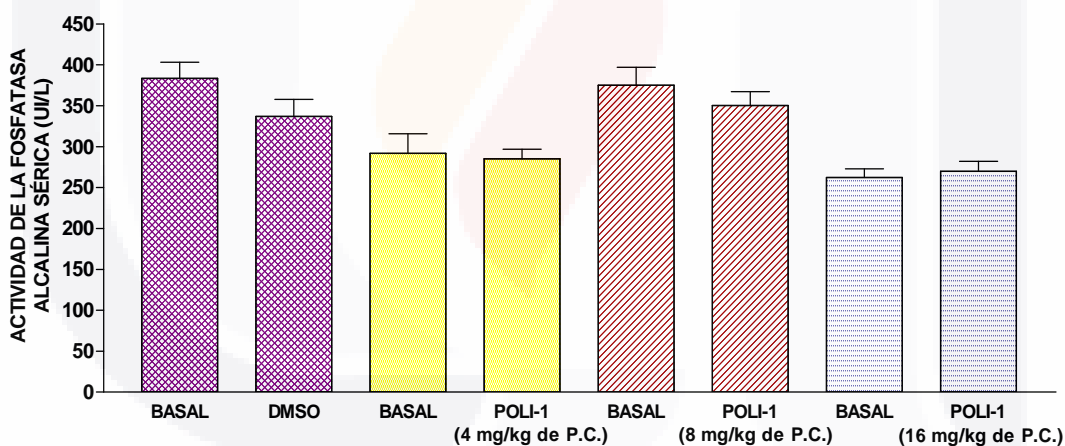


Gráfica 1. Efecto de la exposición aguda al Dimetilsulfóxido (100 μ l de DMSO/rata) y diferentes dosis del POLI-1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la actividad de la transaminasa glutámico oxaloacética (TGO). Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. La diferencia se expresa como: ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$.

Las gráficas 2 y 3 muestran que la actividad de las enzimas TGP y FA no se afectaron por el DMSO ni por las diferentes dosis del POLI-1.



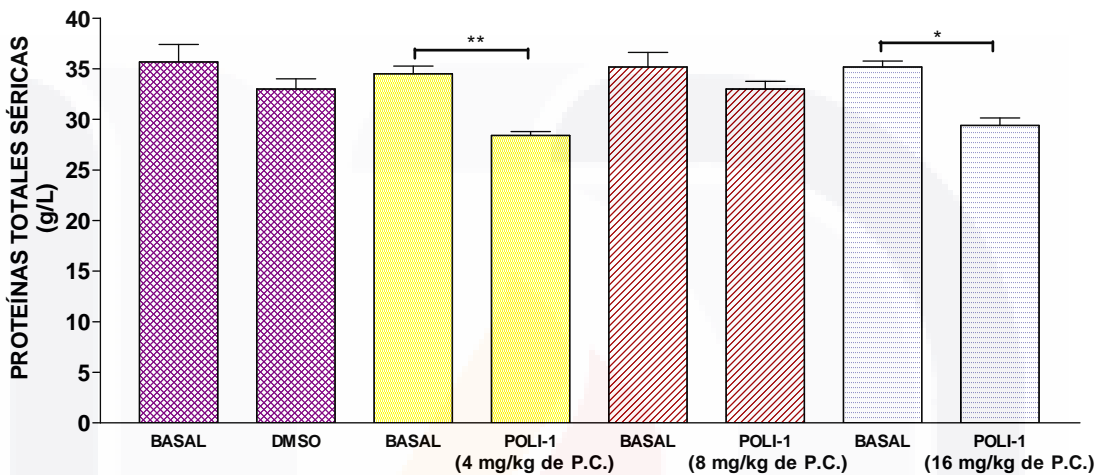
Gráfica 2. Efecto de la exposición aguda al Dimetilsulfóxido (100 μ l de DMSO/rata) y diferentes dosis del POLI-1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la actividad de la transaminasa glutámico pirúvica (TGP) sérica. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo.



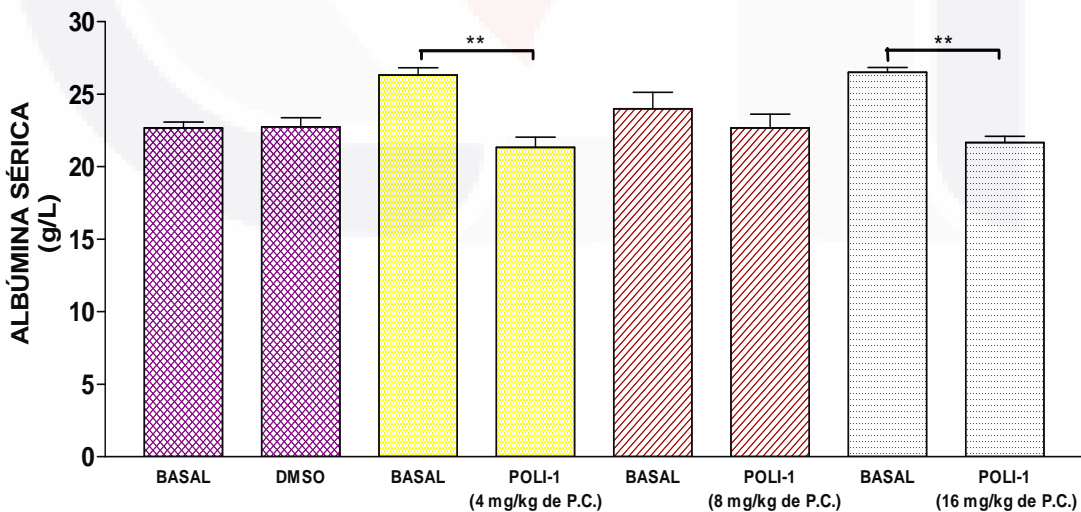
Gráfica 3. Efecto de la exposición aguda al Dimetilsulfóxido (100 μ l de DMSO/rata) y diferentes dosis del POLI-1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) sérica. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo.

2.2 Concentraciones séricas de proteínas totales (PT), albúmina (ALB) y glucosa (GLU).

En las gráficas 4 y 5 se muestran los efectos de los diferentes tratamientos sobre los niveles séricos de las PT y ALB. Obsérvese que mientras el DMSO no afectó a ninguna de estas variables, las concentraciones de PT y ALB disminuyeron aunque solo significativamente con las dosis de 4 y 16 mg/kg de P.C. del POLI-1.

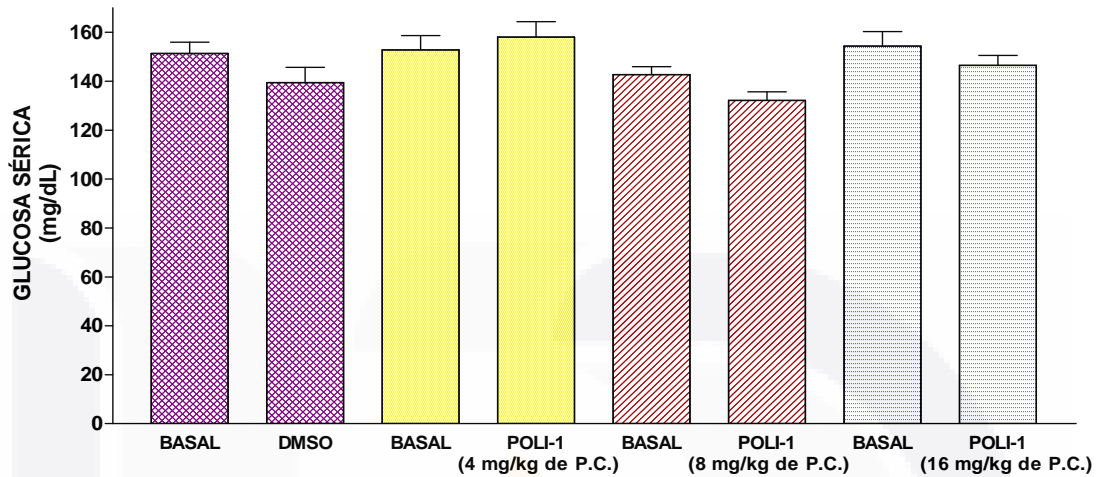


Gráfica 4. Efecto de la exposición aguda al Dimetilsulfóxido (100 μ l de DMSO/rata) y diferentes dosis del POLI-1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la concentración de proteínas totales (PT) séricas. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. La diferencia se expresa como: * = $p < 0.05$ y ** = $p < 0.01$.



Gráfica 5. Efecto de la exposición aguda al Dimetilsulfóxido (100 μ l de DMSO/rata) y diferentes dosis del POLI-1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la concentración de albúmina (ALB) sérica. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. La diferencia se expresa como: ** = $p < 0.001$.

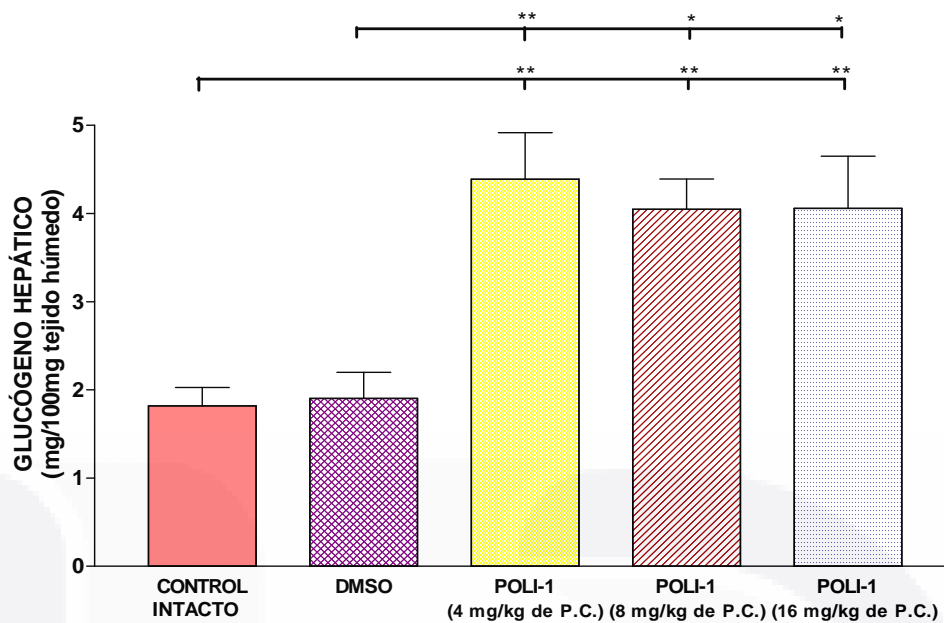
La gráfica 6 muestra que ninguno de los tratamientos afectaron las concentraciones séricas de glucosa.



Gráfica 6. Efecto de la exposición aguda al Dimetilsulfóxido (100 μ l de DMSO/rata) y diferentes dosis del POLI-1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la concentración de la glucosa (GLU) sérica. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo.

2.3 Glucógeno hepático.

En la gráfica 7 se comparan los efectos del DMSO y las diferentes dosis de POLI-1 sobre el contenido de glucógeno hepático a las 24 horas de la administración de los compuestos. Obsérvese que en comparación con el grupo control, el DMSO no afectó el contenido de glucógeno, mientras que todas las dosis del POLI-I indujeron incrementos significativos y de la misma magnitud (200% mayor que el grupo control).



Gráfica 7. Efectos de la exposición aguda al DMSO (100 μ l/rata) y diferentes dosis de POLI-I (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la concentración de glucógeno hepático (mg de glucógeno/100 mg de tejido húmedo). Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. Para fines de comparación, un grupo CONTROL INTACTO fue incluido en el estudio. Las diferencias se presentan como * = $p < 0.05$ y ** = $p < 0.01$.

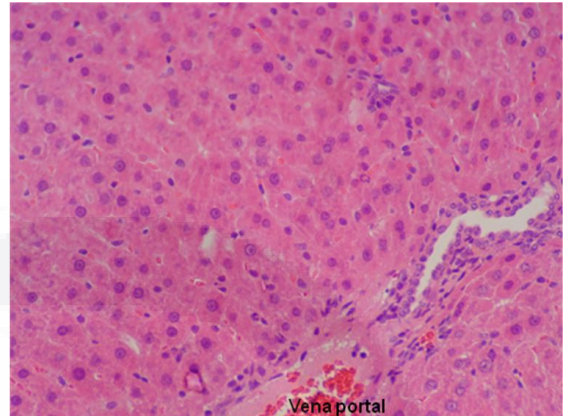
2.4 Histopatología hepática.

Las características de los cortes histológicos de nuestro grupo CONTROL INTACTO, se ajustaron perfectamente a las descritas por Young y Heath, 2000 y Bowman y Rand, 1984. En comparación con el grupo CONTROL INTACTO, los hepatocitos del grupo DMSO (vehículo) mostraron algunas diferencias en el tamaño de los gránulos citoplásmicos, la mayoría eosinofílicos y otros basofílicos (con la tinción de H-E). En este mismo grupo, el citoplasma celular muestra espacios vacíos de tamaño variable, sugerentes de alteraciones en la forma y tamaño de las micro y macrovesículas típicas de los hepatocitos normales. Los demás aspectos histológicos del grupo DMSO, no mostraron cambios significativos como: cambios en la forma, tamaño y lugar del núcleo, presencia de células en apoptosis o con signos de necrosis celular ó presencia de células inflamatorias. La estructura celular de las tres zonas de los sinusoides hepáticos se observan conservadas al igual que el colágeno que se encuentra alrededor de la triada portal. En resumen, excepto por los cambios en las micro y macrovesículas, la histología general de este grupo es aparentemente normal. En las imágenes 1 (corresponde al área centrolobulillar) y 2 (corresponde al área periférica), se muestra el aspecto histológico de un hígado normal a 600X, aunque se muestra mayor detalle en la

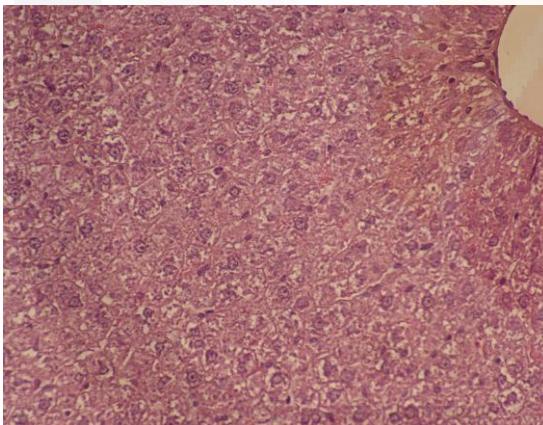
imagen 11 a 2000X. La imagen 12 muestra un área escogida al azar del lóbulo hepático. En las imágenes 3 y 4 se muestra el aspecto de los hepatocitos de hígados provenientes del grupo DMSO. Obsérvese el efecto generalizado del DMSO sobre los hepatocitos de las áreas centrales y periféricas de los lobulillos (mayor presencia de vesículas citoplásmicas de aspecto vacío).



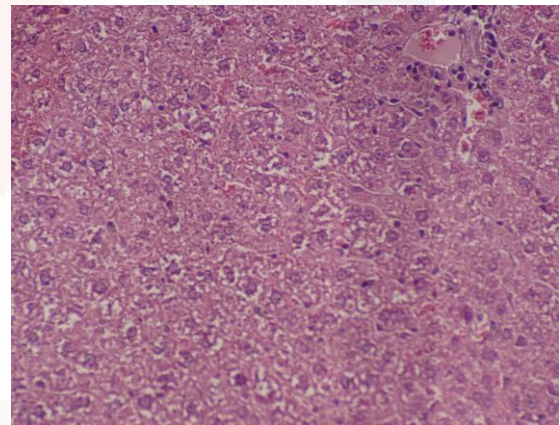
**Imagen 1. Grupo CONTROL INTACTO
H-E 600X (centrolobulillar)**



**Imagen 2. Grupo CONTROL INTACTO
H-E 600X (periférica)**



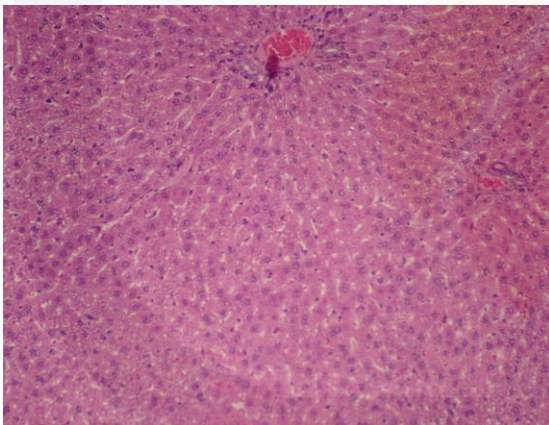
**Imagen 3. Grupo DMSO H-E 600X
(centrolobulillar)**



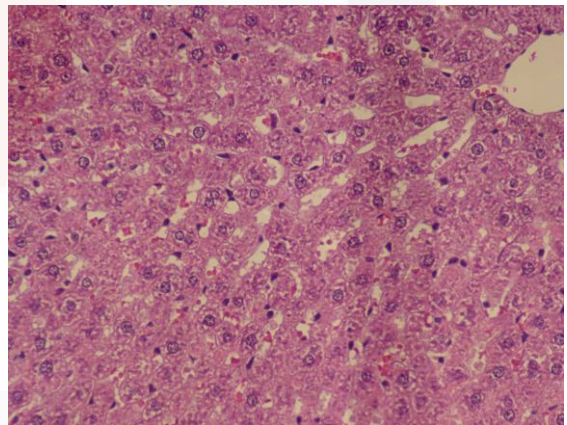
**Imagen 4. Grupo DMSO H-E 600X
(periférica)**

Los cortes histológicos de hígado de tres dosis administradas del POLI-1 muestran que, en las imágenes 5 y 6 la periferia hepática de las dosis de 4 y 8 mg/kg de P.C. hay espacios citoplásmicos vacíos de tamaño variable y la imagen 9 muestra lo mismo pero alrededor de la zona centrolobulillar del grupo tratado con 16 mg/kg de P.C. del POLI-1. Tales espacios vacíos sugieren alteraciones de la forma y tamaño de las micro y macrovesículas de los hepatocitos normales. De manera general, excepto por lo anterior, las tres dosis del POLI-1 muestran una histología aparentemente normal

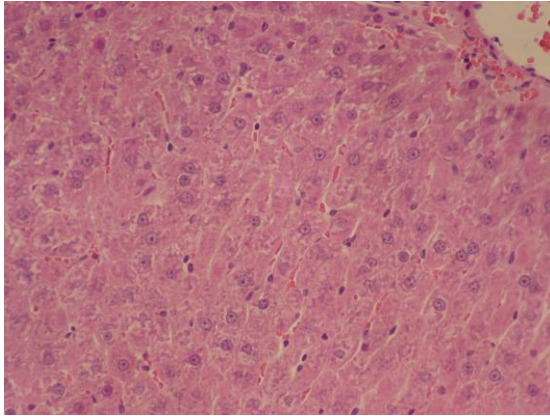
ya que no se observan cambios significativos como: cambios en la forma, tamaño y lugar del núcleo, presencia de células en apoptosis o con signos de necrosis celular ó presencia de células inflamatorias (figuras 13-15). En los sinusoides hepáticos, la estructura celular de las tres zonas están conservadas al igual que el colágeno que rodea la triada portal. Las imágenes 5 y 6 muestran la histología hepática del grupo tratado con 4 mg/kg de P.C. a 300X y 600X, respectivamente. La imagen 5 corresponde al área centrolobulillar, mientras que la imagen 6 corresponde al área periférica y la imagen 13 muestra un área al azar del lobulillo hepático a mayor detalle (2000X). Las imágenes 7 y 8 muestran la histología hepática del grupo tratado con 8 mg/kg de P.C. a 600X. La imagen 7 corresponde al área centrolobulillar, mientras que la imagen 8 corresponde al área periférica. La imagen 14 muestra un área al azar del lobulillo hepático con mayor detalle 2000X. Las imágenes 9 y 10 muestran la histología hepática del grupo tratado con 16 mg/kg de P.C. a 600X. La imagen 9 corresponde al área centrolobulillar, mientras que la imagen 10 corresponde al área periférica y la imagen 15 muestra un área al azar del lobulillo hepático con mayor detalle (2000X).



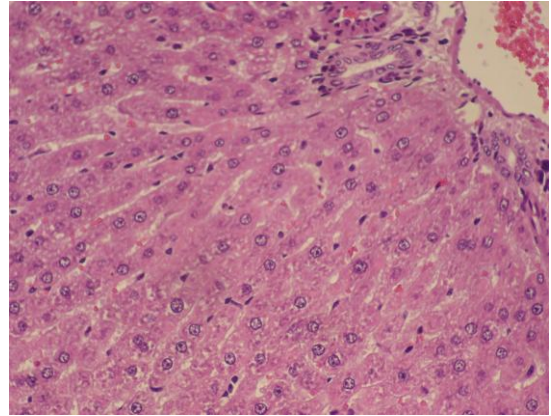
**Imagen 5. Grupo POLI-1(4 mg/kg de P.C.)
H-E 300X (centrolobulillar)**



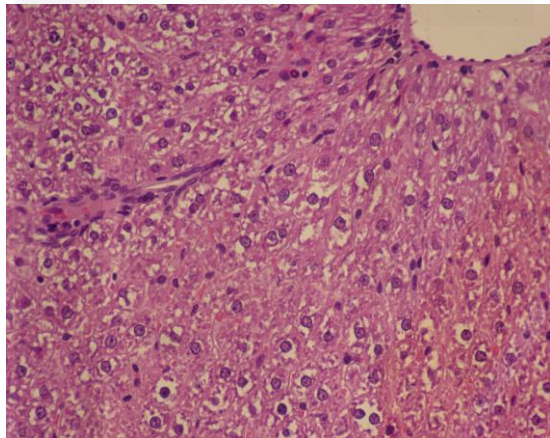
**Imagen 6. Grupo POLI-1 (4 mg/kg de P.C.)
H-E 600X (centrolobulillar)**



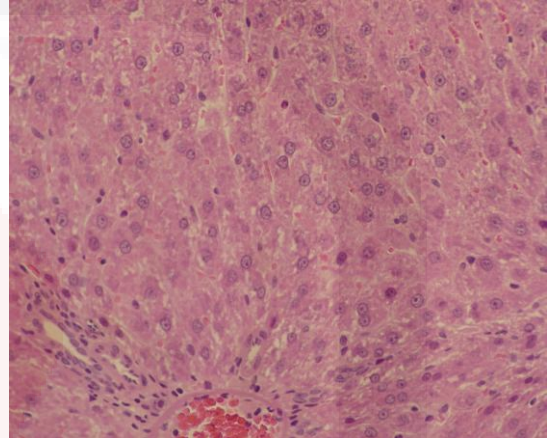
**Imagen 7. Grupo POLI-1 (8 mg/kg de P.C.)
H-E a 600X (centrolobulillar)**



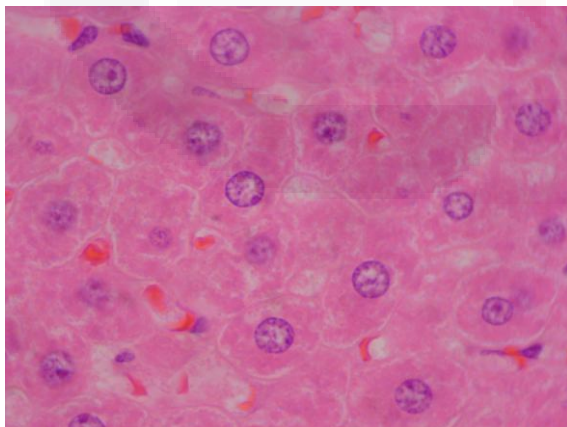
**Imagen 8. Grupo POLI-1 (8 mg/kg de P.C.)
H-E a 600X (periferia)**



**Imagen 9. Grupo POLI-1 (16 mg/kg de P.C.)
H-E a 600X (centrolobulillar)**



**Imagen 10. Grupo POLI-1 (16 mg/kg de P.C.)
H-E a 600X (periferia)**



**Imagen 11. Grupo CONTROL INTACTO
H-E a 2000X**

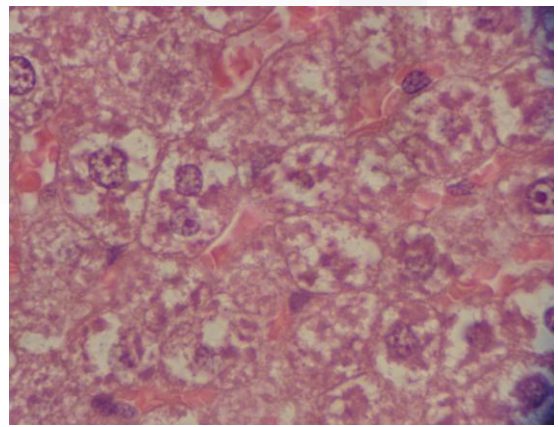
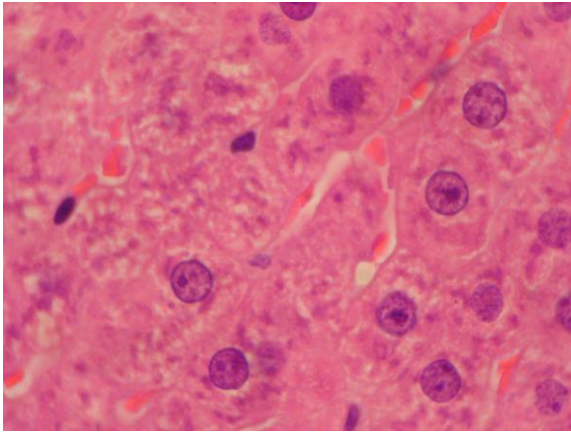
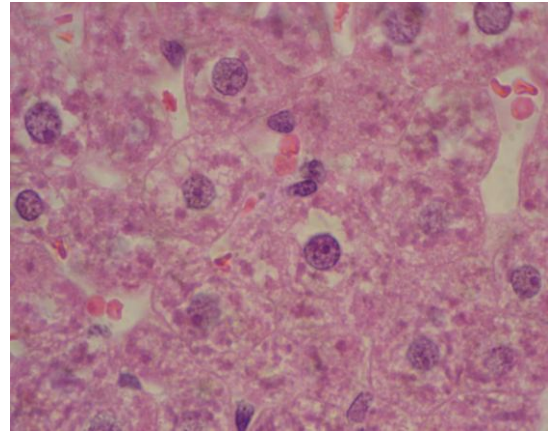


Imagen 12. Grupo DMSO H-E a 2000X



**Imagen 13. Grupo POLI-1 (4 mg/kg de P.C.)
H-E a 2000X**



**Imagen 14. Grupo POLI-1 (8 mg/kg de P.C.)
H-E a 2000X**

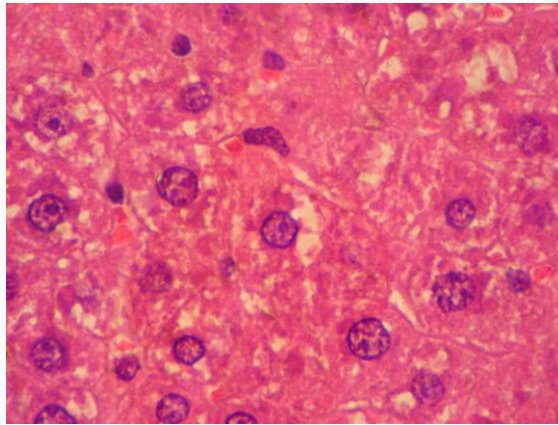
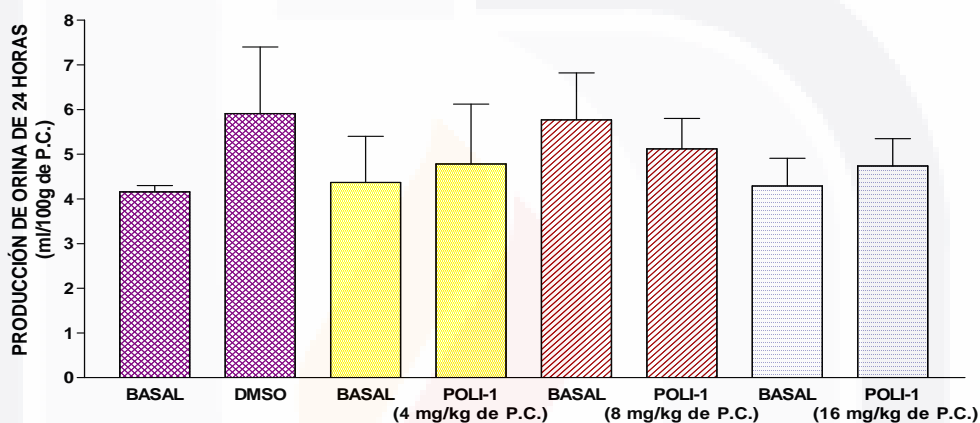


Imagen 15. Grupo POLI-1 (16 mg/kg de P.C.) H-E a 2000X

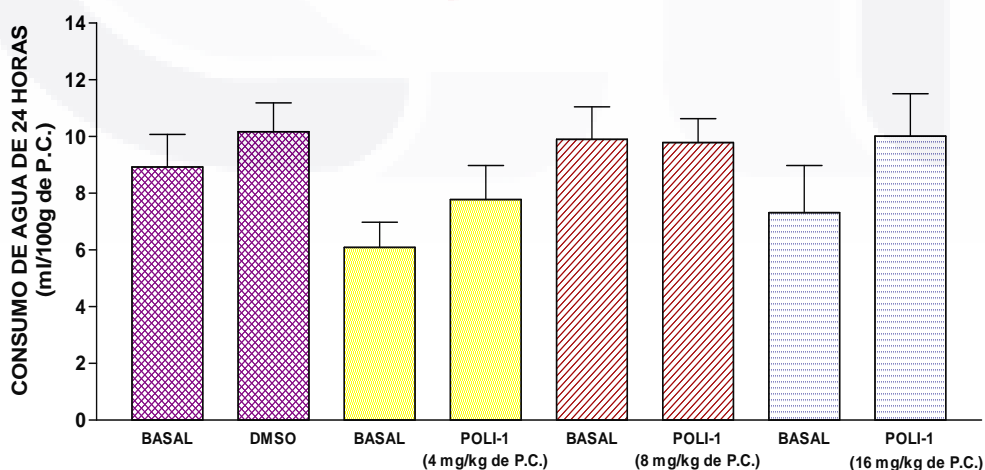
3. RIÑÓN.

3.1 Efectos del POLI-1 sobre la producción de orina y consumo de agua de 24 horas.

Para este experimento, cada grupo fue su respectivo control; las muestras basales de producción de orina y consumo de agua se realizaron 48 horas antes de comenzar las pruebas experimentales con el DMSO y el POLI-1. Las gráficas 8 y 9 muestran que en comparación con las basales, ni la administración de DMSO ni las diferentes dosis de POLI-1, indujeron cambios significativos en la producción de orina y el consumo de agua, respectivamente.



Gráfica 8. Efecto de la exposición aguda al Dimetilsulfóxido (100 µl de DMSO/rata) y diferentes dosis del POLI-1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la producción de orina de 24 horas. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. Las basales de cada grupo se determinaron 48 horas antes de administrar los compuestos.



diferentes dosis del POLI-1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre el consumo de agua en 24 horas. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. Las basales de cada grupo se determinaron 48 horas antes de administrar los compuestos.

3.2 Efectos del DMSO y el POLI-1 sobre algunos componentes de la orina de 24 horas.

Las determinaciones basales y experimentales de glucosa, bilirrubina, cetonas, densidad, pH, proteínas, urobilinógeno, nitritos y leucocitos se hicieron en orina colectada de 24 horas. La tabla 7 muestra que en comparación con las muestras basales, ni el DMSO ni las diferentes dosis del POLI-1 afectaron estas variables.

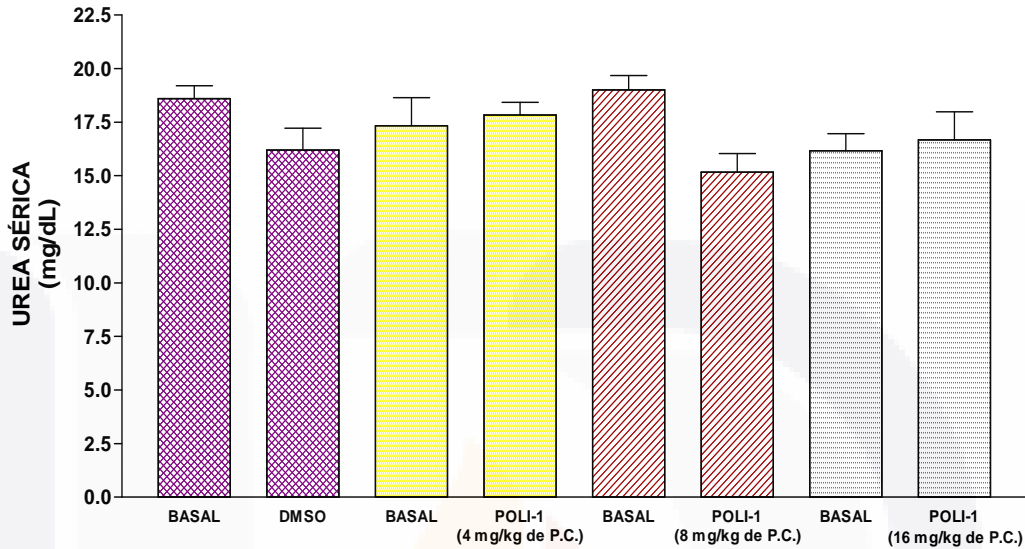
Tabla 7. Efectos del DMSO y POLI-1 sobre algunos componentes de la orina de 24 horas.

	BASAL	DMSO	BASAL	POLI-1 4 mg/kg de P.C.	BASAL	POLI-1 8 mg/kg de P.C.	BASAL	POLI-1 16 mg/kg de P.C.
Glucosa (mg/dL)	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
Bilirrubina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cetonas (mg/dL)	7.5 ± 3.4 ^a	10 ± 3.2 ^a	7.5 ± 3.4 ^a	5.0 ± 3.16 ^a	2.5 ± 2.5 ^a	11.67 ± 6.4 ^a	2.5 ± 2.5 ^a	7.5 ± 3.4 ^a
Densidad	1.013 ± 0.004 ^a	1.012 ± 0.004 ^a	1.014 ± 0.005 ^a	1.011 ± 0.003 ^a	1.010 ± 0.001 ^a	1.012 ± 0.004 ^a	1.013 ± 0.002 ^a	1.033 ± 0.02 ^a
pH	7.33 ± 0.5 ^a	6.9 ± 0.4 ^a	7.7 ± 0.4 ^a	7.8 ± 0.4 ^a	7.5 ± 0.4 ^a	6.8 ± 0.2 ^a	7.3 ± 0.4 ^a	7.0 ± 0.3 ^a
Proteínas (mg/dL)	31.7 ± 14.9 ^a	10.0 ± 6.3 ^a	76.7 ± 14.8 ^a	60.0 ± 18.4 ^a	26.7 ± 15.8 ^a	10.0 ± 6.3 ^a	25.0 ± 5.0 ^a	15.0 ± 6.7 ^a
Urobilinógeno (mg/dL)	0.2 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.1 ^a	0.2 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^a
Nitritos	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Leucocitos /uL	7.5 ± 3.4 ^a	7.5 ± 3.4 ^a	10.0 ± 3.2 ^a	7.5 ± 3.4 ^a	7.5 ± 3.4 ^a	5.0 ± 3.2 ^a	12.5 ± 2.5 ^a	10.0 ± 3.2 ^a

Los datos muestran las medias ± EEA (n= 6 ratas/grupo), las variables de bilirrubina y nitritos son cualitativas. Las basales de cada grupo se determinaron 48 horas antes de administrar los compuestos. a = No diferencia significativa.

3.3 Efecto del POLI-1 sobre la concentración de urea sérica.

La gráfica 10 muestra que en comparación con las cifras basales, ni el DMSO ni las diferentes dosis del POLI-1 afectaron las concentraciones ureasérmica.



diferentes dosis de POLI -1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la concentración de urea sérica. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. Las muestras basales de cada grupo se determinaron 48 horas antes de administrar los compuestos.

3.4 Histopatología renal.

En las láminas histológicas se buscaron posibles cambios histopatológicos sugerentes de daño renal a nivel cortical en: glomerulos (alteraciones del mesangio, modificaciones de la membrana basal, grosor de las paredes de los capilares y el diámetro de los capilares), túbulos contorneados proximales y distales, y a nivel medular en: asas de Henle, ductos y túbulos colectores, papila y alteraciones en los capilares peritubulares y vasos rectos. En ambos niveles se buscó daño renal por la presencia de necrosis celular y células inflamatorias.

La comparación histopatológica del grupo CONTROL INTACTO con los tratados con DMSO y las diversas dosis del POLI-1 muestran en el riñón que, a nivel cortical, medular y yuxtamedular (interfase corteza-médula) las células muestran tamaño normal, núcleo de cara abierta, el citoplasma y membranas están conservadas al presentar límites bien definidos. Además, ningún grupo experimental presentó células inflamatorias, apoptóticas o necróticas, ni obstrucción de las estructuras tubulares ni

vasculares, o áreas con dilatación o compresión de la vasa recta, ducto colector, túbulo colector o en las asas de Henle.

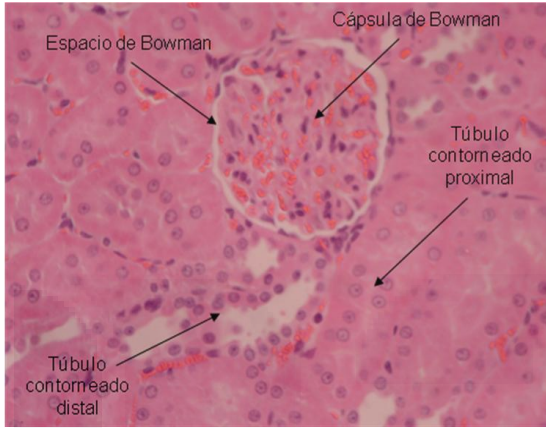


Imagen 20. Grupo CONTROL INTACTO
H-E Corteza renal a 800X

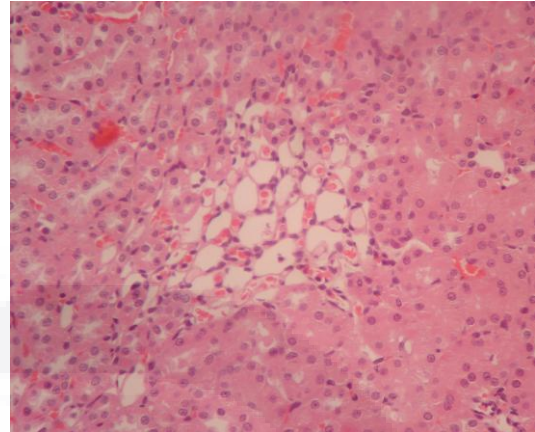


Imagen 21. Grupo CONTROL INTACTO
H-E parte yuxtamedular a 1000X

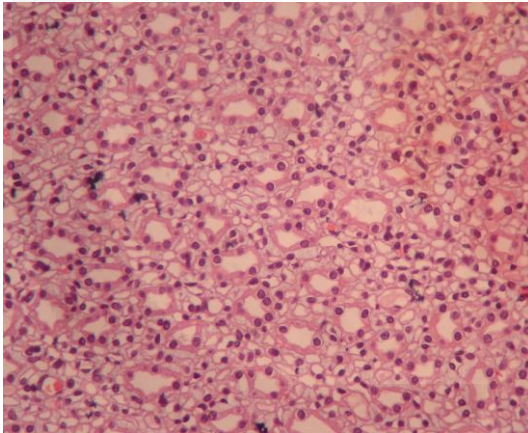


Imagen 25. Grupo POLI-1 (16 mg/kg de P.C.)
H-E a 400X Papila renal (médula)

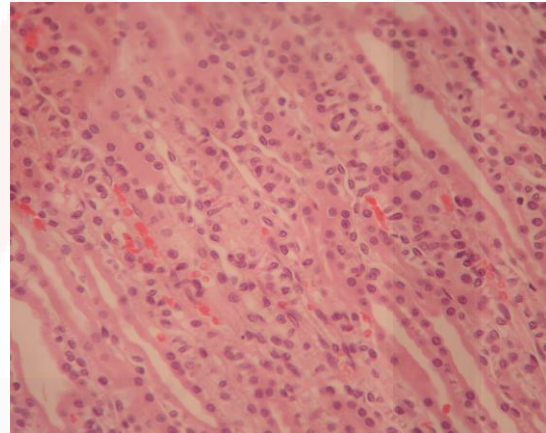


Imagen 26. Grupo CONTROL INTACTO
H-E Médula renal a 400X

4. SISTEMA INMUNE.

4.1 Efecto del POLI-1 sobre el porcentaje de los leucocitos sanguíneos.

La tabla 8 muestra el efecto de la exposición aguda DMSO y las diferentes dosis del POLI-1 sobre el porcentaje de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos respectivamente. Los resultados muestran que ni el DMSO ni las diferentes dosis del POLI-1 indujeron cambios en los porcentajes en los diferentes tipos de leucocitos.

Tabla 8. Efecto del DMSO y del POLI-1 sobre el porcentaje diferencial de los leucocitos sanguíneos.

	NEUTRÓFILOS (%)	EOSINÓFILOS (%)	BASÓFILOS (%)	MONOCITOS (%)	LINFOCITOS (%)
BASAL DMSO	38.9 ± 9.84 ^a	0.67 ± 0.15 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.60 ± 0.29 ^a	60.50 ± 4.26 ^a
	31.16 ± 1.96 ^a	0.66 ± 0.24 ^a	0.0 ± 0.00 ^a	3.33 ± 1.01 ^a	64.71 ± 0.84 ^a
BASAL POLI-1 (4 mg/kg de P.C.)	28.34 ± 1.13 ^a	0.73 ± 0.22 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.27 ± 0.13 ^a	70.71 ± 1.21 ^a
	35.86 ± 2.89 ^a	0.66 ± 0.35 ^a	0.13 ± 0.00 ^a	0.40 ± 0.2 ^a	63.21 ± 2.64 ^a
BASAL POLI-1 (8 mg/kg de P.C.)	33.95 ± 8.27 ^a	0.67 ± 0.09 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	1.33 ± 0.34 ^a	63.57 ± 3.8 ^a
	37.78 ± 10.12 ^a	0.33 ± 0.21 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	3.72 ± 0.29 ^a	58.72 ± 4.34 ^a
BASAL POLI-1 (16 mg/kg de P.C.)	31.91 ± 3.87 ^a	0.60 ± 0.27 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.60 ± 0.6 ^a	66.9 ± 3.79 ^a
	40.92 ± 3.27 ^a	0.41 ± 0.19 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.72 ± 0.4 ^a	57.83 ± 3.21 ^a

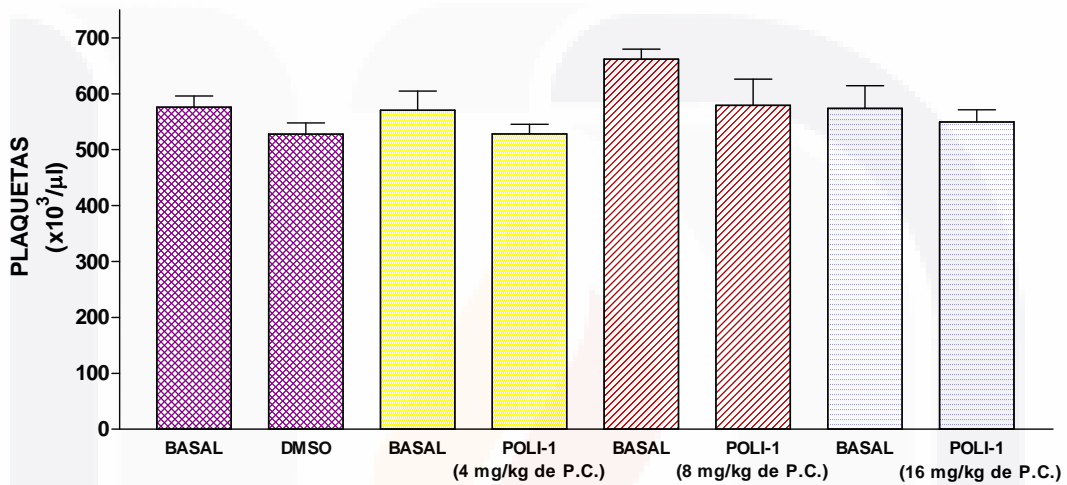
Los conteos diferenciales se realizaron en frotis sanguíneos teñidos con el colorante de Giemsa. Las basales (control) de cada grupo se determinaron 48 horas antes de administrar los compuestos. Cada valor representa la media ± EEM, n=6 ratas/grupo. La diferencia se muestra como: a = No significativo con respecto a los demás grupos.

4.2 Efecto del POLI-1 sobre plaquetas y eritrocitos circulantes.

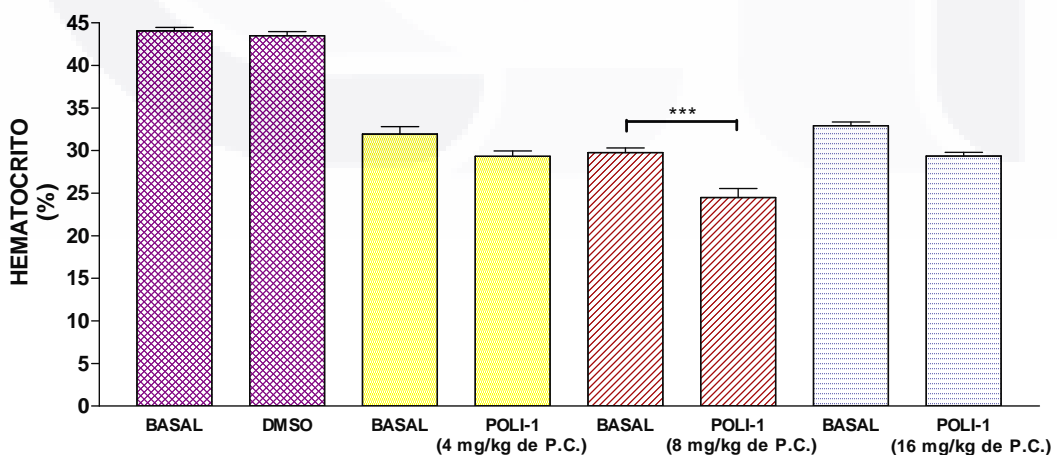
Las gráficas 11 a la 17 muestran la exposición aguda de DMSO y las diferentes dosis del POLI-1 sobre los valores: la concentración de plaquetas (PTL), hematocrito (Hto), recuento absoluto de glóbulos rojos (RGR), concentración de hemoglobina (Hb),

cantidad de hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), volumen corpúscular medio (VCM) y porcentaje de distribución del tamaño de los eritrocitos (DTE) respectivamente.

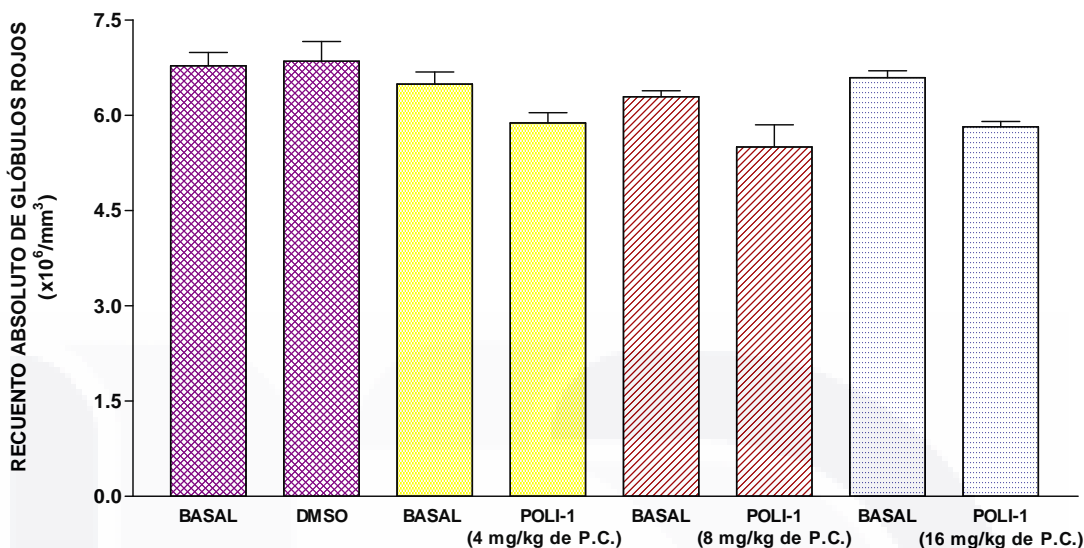
Las gráficas 11-17 muestran que el porcentaje del Hto tiende a disminuir con las tres dosis del POLI-1, pero solo lo hace significativamente tras la administración de 8 mg/kg de P.C. del POLI-1. La concentración de Hb disminuye tras la administración de 4, 8 y 16 mg/kg de P.C. del POLI-1. La administración de DMSO y las tres dosis del POLI-1 no cambiaron los valores de los PLT, RGR, HCM, CHCM, VCM y DTE.



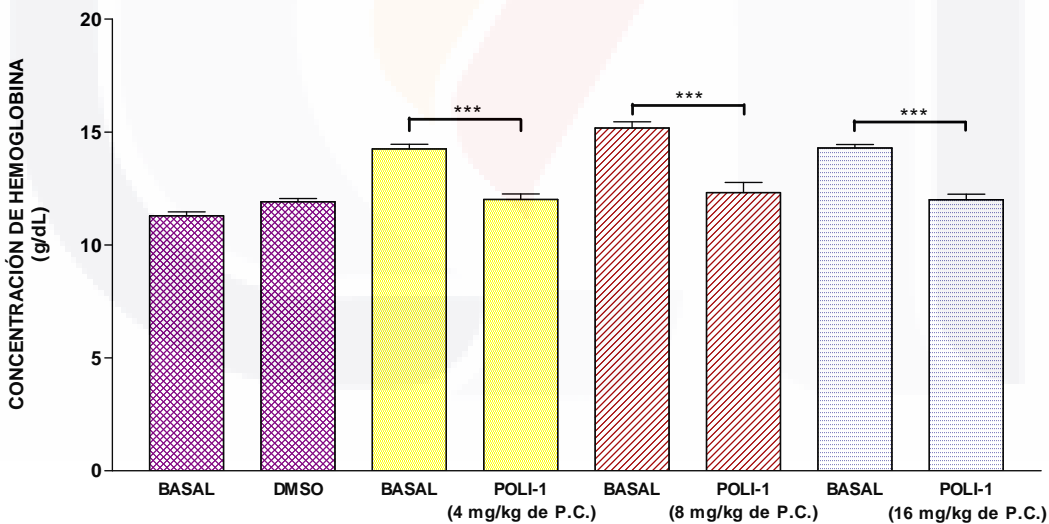
Gráfica 11. Efecto de la exposición aguda de Dimetilsulfóxido (100 µl de DMSO/rata) y diferentes dosis de POLI -1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la concentración de plaquetas (PLT) en sangre. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. Los valores basales de cada grupo se determinaron 48 horas antes de administrar los compuestos.



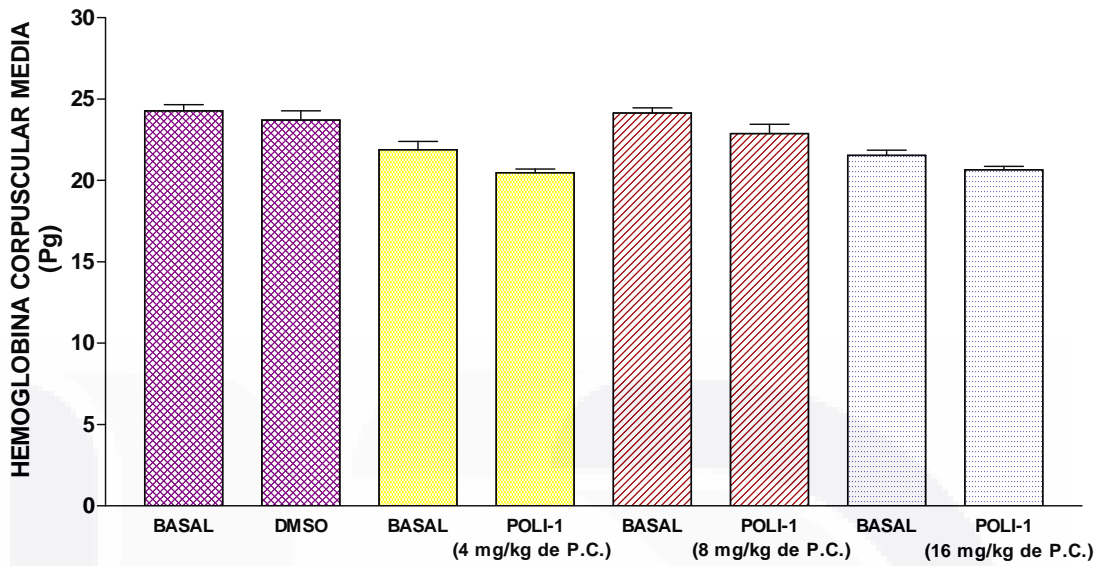
Gráfica 12. Efecto de la exposición aguda de Dimetilsulfóxido (100 µl de DMSO/rata) y diferentes dosis de POLI -1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre el porcentaje del hematocrito (Hto) en sangre. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. Los valores basales de cada grupo se determinaron 48 horas antes de administrar los compuestos. La diferencia se expresa como: *** = p < 0.001.



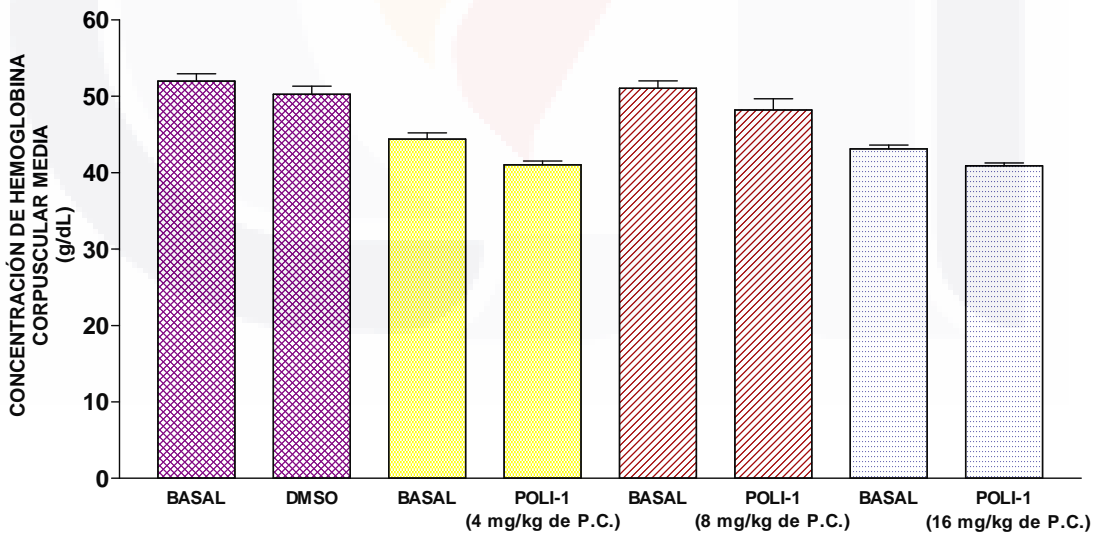
Gráfica 13. Efecto de la exposición aguda de Dimetilsulfóxido (100 μ l de DMSO/rata) y diferentes dosis de POLI -1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre el recuento absoluto de glóbulos rojos (RGR) en sangre. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. Los valores basales de cada grupo se determinaron 48 horas antes de administrar los compuestos.



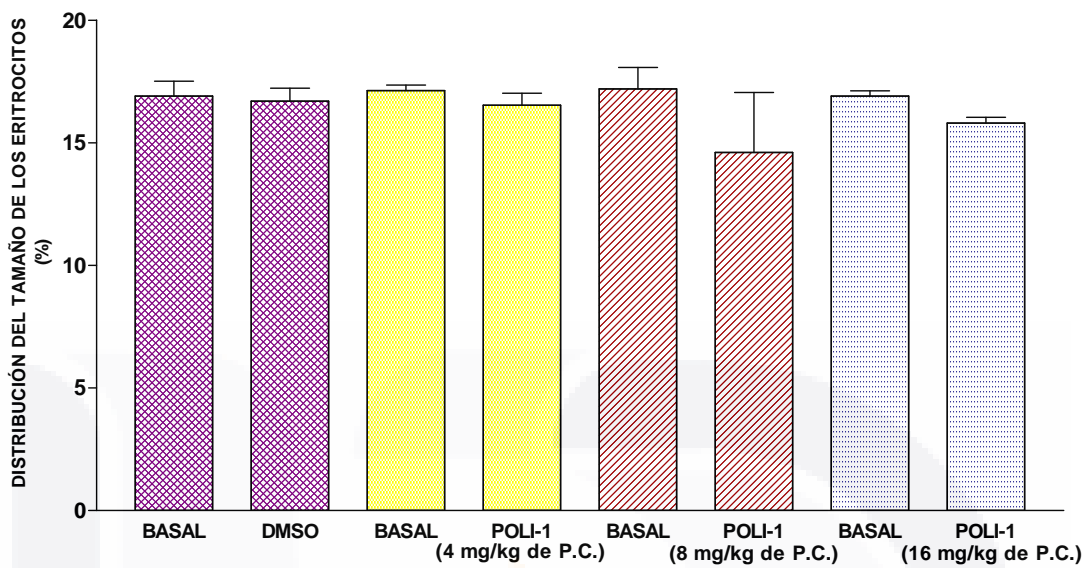
Gráfica 14. Efecto de la exposición aguda de Dimetilsulfóxido (100 μ l de DMSO/rata) y diferentes dosis de POLI -1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la concentración de hemoglobina (Hb) en sangre. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. Los valores basales de cada grupo se determinaron 48 horas antes de administrar los compuestos. La diferencia se expresa como: *** = $p < 0.001$.



Gráfica 15. Efecto de la exposición aguda de Dimetilsulfóxido (100 μ l de DMSO/rata) y diferentes dosis de POLI -1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la hemoglobina corpúscular media (HCM) en sangre. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. Los valores basales de cada grupo se determinaron 48 horas antes de administrar los compuestos.



Gráfica 16. Efecto de la exposición aguda de Dimetilsulfóxido (100 μ l de DMSO/rata) y diferentes dosis de POLI -1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la concentración de hemoglobina corpúscular media (HCM) en sangre. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. Los valores basales de cada grupo se determinaron 48 horas antes de administrar los compuestos.



Gráfica 17. Efecto de la exposición aguda de Dimetilsulfóxido (100 μ l de DMSO/rata) y diferentes dosis de POLI -1 (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la distribución del tamaño de los eritrocitos (DTE) en sangre. Cada valor representa la media \pm EEM, n=6 ratas/grupo. Los valores basales de cada grupo se determinaron 48 horas antes de administrar los compuestos.

DISCUSIÓN

1. PESOS ADRENALES, BAZO Y TIMO.

El hecho de que no se hayan observado cambios significativos en los pesos de las adrenales, del bazo y del timo, en respuesta al DMSO y las diferentes dosis del POLI-1 (Tabla 3), pudo haberse debido a que solo se administró en una sola ocasión cada una de las dosis del POLI-1. Además, el tiempo transcurrido entre la administración del compuesto y el sacrificio de los animales fue solo de 24 horas. Así, es posible que si el POLI-1 posee efectos tóxicos sobre estos órganos, se tendría que aumentar el número de dosis y el tiempo de tratamiento para que los cambios en el peso se hicieran evidentes. El bazo y el timo son órganos linfoides cuya función es la producción de los diversos tipos de leucocitos sanguíneos. En el primero los linfocitos B y T maduros responden a los antígenos y en el segundo maduran los linfocitos T (Abbas y Lichtman, 2003). Es sabido, que cuando un xenobiótico posee efectos tóxicos, ocurre una respuesta aguda del sistema de alarma del organismo (eje hipotálamo-hipófisis-adrenal o de estrés) el cual, a través del incremento de la secreción de corticosterona (en la rata), induce cambios en el conteo diferencial de los leucocitos sanguíneos (neutrofilia, eosinopenia y linfocitopenia) (Casas et al., 1994), situación que en nuestros animales experimentales no ocurrió (Tabla 8). En conjunto, estos datos sugieren que a corto plazo, el POLI-1 no estimuló el sistema de alarma del organismo ni posee efectos tóxicos directos que afecten el peso de las adrenales, el timo y el bazo. Sin embargo, hace falta hacer otros experimentos en donde se incluya el estudio histopatológico de estos órganos, para determinar si el POLI-1 induce cambios tempranos sobre ellos.

2. HÍGADO.

Las pruebas de funcionamiento hepático (enzimas TGO, TGP, FA, proteínas totales, albúmina, glucosa y contenido de glucógeno), mostraron que excepto por los cambios histológicos, el DMSO no afectó las funciones del hígado.

Por otro lado, la administración de las diferentes dosis del POLI-1 (4, 8 y 16 mg/Kg de P.C.), indujeron un incremento significativo en la actividad de la enzima TGO, y una disminución en las concentraciones séricas de albúmina y proteínas totales (gráficas 7 y 8). Aunque la significancia estadística solo ocurrió con las dosis de 4 y 16 mg/Kg de P.C. del POLI-1.

La albúmina constituye una de las proteínas hepáticas más importantes para el transporte sanguíneo de diversas moléculas como la bilirrubina, productos residuales del metabolismo celular y medicamentos (entre otras). Además, constituye el 60% de las proteínas totales del plasma. En nuestro estudio, la disminución de los niveles séricos de albúmina y proteínas totales, sugiere que el POLI-1 estaría afectando directamente la maquinaria sintética de las proteínas de los hepatocitos (retículo endoplásmico rugoso).

Sin embargo, de las enzimas analizadas, solo la actividad de la enzima TGO se alteró en respuesta a las diferentes dosis del POLI-1 (Gráfica 4), mientras que la TGP y la FA permanecieron dentro del rango del grupo control (Gráficas 5 y 6). Estos resultados, junto con los cambios histológicos y los niveles normales de glucemia, sugieren que los efectos tóxicos del POLI-1 inician con la alteración de la maquinaria sintética de proteínas.

El POLI-1 fue inicialmente sintetizado como antagonista de los receptores V_{1a} de la hormona arginina vasopresina (Correa et al., 2006). Es sabido que los hepatocitos poseen receptores V_{1a} de AVP y que responden a la hormona incrementando la glucogenólisis (Decaux, 2008). En nuestro estudio, encontramos un incremento significativo en los depósitos de glucógeno hepático en respuesta a la administración de las diferentes dosis del compuesto (Gráfica 10). Así, el incremento en el contenido de glucógeno hepático, puede explicarse por el efecto antagonista del POLI-1 sobre los receptores de vasopresina, y por otro, que la vasopresina endógena juega un papel importante en el control del metabolismo del glucógeno hepático. Es posible, que los cambios en la citología hepática también pueden ser explicados por los efectos del POLI-1 sobre los depósitos del glucógeno hepático.

3. RIÑÓN.

La administración de DMSO y las diferentes dosis del POLI-1 no afectaron la producción de orina ni el consumo de agua (gráficas 11 y 12), ni los niveles séricos de urea. Estos datos, sugieren que ni la velocidad de filtración glomerular ni los mecanismos de secreción y absorción de los diferentes segmentos de la nefrona fueron afectados por los respectivos tratamientos.

Así mismo, ninguno de los tratamientos indujo glucosuria ni bilirrubinuria, ni cambios significativos en la excreción de cuerpos cetónicos, proteínas, urobilinógeno,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

nitritos, número de leucocitos, cambios en la densidad urinaria y el pH. Estos resultados junto con la apariencia normal de los diferentes elementos histológicos del riñón, indican que el POLI-1 no posee efectos tóxicos sobre éste órgano. Por otro lado, es sabido que la AVP es una hormona que participa importantemente en el mantenimiento del equilibrio hídrico del organismo al regular la absorción de agua desde los ductos y túbulos colectores de la nefrona. La AVP actúa sobre las células tubulares a través de la activación de los receptores de tipo V_2 induciendo la movilización de los canales proteicos de acuaporinas, responsables de permitir la reabsorción de agua. Los estudios de anclaje del POLI-1 con los receptores V_2 de AVP (Rosendo y Correa, 2009), sugieren que el POLI-1 podría tener un efecto bloqueador sobre los receptores de AVP tipo V_2 . Si esto fuera así, los efectos del POLI-1 serían la inducción de un incremento en la producción de orina y una disminución en la densidad (orina diluida). Nuestros resultados no mostraron cambios en estas variables, sugiriendo fuertemente que el POLI-1, además de no poseer efectos tóxicos sobre el riñón, tampoco posee efectos bloqueadores sobre los receptores renales de AVP tipo V_2 .

4. SISTEMA INMUNE.

La presencia de receptores de AVP en algunos leucocitos circulantes, ha sido demostrada (Block et al, 1981; Elands et al, 1990; Hu et al, 2003; Hansenne et al, 2004). Los estudios de anclaje (*docking*) realizados por Ślusarz et al., (2006) sugieren teóricamente que el POLI-1 es afín a los receptores de AVP tipo $V1a$, por lo que podemos suponer que la administración de las diferentes dosis del POLI-1, podrían afectar tanto el porcentaje como las características morfológicas de los diferentes tipos de leucocitos circulantes. Los conteos diferenciales de los diferentes tipos de leucocitos sanguíneos en nuestros grupos experimentales, mostraron que los porcentajes de los leucocitos; neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos, no se alteraron en respuesta a la administración del DMSO ni a las diferentes dosis del POLI-1. Asimismo, en el estudio no encontramos cambios en las características citológicas de los diversos tipos de leucocitos. Sugiriendo además, que el POLI-1 no tiene efectos tóxicos sobre estas células sanguíneas.

La presencia de receptores de AVP en la membrana de las plaquetas y el efecto de agregación plaquetaria inducido por la vasopresina ha sido establecido (Thibonnier y

Roberts, 1985, Decaux, 2008), sin embargo, en nuestro estudio, los conteos plaquetarios y los frotis sanguíneos para la determinación de las características morfológicas y de agregación plaquetaria mostraron que en comparación con los conteos basales, ni el DMSO, ni las diferentes dosis del POLI-1 afectaron la cantidad ni la agregación plaquetaria.

Debido a la presencia de los receptores de AVP en los linfocitos y monocitos sanguíneos y del bazo (Torres y Johnson, 1997) se especula la posibilidad de que las células madre multipotenciales, células precursoras o alguna célula comprometida en los diversos tipos celulares de la médula ósea (eritrocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, linfocitos y plaquetas) puedan ser afectadas por el POLI-1. Si esto es así además de los cambios de los conteos diferenciales de los diferentes tipos de leucocitos circulantes, los efectos del POLI-1 deberán reflejarse en la eritropoyesis. En este sentido, de las variables estudiadas (hematocrito, hematocrito, recuento absoluto de hematíes, concentración de hemoglobina, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media, y distribución del tamaño de los eritrocitos) solo se afectaron el valor hematocrito y la concentración de hemoglobina. Dado que los conteos diferenciales de los leucocitos sanguíneos no se modificaron en respuesta a las diferentes dosis del POLI-1, mientras que los valores del hematocrito y de la concentración de hemoglobina disminuyeron, es posible que el POLI-1 afecte la síntesis de hemoglobina en algún momento de la eritropoyesis, lo que sugiere un efecto diferencial sobre la eritropoyesis y ninguno sobre la leucopoyesis. Más estudios se requieren para comprobar esta observación.

CONCLUSIONES

El hecho de que solo algunas de las variables estudiadas se vieran afectadas por los efectos agudos del POLI-1, sugiere: 1) Que los efectos agudos del POLI-1 no son muy relevantes desde el punto de vista toxicológico. 2) El incremento en el depósito de glucógeno hepático sugiere que el POLI-1 posee un efecto inhibitor específico sobre la glucogenólisis. Esta observación puede ser relevante, pues sugiere por primera vez que la AVP pudiera estar jugando un papel sobre el control del metabolismo hepático de los carbohidratos. 3) El hecho de que el porcentaje del hematocrito y la concentración de hemoglobina disminuyeran en los animales tratados con el POLI-1, sugiere que la AVP pudiera jugar algún papel en el metabolismo de los eritrocitos. 4) El hecho de que las variables relacionadas con la histología y la función renal no se alteraran en respuesta a las diferentes dosis del POLI-1, indica que este compuesto no posee efectos tóxicos ni antagonista de los receptores de AVP renales. En conjunto, los resultados muestran que a corto plazo el POLI-1 no posee efectos tóxicos significativos y sugiere que puede intervenir en el metabolismo del glucógeno hepático y de la hemoglobina a nivel de los hematíes.

ANEXOS O APÉNDICE

1. Materiales y reactivos para la determinación de glucógeno hepático.

- Bisturí
- Balde
- Tubos de ensaye de 20 mL y 5 mL
- Homogeneizador
- Vidrio de reloj
- Gradillas para tubos de ensaye de vidrio
- 1 Parrilla
- Baño María
- Baño de hielo
- Termómetro
- Celdillas de vidrio óptico
- Espectofotómetro
- Probeta de diferentes volúmenes
- Papel aluminio
- Guantes
- Cubre bocas
- Campana de extracción
- Parafilm
- Balanza analítica
- Charola de plástico pequeña
- Frasco ámbar de 250 mL
- Agitadores magnéticos
- Parrilla magnética.
- Potenciometro
- Agitador Vortex
- Sanitas o papel higiénico
- Pipetas de diferentes volúmenes.
- Cronómetro
- Pinzas pequeñas
- Hielo
- Agua destilada
- Ácido cítrico
- O-Toluidina
- Fluoruro de sodio (NaF)
- Lentejas de hidróxido de sodio (NaOH)
- Glucosa (dextrosa anhidra)
- Acido acético glacial
- Tiourea
- Solución amortiguadora de pH
- Soluciones de NaOH de diferentes normalidades.
- Soluciones de HCl de diferentes normalidades.

- Polytron
- Agitador orbital para medios de cultivo
- Microtubos
- Gradillas para microtubos
- Papel encerado
- Pinzas de disección pequeñas

1.1 Preparación del reactivo de *O*-Toluidina.

Para preparar 250 mL de *O*-Toluidina:

- 1.- En una probeta de 150 mL se colocan 0.375 g de tiourea y 100 mL de ácido acético glacial. Se tapan con parafilm y se agita vigorosamente hasta mezclar.
- 2.- Se vacía la solución a una probeta de 500 mL y se añade 15 mL de *O*-Toluidina, se sella con parafilm y se mezcla.
- 3.- Con ácido acético glacial se afora a 250 mL, se sella con parafilm y se agita vigorosamente.
- 4.- En un frasco ámbar envuelto en papel aluminio se vierte la solución final.
- 5.- Se cierra perfectamente, se rotula el frasco como “solución de *O*-Toluidina” y se almacena a temperatura ambiente hasta su uso.

1.2 Preparación del buffer de citratos 0.1 M de pH = 4.2.

Para preparar 500 mL de buffer se requiere:

- 1.- En una probeta de 1 L se colocan 9.6065 g de ácido cítrico en 400 mL de agua destilada y se disuelve.
- 2.- Se añaden 1.25 g de Fluoruro de sodio (NaF) y se mezcla.
- 3.- Con ayuda del potenciómetro se mide y ajusta a 4.2 el pH de la solución con lentejas de NaOH y gotas de NaOH de diferentes normalidades.
- 4.- Se afora a 500 mL con agua destilada y se agita.
- 5.- La solución se almacena en refrigeración (2-8°C) hasta su uso.

1.3 Preparación de la solución madre de glucosa de 10 µg/µL (10 mg/ml) de concentración. Para preparar 10 mL se vierten 10 mL de agua destilada y 0.100 g de dextrosa anhidra (glucosa) en un matraz Erlenmeyer de 25 mL, se agita y refrigera hasta su uso.

1.4 Preparación de la solución final de glucosa de 1 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ de concentración. Para preparar 2 mL se vierten 1800 μL de agua destilada y 200 μL de la solución madre en un tubo de ensaye de 5 mL. Se mezcla en vortex y se refrigera hasta su uso.

Nota. Se rotulan ambos recipientes.

1.5 Estandarización de la curva patrón de Glucosa.

Para trabajar se requiere: 1) un área de trabajo limpia 2) baño de María en ebullición, 3) baño de hielo lleno, 3) espectrofotómetro encendido, 4) material limpio, 5) que haya recipientes para el desecho de puntas y reactivos, 6) gradillas para tubos de vidrio y microtubos y 7) soluciones a temperatura ambiente.

1.- La curva patrón se hace por triplicado en tubos de vidrio de 5mL en el siguiente orden: 1) solución final de glucosa (glucosa), 2) agua destilada (H_2O), 3) se mezcla en vortex, 4) *O*-Toluidina y 5) se mezcla nuevamente en vortex.

No. Tubo	Glucosa (μL)	Glucosa [μg]	H_2O (μL)	<i>O</i> -Toluidina (μL)	Volumen total (μL)
1	0	1	275	750	1025
2	10 (SM)	10	265	750	1025
3	25 (SM)	25	250	750	1025
4	5.0 (SF)	50	270	750	1025
5	10.0 (SF)	100	265	750	1025
6	15.0 (SF)	150	260	750	1025
7	20.0 (SF)	200	255	750	1025

SM. Solución madre, SF. Solución final y H_2O . Agua destilada

2.- Se incuba la curva patrón en baño María por 20 minutos y eventualmente se agita.

3.- Al sacar la curva patrón, inmediatamente se coloca en el baño de hielo por 1 o 2 minutos procurando agitar eventualmente.

4.- Se saca del baño de hielo y se coloca la curva patrón en gradillas.

5.- Se homogeneiza la curva patrón en vortex y se obtiene el valor de la absorbancia en el espectrofotómetro a 630 nm con celdillas de vidrio óptico. Utilizando como blanco agua destilada.

6.- Antes de leer las muestras en el espectrofotómetro limpiar las celdillas de vidrio con papel higiénico o sanitas.

7.- Se promedian las absorbancias de cada punto de la curva y se extrapola con las concentraciones conocidas de la curva patrón para obtener la concentración de glucosa.

Nota. Si la curva patrón no es suficiente para determinar la concentración de glucosa se debe hacer otra curva patrón que incluya más puntos. Es importante que los procesos que involucren *O*-Toluidina se hagan en campana de extracción.

2. Material para la tinción de leucocitos con el colorante de Giemsa.

- Muestra de sangre
- Colorante de Giemsa líquido para sangre
- Microtubos
- Etanol al 96°
- Laminillas de vidrio
- Agua destilada
- Pipeta de 10 µL
- Solución de EDTA al 1%
- Reloj cronométrico
- Frascos tipo Coplin
- Gradilla
- Sanitas o papel higiénico
- Contador celular

3. Materiales y reactivos necesarios para la fijación y corte de tejidos (Prophet et al., 1994).

3.1 Materiales y reactivos necesarios para la fijación en parafina.

- Muestras de tejidos fijados en formol neutro 10%
- Parafina
- Canastillas
- Etanol (70%, 80%, 85%, 90%, 95% y 100%).
- Procesador de tejidos Leica TP 1020
- Xilol

3.2 Materiales y reactivos necesarios para la preparación de tejidos en cubos de parafina.

- Dispensador de parafina Leica EG 11400
- Bisturí
- Etiquetas para los tejidos
- Barra de Leuckart

3.3 Materiales y reactivos para hacer los cortes histológicos.

- Microtomo Leica RM 2125 con navaja mellada y limpia
- Baño de agua para tejidos (45-50°C) Leica 26103
- Laminillas biceladas y limpias.
- Lámpara de luz
- 1 Palillo de madera o pincel
- Xilol



Procesador de tejidos Leica
TP 1020



Base de aluminio y escuadras
(barras de Leuckart)



Microtomo Leica
RM 2125



Baño de agua para tejidos Leica 26103

3.4 Materiales y reactivos necesarios para la tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) en tejidos.

- Porta laminillas
- Xilol o xileno
- Etanol al 80%, 95% y 100%
- Colorante de Eosina Floxina

GLOSARIO

Absorción: Proceso por el cual los tóxicos cruzan las membranas de nuestro cuerpo y entran en el torrente sanguíneo o sistema linfático.

Acuaporinas. Son proteínas de membrana celular, forman canales que permiten un elevado flujo de agua a través de la membrana. En el riñón existen al menos siete isoformas de acuaporina.

Afinidad. Definida como la capacidad que posee un fármaco para unirse al receptor específico y formar el complejo fármaco-receptor a concentraciones muy bajas del fármaco o ligando (que se une)..

ARNm: Molde para la síntesis de proteínas, la secuencia de bases de ARNm es complementaria a la de un gen de ADN.

Adenilato ciclasa: Es una vía de trasducción de la señal que emplea AMPc y una serie de enzimas para convertir una señal extracelular en una señal intracelular.

Aducto: Producto formado entre un xenobiótico, o sus metabolitos activos y una macromolécula biológica. Por ejemplo: óxido de etileno y ADN.

AMPc: Nucleótido cíclico formado del ATP y un importante segundo mensajero en una variedad de sistemas de señalización.

Anclaje (*docking*): Herramienta computacional que se utiliza para predecir el efecto biológico de compuestos de forma dirigida basándose en las interacciones fármaco-receptor, estos, dependen de sus grupos funcionales por interacciones de tipo $\pi-\pi$ (fuerzas débiles que ocurren entre grupos aromáticos).

Antagonista: Sustancia que disminuye o invierte el efecto inducido por un agonista. Sustancia que se une y bloquea los receptores celulares que normalmente se enlazan a sustancias naturales en su acción fisiológica. Una molécula que se une a una proteína receptora pero que no dispara la vía de señalización.

Arginina vasopresina (AVP). Es un péptido con potente acción vasoconstrictora, su concentración en plasma es regulada por la osmolalidad de los líquidos corporales y su liberación se incrementa cuando aumenta dicha osmolalidad. Tiene como característica primordial la alteración de la excreción de agua con independencia de la tasa de excreción de sodio.

Bioactivación. Conversión metabólica de un xenobiótico a un derivado más tóxico. Proceso metabólico por el cual una sustancia madre es químicamente cambiada a una sustancia hija con actividad biológica potenciada.

Biotransformación. Cualquier transformación química de una sustancia producida por organismos vivos o por preparaciones obtenidas de estos. Conversión de un químico desde una forma a otra por un organismo biológico.

Cetogénesis. Proceso metabólico por el cual se forman en el hígado los cuerpos cetónicos (acetoacetato acetona y betahidroxibutirato) por la oxidación (β oxidación) metabólica de los ácidos grasos. El proceso tiene lugar cuando la gluconeogénesis es activa, pues induce una disminución en los niveles de oxalacetato, impidiendo que el acetil-CoA de la beta-oxidación se oxide completamente en el ciclo de Krebs. Estos metabolitos aumentan en situaciones como diabetes descompensada o ayuno prolongado. Puede ser determinada por la presencia de cuerpos cetónicos eliminados en la orina en el cual el organismo realiza un balance cuando hay un exceso de grasas. Hormonas como la ACTH, GH, o prolactina tienen un efecto cetógeno sobre el organismo. Estas hormonas son conocidas por su efecto hipoglucemiante, con lo que el organismo derivará hacia gluconeogenesis estimulando de esta forma la producción de los cuerpos cetónicos.

Citocromo P-450: Enzima con gran número de isoformas inducidas o inhibidas por agentes químicos determinados, y clave en la biotransformación y eliminación de un gran número de xenobióticos.

CYP2E1: Isoenzima de la familia del citocromo P-450 tipo 2 con actividad catalítica por compuestos pequeños hidrofóbicos exógenos como etanol, alcoholes de cadena corta y N-nitroso-dimetil-amina, se correlaciona con la homeostasis de glucosa y puede intervenir en la gluconeogénesis (en humanos). Participa en la biotransformación del paracetamol y algunos anestésicos volátiles como enflurano, halotano, isoflurano, metoxiflurano y sevoflurano.

Colestasis. Es el resultado de la alteración en la secreción canalicular de bilis o por obstrucción biliar distal a los canalículos biliares.

Detoxificación. También llamada desintoxicación, es un proceso de transformación química que hacen a una molécula menos tóxica.

Diabetes insípida. Es también llamada diabetes de agua. Es distinta y menos común que la diabetes mellitus, que implica problemas con la insulina y altos niveles de azúcar

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

en la sangre. La diabetes insípida es causada por un problema con la glándula pituitaria o la forma con que los riñones manejan los líquidos riñones. En el organismo se producen deseos de orinar, mucha sed e ingesta de abundante líquido. El cuerpo produce grandes volúmenes de orina que son casi pura agua.

Dosis: Cantidad de sustancia administrada o absorbida por un individuo en proporción a su peso o volumen corporal, ordinariamente en 24 horas. Se suele expresar en mg/K.

Droga: Cualquier sustancia que cuando es absorbida por organismos puede modificarles una o más de sus funciones. Forma bruta o extracto de productos naturales, de aplicación en la industria, artes o la farmacia. Término usado para designar medicamentos o sustancias de uso abusivo (drogas de abuso).

Efecto adverso: Cambio en la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo o tiempo de vida de un organismo, que afecta su capacidad funcional o de la homeostasis, o presenta un incremento de su susceptibilidad a los efectos dañinos de influencias ambientales

Efecto agudo: Aquel de rápida aparición y curso (en las primeras 24 horas o en los primeros 14 días, según el tiempo de estudio) producidos por una sola dosis o por corta exposición a una sustancia o radiación. Es un efecto que ocurre casi inmediatamente (horas/días) después de una exposición breve o única a un agente tóxico. Generalmente, los efectos agudos serán evidentes dentro de 14 días.

Eliminación: Resultado global de los procesos de biotransformación y de excreción por los que el organismo se libera de sustancias.

Ensayo de toxicidad: Estudio experimental de los efectos adversos de una sustancia sobre un organismo vivo, durante un tiempo determinado y condiciones definidas.

Ensayo de toxicidad aguda: Estudio experimental para determinar los efectos adversos que pueden aparecer en un corto tiempo (usualmente dos semanas) después de una dosis única de una sustancia, o de varias dosis administradas en 24 horas.

Encefalomielitis experimental autoinmune (EEA). Enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central mediada por linfocitos T, la cual puede ser inducida por la inyección de antígenos de mielina suspendidos en adyuvante completo de Freud.

Endonucleasas. Tiene como función cortar la doble cadena de ADN a través del esqueleto de fosfatos sin dañar las bases.

Eritroblasto. Célula de la médula ósea progenitora del eritrocito o hematíe.

Enzima: Catalizador de las reacciones bioquímicas, que facilitan la biotransformación de los sustratos. Macromoléculas biológicas que actúan como catalizadores para reacciones bioquímicas; aunque casi todas son compuestas de proteínas, recientemente moléculas de ARN catalíticamente activas han sido descubiertas.

Especificidad. Conjunto de propiedades o características de una persona o una cosa que permiten distinguirla de otras. Es la capacidad de una prueba de producir resultados negativos en personas que no padecen la enfermedad (Verdaderos negativos). La especificidad del receptor farmacológico se refiere a la capacidad de éste para discriminar entre una molécula de ligando de otra, pese a que éstas puedan ser muy similares.

Excreción: Eliminación de sustancias endógenas o absorbidas, o de sus metabolitos o productos de desecho, a través de los órganos del cuerpo, y por medio de orina, bilis, heces, sudor, leche, aliento, pelos, uñas, etc. Los órganos principales de excreción son riñón y tubo digestivo.

Exposición: Situación en la cual una sustancia puede incidir, por cualquier vía, sobre una población, organismo, órgano, tejido o célula diana. Concentración, cantidad o intensidad de un determinado agente físico, químico o biológico, que incide sobre la población, organismo, órgano o célula diana; usualmente se expresa en términos cuantitativos de concentración, duración y frecuencia (para agentes químicos y microbiológicos) o de intensidad (para agentes físicos)

Fármaco: Cualquier producto que puede ser absorbido por un organismo, difundirse en él y producirle cambios favorables o no. Los fármacos empleados para el tratamiento de enfermedades son los medicamentos.

Fosfolipasas. Enzimas de especificidad específica variante que cataliza la degradación de fosfolípidos; pueden funcionar como enzimas digestivas y como componentes de las vías de transducción de la señal.

Glucólisis. También llamada glicolisis (del griego glycos: azúcar y lysis: ruptura), es la vía metabólica encargada de oxidar o fermentar la glucosa y así obtener energía para la célula. Ésta consiste de 10 reacciones enzimáticas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato, la cual es capaz de seguir otras vías metabólicas y así continuar entregando energía al organismo. Cuando el organismo se nutre, provoca un cambio en los flujos metabólicos. Se disminuye hasta el mínimo la gluconeogénesis y la glucosa que se absorbe es almacenada como glucógeno.

Gluconeogénesis. Es una ruta metabólica anabólica que permite la síntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos. Incluye la utilización de varios aminoácidos, lactato, piruvato, glicerol y cualquiera de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (o ciclo de Krebs) como fuentes de carbono para la vía metabólica. Todos los aminoácidos, excepto la leucina y la lisina, pueden suministrar carbono para la síntesis de glucosa.

Cuando el organismo ha disminuido la reserva de glucógeno y no hay ingesta de carbohidratos, se ve obligado a sintetizar glucosa a partir de otros compuestos, como el glicerol proveniente de la rotura de grasas neutras o triglicéridos de los depósitos.

Glutación: Es un tripéptido formado por tres aminoácidos: glicina, cisteína y ácido glutámico. Se encuentra en la mayoría de los tejidos, sobre todo en el hígado. Juega un papel importante en la detoxificación y protección celular.

Hapteno: Sustancia química de pequeño peso molecular que no induce por sí misma la formación de anticuerpos pero al unirse a una proteína transportadora (ej. Albumina) estimula una respuesta inmunitaria. Un hapteno es la parte de un antígeno que por sí sola no dispara respuesta inmune, pero sí posee especificidad.

Hepatotoxicidad. Es el daño hepático que se asocia con insuficiencia hepática causado por la exposición a un fármaco u otro agente no infeccioso.

Hipertrofia del miocardio. Es el aumento del tamaño de cada miocito, sin cambiar el número total de miocitos y de capilares. Como consecuencia, aumenta la distancia de difusión de oxígeno por ello, el centro de las fibras musculares hipertrofiadas se vuelve hipotónico.

Isquemia renal: Es la insuficiencia renal que induce alteraciones funcionales.

Insuficiencia renal aguda (IRA): Síndrome caracterizado por el deterioro rápido de la función renal, que origina la acumulación de sustancias nitrogenadas, junto con otras manifestaciones que incluyen alteraciones en la regulación de electrolitos, equilibrio ácido-base, balance de líquidos y oliguria.

Metabolito: Cualquier producto intermedio o final resultante del metabolismo.

Mitocondria: Organelo en forma ovalada, sitio de las enzimas del ciclo del ácido cítrico y las enzimas de la oxidación de los ácidos grasos. Lleva a cabo la fosforilación oxidativa.

Monooxigenasa, citocrom P-450: Enzimas que usan oxígeno e incorporan un átomo de oxígeno dentro de un sustrato y reducen el otro átomo de agua; importante en la

síntesis de hormonas esteroides y tirosina, también como en la detoxificación de compuestos xenobióticos.

Natriurético: Sustancia que aumenta la excreción urinaria del ión sodio.

Necrosis: Muerte masiva de áreas de tejido rodeadas de zonas sanas. Cambios morfológicos subsiguientes a la muerte celular, caracterizados frecuentemente por cambios nucleares.

Osmolalidad: Medida de la presión osmótica generada por una solución. Es la concentración de moléculas osmóticas activas o medida de la concentración de una sustancia soluble en una solución en términos de su efecto osmótico.

Proteínas G: Es una proteína de unión al nucleótido guanina que es un componente de la vía de señalización intracelular. En el estado inactivo, la proteína G (también llamada proteína G heterodimérica) es una proteína trimérica que consiste de las subunidades $\alpha\beta\gamma$, con un GDP unido a la subunidad α . En el estado activo, la proteína α intercambia GDP por GTP y se disocia de las subunidades $\beta\gamma$. La subunidad α unida a GTP propaga la señal. La propagación de la señal es terminada cuando la subunidad α hidroliza GTP a GDP y se reasocia con las subunidades $\beta\gamma$.

Proteinuria. Presencia de proteínas en la orina.

Poliuria. Excreción de un gran volumen de orina diluida causada por la insuficiente liberación de AVP.

Receptor. Cualquier molécula biológica con la que interaccionan los fármacos para ejercer sus efectos (según este criterio también se considerarían receptores las enzimas, los transportadores de membrana y los canales iónicos), los receptores propiamente dichos son moléculas biológicas o estructuras macromoleculares altamente especializadas cuya misión es servir como sitio de reconocimiento específico de neurotransmisores, hormonas y otros mediadores.

Retículo endoplásmico: Complejo intracelular de membrana en el cual se sintetizan proteínas y lípidos y en el que se desarrollan las reacciones de biotransformación por el sistema de enzimas monooxigenasas; se aísla por procedimiento de fraccionamiento celular en forma de microsoma. Es un sistema extenso de membranas citoplasmáticas que comprenden cerca de la mitad del total de las membranas celulares. La región del RE que se une a los ribosomas es llamado RE rugoso, y la región que es privada de ribosomas es llamada RE.

Salud: Estado de bienestar completo físico, mental y social, y no meramente la ausencia de dolor o enfermedad. Estado de equilibrio dinámico en el cual la capacidad de un individuo o un grupo puede hacer frente a las circunstancias esta en un nivel óptimo.

Suero: También llamada suero sanguíneo. Es la fracción acuosa proteica de la sangre que permanece líquida después de la coagulación.

Transaminación. Es una reacción general donde hay traspaso de nitrógeno de uno a otro aminoácido y en ella participan un aminoácido y un cetoácido. Las transaminaciones mas frecuentes son aquellas en las que participa el alfa-cetoglutarato cuya aminación produce glutamato.

Tóxico: Cualquier agente químico o físico capaz de producir un efecto adverso para la salud. Todos los agentes físicos y químicos son tóxicos potenciales ya que su acción depende de la dosis y de las circunstancias individuales y ambientales.

Ureagénesis. Proceso por el cual la urea se convierte en el producto de desecho final del metabolismo de los aminoácidos y de la desintoxicación del amoniaco presente en la sangre.

Vaptanes. Sustancias o moléculas sintéticas no derivadas de la molécula de AVP con propiedades antagonistas de los receptores de AVP.

Vasopresina (AVP): hormona liberada principalmente en respuesta a cambios en la osmolalidad sérica o en el volumen sanguíneo.

Vía de exposición: Medio por el que un tóxico accede a un organismo a través del tracto gastrointestinal o vía digestiva o central (ingestión), del tracto respiratorio o vía respiratoria o pulmonar (inhalación), a través de la piel o vía dérmica o cutánea (tópica) o mediante introducción o inyección por las vías intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.

Xenobiótico: Cualquier sustancia que interactúa con el organismo y que no es uno de sus componentes naturales. También puede llamarse sustancia extraña o exógena.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas K. A. and Lichtman H.A. Cellular and Molecular Immunology. SAUNDERS. 5th edition. USA, 2003. Pages: 562.
- Allende G., Chavira R. and Quintanar S.A. Biochemical Evidence of the Functional Recovery and Regeneration of Adrenal Autotransplants in the Rat Spleen. *Endocrine*, 2001. 16(3): 173-179.
- Baker J.H. Russell J. L., Weisbroth H. S. The laboratory rat Volume I: Biology and diseases. Academic Press. New York, 1979. Pags 435.
- Bach P.H., Bonner F.W., Bridges J.W. Lock E.A. Nephrotoxicity Assessment and Patogenesis. Monographs in applied toxicology. No.1. John Wiley & Sons, 1982.
- Bell J., Adler M.W. and Greenstein J.I. The effect of arginine vasopressin on the autologous mixed lymphocyte reaction. *International Journal of Immunopharmacology*. 1992. 14:93-103.
- Berne y Levy (eds). Levy M. N., Koeppen B.M. y Stanton B.A. Fisiología. Elsevier Mosby. Boston. 4^a edición. 2006. Pags: 817.
- Birnbaumer M. Vasopressin Receptors. *Elsevier Science*, 2000. 11(10): 406-409.
- Block L.H., Locher R., Tenschert W., Siegenthaler W., Hofmann T., Mettler E. and Vetter W. 125I-8-L-arginine vasopressin binding to human mononuclear phagocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 1981. 68:374-81.
- Bowman W.C. y Rand M.J. Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas. Interamericana. 2^a edición. México, 1984. Pags: 43.43.
- Cas L.D., Metra M. and Leier C.V. Electrolyte disturbances in chronic heart failure: metabolic and clinical aspects. *Clinical Cardiology*. 1995. 18:370-376.
- Casas A., Amich L.M.S. y Prieto S. Laboratorio de Hematología. Mc Graw-Hill. México, 1994. Pags: 605.
- Correa J., Espinosa R. J., González M. M., Espinoza F. M., Vazquez A. I. and Trujillo F J. Inhibition of acetylcholinesterase by two arylderivates: 3^a-Acetoxy-5H-pyrrolo(1,2-a)(3,1)benzoxazin-1,5-(3aH)-dione and *cis*-N- ρ -Acetoxy-phenylisomaleimide. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2006. 21(2):133-138.

- Decaux G., Soupart A. and Vassart G. Non-peptide arginine-vasopressin antagonists: the vaptans. *Lancet*, 2008. 371:1624-1632.
- Drucker C. R. Fisiología Médica. Manual Moderno. México, 2005. Pags: 938.
- Firsov, D., Mandon, B., Morel, A., Merot, J., Le Maout, S., Bellanger, A. C., de Rouffignae, C., Elalouf, J. M. and Buhler J. M. Molecular analysis of vasopressin receptors in the rat nephron. Evidence for alternative splicing of the V2 receptor. *Pflugers Arch. European Journal of Physiology*, 1994. 429:79-89.
- Gad C.S. and Chengelis P. C. Animal Models in toxicology. Drug and chemical Toxicology. Marcel Dekker, Inc. New York. 1992. Pags: 884.
- Ganong W.F. Review of Medical Physiology. Chapter 14: Central Regulation of visceral function. Lange Medical Books-McGraw-Hill. New York. 2005: pp 232-255.
- Gardner R.C., Heck E. D., Yang S. C., Thomas E.P., Zhang X.J., DeGeorge L.G., Laskin D. J and Laskin L. D. Role of Nitric Oxide in Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in the Rat. *Hepatology*, 1998. 27(3): 748-754.
- Goodman Gilman A (Eds). Jackson E.K. Vasopressin and other agents affecting the renal conservation of water. In: Hardman JG, Limbird LE, Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª edición. Vol. I y II. NY: McGraw-Hill, 2003: Pags. 2150.
- Gumucio J. J. and Miller L. D. Functional Implications of Liver Cell Heterogeneity. *Gastroenterology*. 1981Vol. 80 (2): 393-403.
- Guyton A.C. and Hall J. E. Tratado de fisiología médica. 11ª ed. ELSEVIER. Madrid, 2006. Pags: 1115.
- Hansenne I., Rasier G., Charlet R. C., DeFresne M.P., Greimers R., Breton C., Legros J.J., Geenen V. and Martens H. Neurohypophysial receptor gene expression by thymic T cell subsets and thymic T cell lymphoma cell lines. *Clinical and Developmental Immunology*, 2004.1:45-51.
- Hirasawa A., Nakayama Y., Ishiharada N., Honda K., Saito R., Tsujimoto G., Takano Y. and Kamiya H. Evidence for the existence of vasopressin V2 receptor mRNA in rat hippocampus. *Biochemistry Biophysics Response Communication*, 1994. 205(3): 1702-1706.

- Hu S.B., Zhao Z.S., Yhap C., Grinberg A., Huang S.P., Westphal H. and Gold P. Vasopressin receptor 1a-mediated negative regulation of B cell receptor signaling. *Journal of Neuroimmunology*, 2003. 135: 72-81.
- Jaramillo J. F., Rincón S. A.R., Posadas del R. F.A. *Toxicología Básica. Textos Universitarios*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México, 2006. Pags: 331.
- Jard, S., Gaillard, J.M.R., Guillon, G., Marie, J., Shoenenberg, P., Muller, A.F., Manning, M. and W.H. Sawyer. Vasopressin antagonists allow demonstration of a novel type of vasopressin receptors in the rat adenohypophysis. *Molecular Pharmacology*. 1986. 30:171-177.
- Jard S. Vasopressin receptors. In: Zingg HH, Bourque CW, Bichet DG (Eds). *A survey advances of experimental medicine and biology*. NY: Plenum Press, 1998: Vol 449, pp 1-13.
- Johnston D.E. Special considerations in interpreting liver function tests. *American Family Physician*, 1999. 59(8):2223-2230.
- Johnson and Johnson company. *Products VITROS Chemistry: Instrucciones de uso*. Ortho-Clinical Diagnostics. EE.UU. (2003)
- Junqueira C. and Carneiro J. *Basic Histology. A text and atlas Schematic diagram of the cellular Ultrastructure of the nephrons Modified Figure 19-16*. pag: 393.
- Kato Y., Igarashi N., Hirasawa A., Tsujimoto G. and Kobayashi M. Distribution and developmental changes in vasopressin receptor mRNA in rat brain. *Differentiation*, 1995. 59(3):163-169.
- Kim R. K., Kim C. G., Choi S. J., Ahn W.D. and Park S. Y. Renal Transport Systems for organic anions and Catins in Cadmium-Exposed Rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1998. 149: 144-149.
- Fowler, B.A. "The nephropathology of metals", In. *Toxicology of metals*, Editor Mc-Combs Ken. CRC Press, Inc. 1996. 721-729.
- Gregus Z. and Klaassen C.D. Mechanisms of toxicity. In: Casarett and Doull's *Toxicology: The basic science of poisons*, (CD Klaassen, editor). 6th ed. McGraw-Hill, 2001. Pp: 35-81.

- Mendieta W.J.E., Rosales H.M.C., Hulme R., Trujillo F.J., López P.G., Tamay C.F., Ramos M. R. and Correa B.J.C. Comparing the electronic properties and docking calculations of heme derivatives on CYP2B4. *Journal Molecular Modeling* (2008). 14: 537-545.
- Murat J. C. and Serfaty A. Simple Enzymatic Determination of Polysaccharide (Glycogen) Content of Animal Tissues. *Clinical Chemistry*, 1974. 20; 1576-1577.
- Navarro J.V. and Senior R.J. Review article: Drug-Related Hepatotoxicity. *The New England Journal of Medicine*, 2006. 354:731-739
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. and Sobin L.H. Laboratory methods in histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology, 1994. Pages: 274.
- Quintanar S. A., Organista E. A., Rodriguez P. A., Campos T. B., Esquivel D. P.C. and CorreaB. J. Protección contra la encefalomiелitis experimental autoinmune por las drogas 3A-acetoxi-5H-pyrrolo (1,2-A) (3,1)benzoxazin-1-5-(3AH)-dione (POLI-1) y Cis-N-PAcetoxy-phenylisomaleimide (POLI-2). L Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Puebla. México. Septiembre, 2007.
- Quintanar S. A., Kovacs K. and Berczi I. Effects of neurointermediate pituitary lobectomy on humoral and cell-mediated immune responses in the rat. *Neuroimmunomodulation*, 2004. 11: 233-240.
- Quintanar S.A., Chavira R. R., Kovacs K. and Berczi I. Neurointermediate pituitary lobectomy decreases the incidence and severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Journal of Endocrinology*, 2005a. 184:51-58.
- Quintanar S.A., Organista E. A., Tinajero R.M. y Delgado G. E. Efecto directo de la vasopresina sobre la respuesta inmune celular (encefalitis autoinmune experimental) en simposium: “Integración Multidisciplinaria en el estudio de las bases neurobiológicas de la conducta y tópicos afines”. Aguascalientes, Ags. 23 de Septiembre del 2005b.
- Quintanar S. A., Organista E. A., Delgado G. E., Chávez R. C., Reyes E.M.C. y García G. D. Protección contra la encefalomiелitis experimental autoinmune (EEA) por antagonistas de los receptores de vasopresina. XLIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Querétaro, Qro. Septiembre. 2006.

- Raucy J.L., Kraner J.C. and Lasker J.M. Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1. *Clinical Review Toxicology*, 1993. 23: 1-20.
- Shimada Y., Taniguchi N., Mutsushisa A., Akane H., Kawano N., Suzuki T., Tobe T., Kakefuda A., Yatsu T., Tahara A., Tomura Y., Kusayama T., Wada K., Tsukada J., Orita M., Tsunoda T. and Tanaka A. Synthesis and biological activity of novel 4,4-difluorobenzazepine derivatives as non-peptide antagonists of the arginine vasopressin V1A receptor. *Bioorganic & Medicine Chemistry*, 2006. 14(6): 1827-1837.
- Slusarz R., Sikorska E., Ciarkowski J. Molecular docking-based study of vasopressin analogues modified at positions 2 and 3 with N-methylphenylalanine: influence on receptor-bound conformations and interactions with vasopressin and oxytocin receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006. 49(8):2463-2469.
- Sokal M. E., Mostin J. and Buts J.P. Liver Metabolic Zonation in Rat Biliary Cirrhosis: Distribution is Reverse of that in Toxic Cirrhosis. *Hepatology*, 1992. Vol. 15: 904-908.
- Tang W. and Shaikh A. Z. Renal cortical mitochondria dysfunction upon cadmium metallothionein administration to Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2001. 63:221-235.
- Thibonnier M. and Roberts J.M. Characterization of Human Platelet Vasopressin Receptors. *Journal of Clinical Investigation*. 1985. 76: pp: 1857-11864.
- Torres A.B. and Johnson M. H. Arginine vasopressin (AVP) replacement of helper cell requirement in IFN- γ production. Evidence for a novel AVP receptor on mouse lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 1988. 140 (7):2179-2183.
- Torres A.B. and Johnson M. H. Neuroendocrine Peptide Hormone Regulation of Immunity. Blalock JE (ed): *Neuroimmunoendocrinology*. 3rd rev. ed. USA, 1997. 47:155-184.
- Treinen M. N., *The Basic Science of poisons: Chapter 10. Toxic responses of the liver.* (Plaa L.G. editor) McGraw-Hill. 6a. 2001.pp. 471-490.
- Urra, C. A. Localización inmunohistoquímica de las isoformas V_{2a} y V_{2b} del receptor V₂ de vasopresina en riñón de rata. Tesis de Grado, Escuela de Ciencias, Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile, 2003.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Vargas B. K.J. Expresión de isoformas del receptor V_2 de vasopresina en sistema nervioso central. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile, 2004.
 - Waynforth H.B and Flecknell P.A. Experimental and surgical technique in the rat. 2nd edition. Academic Press. New York, 1992. p: 382
 - Woolf T.F. Handbook of Drug Metabolism. Marcel Dekker. New York. 1999. Pags: 595.
 - Yamaguchi Y., Yamada K., Suzuki T., Wu Y. P., Kita K, Takahashi S., Ichinose M. and Suzuki N. Induction of uPA release in human peripheral blood lymphocytes by [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]-vasopressin (dDAVP). American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism, 2004. 287:E970-E976.
 - Young B. and Heath J. Functional Histology. 4th edition. Churchill Livingstone. New York 2000. Pages: 413.
- 