



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CELULARIDAD CEREBELAR EN RATONES MACHOS CF-1 EN
PRESENCIA DE CIPERMETRINA: KI-67 Y APAF-1.**

Cristian Enrique Donoso Molina

Memoria para optar al Título Profesional de Médico
Veterinario

Departamento de Ciencias Clínicas.

PROFESOR GUÍA: DR. HÉCTOR RODRÍGUEZ BUSTOS. MV. MSC. DBM. PHD.

DIPLOM. (2)

Profesor Asociado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

SANTIAGO – CHILE

2013

FINANCIAMIENTO PARCIAL: FONDECYT 1101046– 2010-2012



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CELULARIDAD CEREBELAR EN RATONES MACHOS CF-1 EN
PRESENCIA DE CIPERMETRINA: KI-67 Y APAF-1.**

Cristian Enrique Donoso Molina

Memoria para optar al Título Profesional de Médico
Veterinario

Departamento de Ciencias Clínicas.

NOTA FINAL.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : DR. HECTOR RODRIGUEZ B.
PROFESOR CONSEJERO: DRA. DANIELA IRAGUEN C.
PROFESOR CONSEJERO: DR. FRANCISCO CARVALLO CH.

SANTIAGO – CHILE
2013

AGRADECIMIENTOS

El mayor de mis agradecimientos es para Dios, quien me da la fuerza y la posibilidad de cumplir cada uno de mis anhelos en la vida. Además, puso a mi lado a mis abuelos –padres Enrique y Carmen, hermosas e increíbles personas a quienes debo gran parte de mi vida, los valores y la persona que soy hoy en día.

Mi madre Edith, tu simplemente eres mi calma, amiga, compañera y mi todo. Eres la persona que siempre creyó en mí y a quien le voy a agradecer cada instante de mi vida, madre, eres lo más importante de mi vida y te adoro por estar siempre conmigo, en todo momento.

Mi padre Raúl y mi tío Roberto, siempre mostrando su preocupación por mí, y a sus maneras, tendiendo la mano necesaria para sacar adelante la carrera. Paulina, mi polola y a quien agradezco la oportunidad de poder compartir y vivir muchas cosas en mi vida, crecimos juntos y no dudo que su presencia me ayudo a tomar la decisión de estudiar esta hermosa carrera.

Al Doctor Héctor Rodríguez Bustos de la Facultad de Medicina, muchas gracias por abrirme las puertas de su laboratorio sin dudarlo, prestarme todo el apoyo y la guía necesaria para desarrollarme no solo como estudiante, también como persona pues en el encontré no sólo mi profesor guía, en el encontré un gran amigo al cual le estaré siempre muy agradecido. Don Juan Borja, una gran persona, muy gentil en todo momento y su disposición para trabajar fue siempre la mas óptima, desarrollar la parte experimental del trabajo con usted fue un honor para mí don Juan.

Al doctor, colega y amigo Germán Venegas, trabajar en equipo contigo me permitió ir conociendo y aclarando muchas dudas durante el transcurso de este tiempo no sólo de la memoria, también de la futura vida profesional y eso te lo agradezco mucho, sé que en un futuro podré contar con un gran profesional como tú.

A todos y cada uno de mis amigos, en especial a la prima Pamela Lara, gracias por estar presente en mi vida amiga y Karen Mena, ya estamos cumpliendo nuestros sueños amiga, a las dos las quiero mucho.

Termina un proceso y comienza otro, ahora simplemente a disfrutar el mejor de todos, el ser un Médico Veterinario.

RESUMEN

La cipermetrina es un insecticida de la familia de los piretroides muy utilizado en agricultura por su capacidad letal. Sin embargo, su uso inadecuado puede provocar intoxicaciones en humanos y animales con importantes daños neurológicos. El objetivo de este trabajo es conocer los efectos de una dosis subletal única intraperitoneal de cipermetrina sobre la histología de cerebelo en ratones CF-1, utilizando inmunohistoquímica para cuantificar proliferación (ki-67) y apoptosis celulares (Apaf-1), y hematoxilina-eosina para analizar la morfología tisular. Se utilizaron 33 ratones distribuidos en tres grupos: control (n= 3), control vehículo (n= 15) y experimental con cipermetrina (n= 15), sacrificándose 3 animales por grupo los días 1- 8,6- 17,2- 25,8 y 34,4. El análisis estadístico se hizo con Mann Withney Test. Los resultados indicaron que en los días 17,2 y 25,8 ocurre una disminución del número de células de Purkinje estadísticamente significativa, y aparentemente no relacionada con los procesos de apoptosis y proliferación celulares.

PALABRAS CLAVE: Cipermetrina; neurotoxicidad; cerebelo; proliferación; apoptosis.

ABSTRACT

Cypermethrin is an insecticide of the pyrethroid family widely used in agriculture because of its lethality. However, when used incorrectly it can cause poisoning in humans and animals with significant neurological damage. The aim of this study is to determine the effects of a single intraperitoneal sublethal dose of cypermethrin on the cerebellum histology using CF-1 mice. This will be accomplished using immunohistochemically quantifying proliferation (Ki-67) and apoptosis (Apaf-1), together with, haematoxylin-eosin histological sections to see cellular architecture. Were used 33 mice divided into three groups: control (n = 3), control vehicle (n = 15) and experimental cypermethrin (n = 15), sacrificing 3 animals for group on days 1, 8.6, 17.2, 25.8 and 34.4. Statistical analysis was done with Mann Whitney Test. The results showed that 17.2 and 25.8 days occurs a

decrease in the number of Purkinje cells statistically significant, and seemingly unrelated with processes of apoptosis and cell proliferation.

KEY WORDS: Cypermethrin, neurotoxicity; cerebellum; proliferation; apoptosis.

INTRODUCCIÓN

Chile cuenta con una industria agrícola sólida y de alta tecnología que ha logrado afianzarse como una de las áreas comerciales más grandes del país, entregando una gran variedad de productos y oportunidades de trabajo para muchos trabajadores. En el área agrícola, muchos temporeros se encuentran expuestos al contacto directo con productos químicos que se utilizan para la protección de los cultivos contra las distintas plagas. La Cipermetrina es uno de los más utilizados en la actualidad y resulta ser un riesgo permanente si no se controla su manipulación, debido por a la capacidad que tiene de provocar neurodegeneración y producir cuadros neurológicos más complejos (Jiménez *et al.*, 2008).

El sistema nervioso de los mamíferos tiene características únicas que lo hacen más susceptible a padecer daños, como el cerebelo. Por lo tanto la regulación de la celularidad a través de la proliferación y la muerte celular presenta una especial significancia. Algunas de estas características son 1) El tejido nervioso es altamente sensible a hipoxias e isquemias, 2) Las neuronas son excitables y la actividad neural es imperiosa para la sobrevivencia y la función nerviosa, 3) La muerte neuronal, con rara excepción, no es reemplazada en tejidos nerviosos maduros, por lo que la activación de un programa de muerte celular tiene mayor significancia y permanente impacto sobre la función del sistema nervioso (Akhtar *et al.*, 2004).

Los Piretroides, grupo al cual pertenece la cipermetrina, son insecticidas sintéticos obtenidos a partir del componente natural piretrina, que se encuentra en las flores del piretro o pelitre (Luty *et al.*, 2000) y que presenta el inconveniente importante de ser inestable a la luz y al aire, esto impide que permanezca en el ambiente y se degrada rápidamente (Soderlund *et al.*, 2002), limitando su eficacia en la protección de los cultivos. Ante la necesidad de aprovechar las propiedades insecticidas de las piretrinas se desarrollaron los piretroides sintéticos, que son moléculas lipofílicas de rápida absorción y de una estructura similar a las piretrinas, pero con mayor rendimiento insecticida. Lo anterior se debe principalmente a una mayor estabilidad ambiental, alta bioeficacia y una toxicidad comparativamente menor para los mamíferos (Aldana *et al.*, 2001), lo que permite una disminución en las frecuencias de aplicación.

Basándose en diferencias estructurales y de comportamiento neurofisiológico-toxicológico los insecticidas piretroides se subdividen en dos tipos:

Piretroides Tipo 1: Estructuralmente carecen del grupo α -cyano, principalmente pueden producir un síndrome de tremor (también llamado Síndrome T). Pertenecen a este tipo la Permetrina.

Piretroides Tipo 2: Estructuralmente presentan el grupo α -cyano, producen un síndrome más complejo que incluye convulsiones clónicas y coreoatetosis con salivación, llamado Síndrome de CS. A este segundo grupo pertenece la Cipermetrina. La presencia del grupo α -cyano se asocia con una mayor toxicidad y con una mayor potencia insecticida (Kocaman, 2010).

El mecanismo de acción insecticida se basa en modificar la permeabilidad iónica de la membrana del axón lo que provoca una neuroexcitación. Esto se debe a los cambios de voltaje dependientes de los canales de sodio, ya que estos últimos se mantienen abiertos por un intervalo de tiempo más prolongado, despolarizando la membrana y produciendo potenciales de acción más frecuentes y por un mayor tiempo (Narahashi, 1996).

La clínica de la intoxicación en animales superiores es variada y principalmente neurológica. Causan desde modificaciones en la temperatura, hiperexcitación, ataxia y convulsiones leves hasta salivación profusa, incoordinación motora y coreoatetosis (Narahashi, 1996).

Cipermetrina

La Cipermetrina, [(RS) α -ciano-3-fenoxibenzil (1RS)- *cis-trans*-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimethylciclopropanocarboxilo], es un piretroide sintético foto estable con gran potencia insecticida y un amplio espectro de acción. Las vías de ingreso de la cipermetrina al organismo pueden ser: 1) dérmica, 2) oral, la que permite que sólo un 2% de lo ingerido sea hidrolizado localmente en el intestino; 3) conjuntival, y 4) respiratoria, la que permite una tasa alta de absorción de la droga. Esta molécula altamente lipofílica es de rápida absorción y distribución en el organismo luego de la exposición. Desde el tejido nervioso su cinética de eliminación es de un 78% a las 24 horas, el 12% al octavo día y el 10% restante entre los

18 y 24 días (Jiménez *et al.*, 2008). Es eliminada en su mayor parte por vía renal, y el resto por las heces.

Una de las principales razones de su uso es la persistencia en el medio ambiente, siendo capaz de encontrarse en el aire, murallas y muebles por cerca de tres meses después de las aplicaciones. Esto es beneficioso para la agricultura y económicamente más rentable ya que disminuye el número de re-dosificaciones en el control de las plagas.

Otro aspecto importante es su mayor letalidad sobre insectos. Esta capacidad se asocia a la menor temperatura de los invertebrados, lo que potencia el efecto insecticida permitiendo por ejemplo su uso en condiciones de laboratorio como repelente de abejas. En Medicina Veterinaria el uso de la cipermetrina incluye principalmente el control de ectoparásitos en distintas especies, tales como: animales de compañía, bovinos, ovinos, aves y jaulas de cultivo de salmones.

A nivel neurológico la administración de cipermetrina oral es capaz de causar ligeros cambios histopatológicos en el cerebro por provocar un gran aumento en las concentraciones intracelulares de calcio, este aumento es capaz de ocasionar la muerte celular por vía apoptótica alterando la morfología y arquitectura del tejido, lo que lleva finalmente a la neurodegeneración (Jiménez *et al.*, 2008).

Marcadores celulares de Apoptosis y Proliferación

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que presenta una serie de cambios en cadena, con disminución del tamaño celular, condensación nuclear y fragmentación de ADN. Es posible cuantificar las células en apoptosis a través de la marcación inmunohistoquímica con el anticuerpo anti Apaf-1, el cual es un marcador celular que se expresa en células que están sufriendo este proceso.

En las células eucariontes existen dos vías apoptóticas, la vía extrínseca y la vía intrínseca. La vía intrínseca se activa por señales de estrés celular como un daño en el ADN (Shi, 2006). A esta vía pertenece la proteína adaptadora Apaf-1, constituyendo el elemento central de la vía intrínseca y la proteína antígeno que permite el uso de la

inmunohistoquímica y medición de la apoptosis a través del anticuerpo monoclonal específico Apaf-1.

Apaf-1 (factor activador de apoptosis) es una proteína que se encuentra en estado de latencia en el citosol hasta su activación, la que se produce por la unión con el citocromo c proveniente de la mitocondria. El complejo resultante Apaf-1/citocromo c denominado apoptosoma en presencia de dATP o ATP se asocia con la procaspasa 9 activando así la caspasa 9 (Shi, 2006). Finalmente habrá una cascada de activación de caspasas que culminan con la activación de la caspasa 3, ejecutoras finales del proceso apoptótico (Benites *et al.*, 2008).

La proteína Ki-67, tradicionalmente es utilizada para el reconocimiento de células en proliferación en ensayos inmunohistoquímicos. El anticuerpo anti Ki-67 es una proteína de 395 kDa (en la especie humana) capaz de reconocer un marcador celular nuclear presente en todas las fases del ciclo celular (G_1 , S, G_2 y mitosis) de células en proliferación. Sin embargo, este receptor no se expresa en las células en reposo (G_0) (Gerdes *et al.*, 1983), lo que permite que sea utilizado como un marcador estandarizado de proliferación celular de importancia diagnóstica y pronóstica (Verheijen *et al.*, 1989).

El cerebelo, en este sentido, es un órgano útil para estudiar la muerte celular dado que: 1) el cerebelo es particularmente vulnerable a injurias tanto de desarrollo como ambientales debido al largo proceso de desarrollo implicado (cerca de 6 meses en ratas); y 2) Mutaciones y lesiones cerebelares puntuales no tienden a ser letales, por lo que pueden ser usados como un modelo a examinar en adultos (Trouillas *et al.*, 1997).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos del insecticida piretroide Cipermetrina sobre la histología del tejido cerebelar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Observar y analizar los cambios en la estructura histológica del tejido cerebelar expuestos a cipermetrina.
2. Observar, analizar y medir los cambios celulares en apoptosis y proliferación del tejido cerebelar expuestos a cipermetrina.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo experimental se realizó en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se utilizaron 33 ratones machos cepa CF1 de 2,5 a 3 meses de edad, con 28-40 gr. de peso, mantenidos bajo condiciones estándares de bioterio con alimentación y agua *ad libitum*, con ciclo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad en el Bioterio de la Universidad de Chile. Todo el manejo fue según las normas de Manejo de Animales de Experimentación. A los animales se les administró Cipermetrina con pureza del 92,5 % p/p de ANASAC, diluida en aceite vegetal de girasol como vehículo (Superior®).

Los animales se distribuyeron en tres grupos: Control 1 (A); con un n=3, a los que no se les administró ninguna sustancia, Control 2 (B); con un n= 15, inoculados con 0,1 ml de aceite vegetal vía intraperitoneal, y el grupo Experimental (C), con un n= 15, inoculados con 1/5 de la dosis letal 50 ($LD_{50}= 485$ mg/kg) de cipermetrina vehiculizado en 0,1 ml de aceite vegetal vía intraperitoneal. Los animales fueron sacrificados mediante la inoculación de Tiopental sódico de 65 mg/ml en dosis de 50 mg/kg vía intraperitoneal. Luego, se obtuvieron los tejidos de interés: el cerebelo. Se recolectaron los cerebelos en cada grupo según los tiempos planificados: en el grupo A se realizaron a las 24 horas; y en los grupos B y C, el orden de obtención de las muestras fue de tres animales por grupo a los días 1-8,6- 17,2- 25,8 y 34,4 días.

Los cerebelos fueron fijados en Formalina al 10%, tamponada a un pH 7,2, por un periodo mínimo de 48 horas. Posteriormente se sometieron a técnicas histológicas estándares con deshidratación, inclusión en parafina y montaje de secciones de 5 μ m en portaobjetos silanizados. Posteriormente se procedió a las tinciones de Hematoxilina - Eosina, para determinar la cantidad de células de Purkinje por unidad lineal (morfología); e inmunohistoquímica específica para el reconocimiento de células que están en el proceso de apoptosis celular a través del apoptosoma Apaf-1 (anticuerpo antiApaf-1, LABVISION, Cat. #RB-9263-R7), y reconocimiento de la proteína Ki-67 (anticuerpo antiKi-67, clon SP 6, LABVISION, Cat. #RM-9106-R7); Ambas reacciones reveladas a través de HRP/DAB (Kit Refe.: BSB 0003 (Bio SB. CA. USA).

La reacción en las células positivas se cuantificó a través de un índice obtenido entre las células de Purkinje positivas (células de color marrón) y las células de Purkinje totales. Tanto el control positivo como el control negativo de las inmunohistoquímicas se compararon con secciones de colon otorgados por la empresa LABVISION.

De cada animal se evaluó tres secciones histológicas, y en cada lámina se hizo un mínimo de 25 mediciones al azar (linealmente).

Los datos se analizaron en hojas de trabajo Excel (Microsoft). La observación de las placas se realizó en un microscopio Olympus CX31 con Cámara Fotográfica Digital incorporada (Olympus U-TV0.5x-3, Tokyo, Japón) a un aumento de 100x y el Software Cuantitativo Morfológico Micrometrics Premium SE, 2011. Para evaluar las diferencias existentes entre el grupo control y el grupo experimental, los datos estadísticos se procesaron en el programa Origin 8.0. Los test de diferencias de variables no pareadas fueron Mann Withney Test (para variables de distribución no normal), siempre considerando un $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

A) Histología

En la corteza cerebelar se pueden identificar tres capas con distintos tipos celulares, desde la superficie hacia la sustancia blanca interna se encuentran 1) Capa Molecular: es la capa más superficial y de densidad celular más baja, 2) Capa de células de Purkinje: Monocapa formada por células de Purkinje caracterizadas por tener un soma grande, 40 – 80 μm de diámetro, y 3) Capa Granular: Presenta un elevado número de células granulosas pequeñas (Snell, 2007).

A.1) Histología cerebelar de ratón CF-1 con Hematoxilina- Eosina.

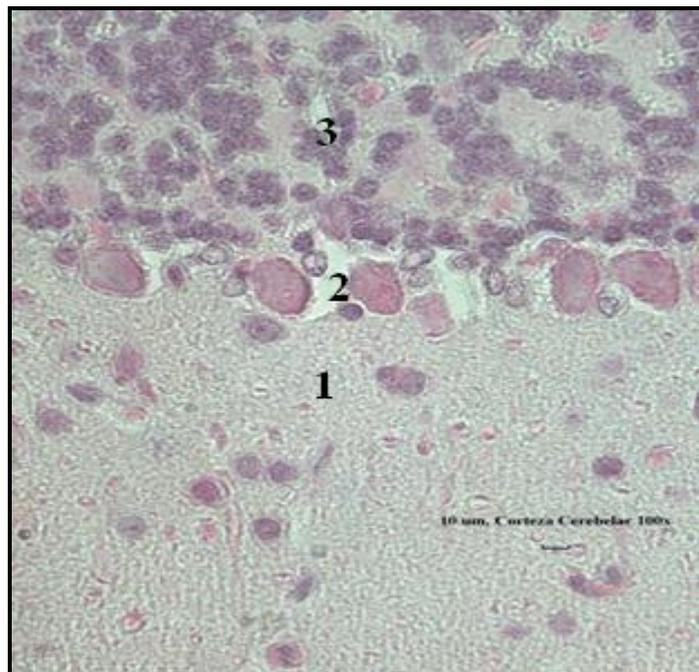


Ilustración Nro. 1

Figura Nro. 1: Cerebelo de ratón con tinción H-E de grupo control A (fig.1) 100x.

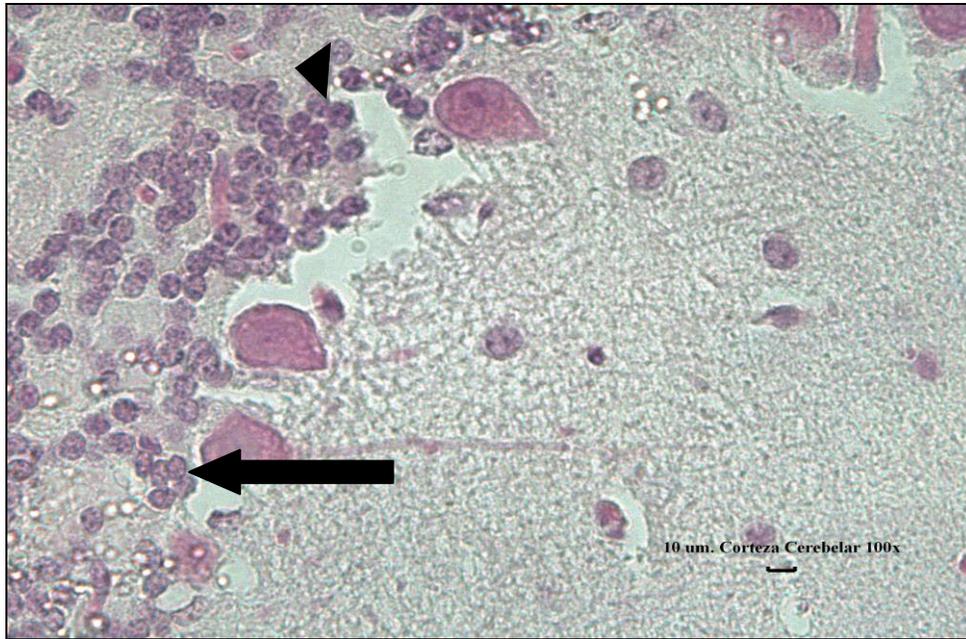


Figura Nro. 2: Cerebelo de ratón con tinción H-E del grupo experimental (animal C8) (100x).

Con la técnica de H-E: La Hematoxilina permite destacar la tinción de estructuras basófilas de color azul (núcleos celulares) (flecha); mientras que la Eosina, de naturaleza aniónica, tiñe de color rosa estructuras acidófilas en citoplasma (punta de flecha).

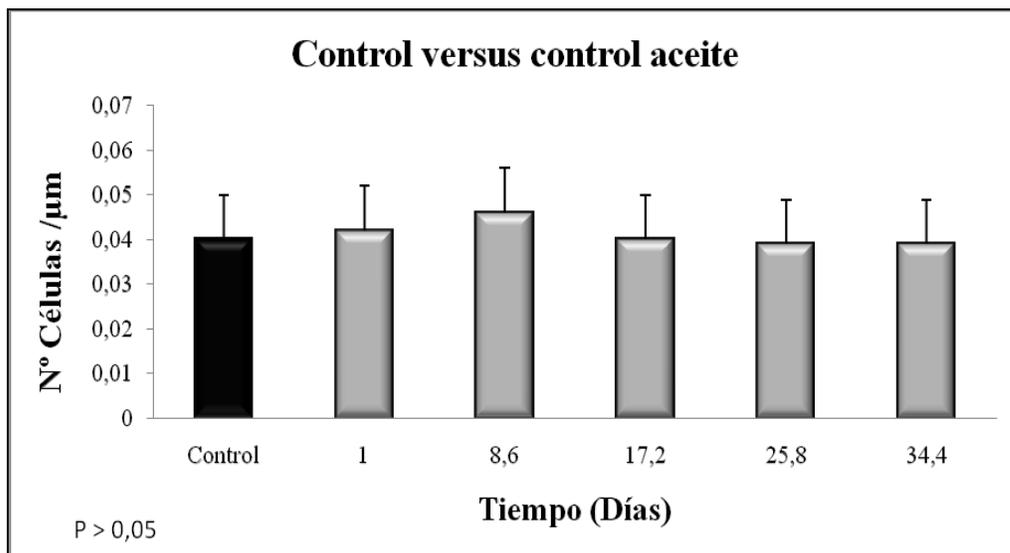


Gráfico Nro. 1: Número de Células de Purkinje por unidad lineal del grupo Control y Control Aceite a los diferentes intervalos de tiempo.

El gráfico número 1, es construido con los promedios y las desviaciones estándares de la cuantificación de la cantidad de células de Purkinje por unidad lineal entre los grupos control y control aceite. En él se observa que los promedios son similares en todos los tiempos evaluados sin existir diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

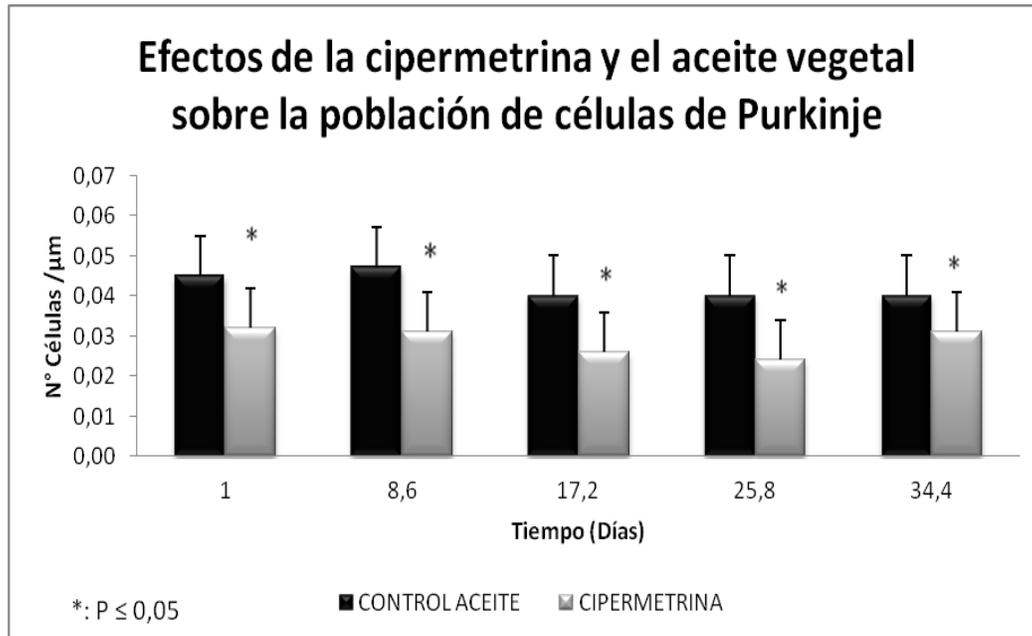


Gráfico Nro. 2: Número de Células de Purkinje por unidad lineal (μm) de los grupos control aceite y experimental, a los diferentes intervalos de tiempo.

Al comparar los promedios entre los grupos control aceite y experimental se observó que el número de células de Purkinje por unidad lineal (μm) se reduce significativamente en presencia de la cipermetrina ($p \leq 0,05$). Esta disminución es más intensa a los días 17 y 25 post intoxicación experimental.

B) Inmunohistoquímica

B.1.- Apaf-1: Apoptosis Celular.

A través de la inmunohistoquímica específica para la identificación de células en apoptosis (Apaf-1) se observó y cuantificó la presencia de células de Purkinje positivas.

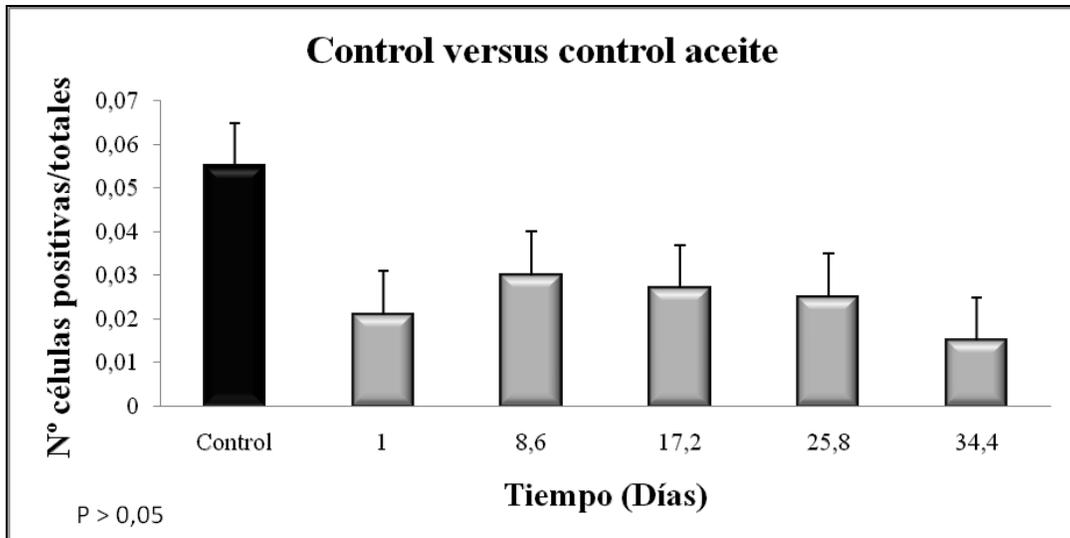


Gráfico Nro. 3: Se muestra el número (índice) de células de Purkinje positivas a Apaf-1 entre los grupos control y el grupo control aceite, a los diferentes intervalos de tiempo analizados ($p > 0,05$).

El gráfico de barras número 3 muestra un índice variable de células de Purkinje en apoptosis entre grupos y a cada uno de los tiempo evaluados, con diferencias no significativas ($p > 0,05$).

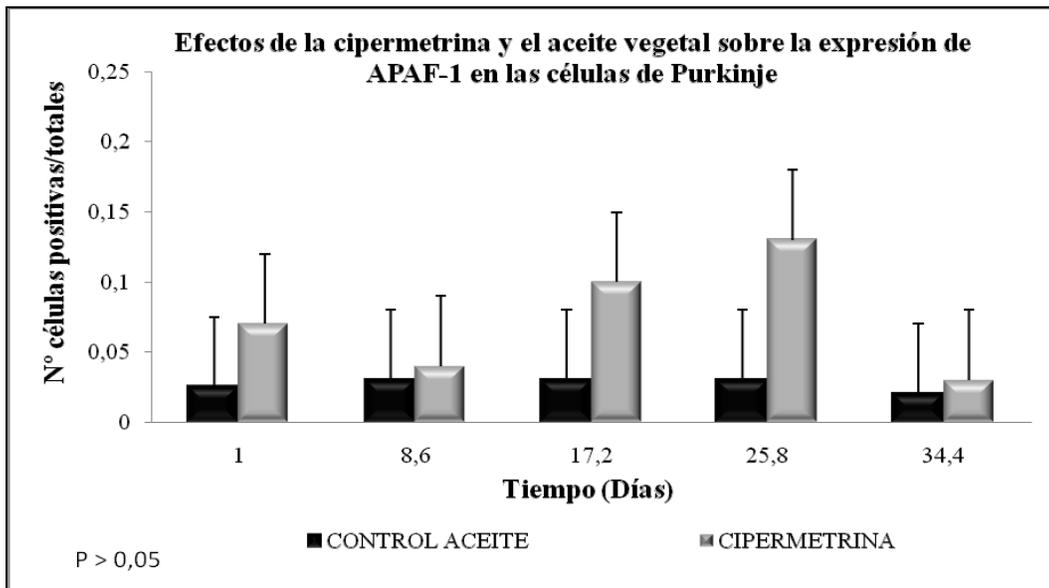


Gráfico Nro. 4: Se muestra el número (índice) de células de Purkinje positivas a Apaf-1 entre los grupos control aceite y experimental a los diferentes intervalos de tiempo analizados.

El gráfico número 4, muestra la comparación del índice de células de Purkinje positivas a Apaf-1 entre los grupos control aceite y experimental. Se observa una diferencia amplia y a diferentes intervalos de tiempo, con aumentos mayores a los días 17 y 25. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$). En el gráfico se destaca una desviación estándar grande.

B.2.- Ki-67: Proliferación Celular.

Se evaluó la expresión de la proteína Ki-67 para determinar el número de células de Purkinje que son inducidas a ingresar al ciclo celular (fuera de G_0).

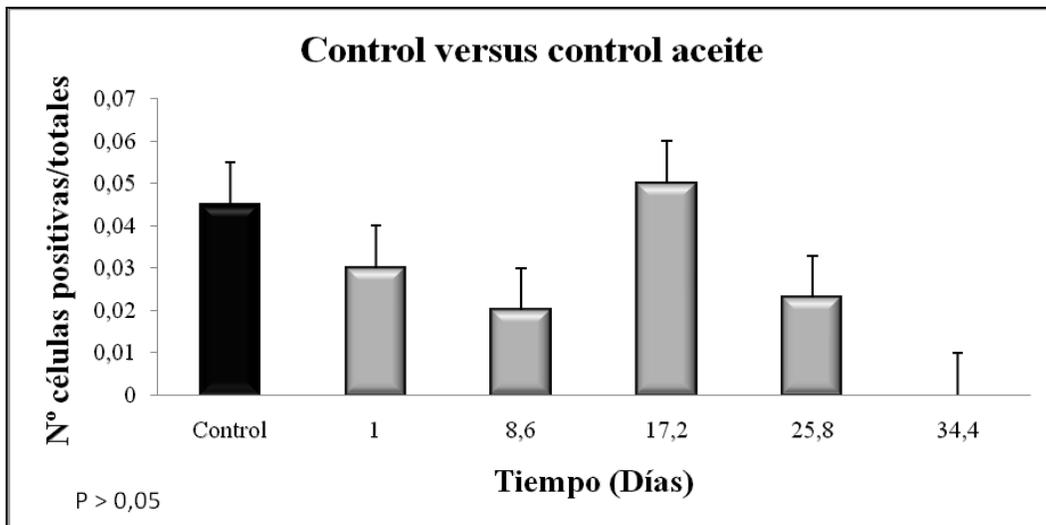


Gráfico Nro. 5: Se muestra el número (índice) de células de Purkinje positivas a Ki-67 entre los grupos Control y Control Aceite a los diferentes intervalos de tiempo analizados.

El gráfico de barras número 5 indica que el promedio del índice de células de Purkinje positivas a Ki-67 en los grupos control y control aceite son similares, aunque en los animales que recibieron el aceite la presencia de células Ki-67+ varió de modo cíclico en los tiempos considerados, siendo el intervalo de 17 donde se muestra el mayor aumento comparativo ($p > 0,05$).

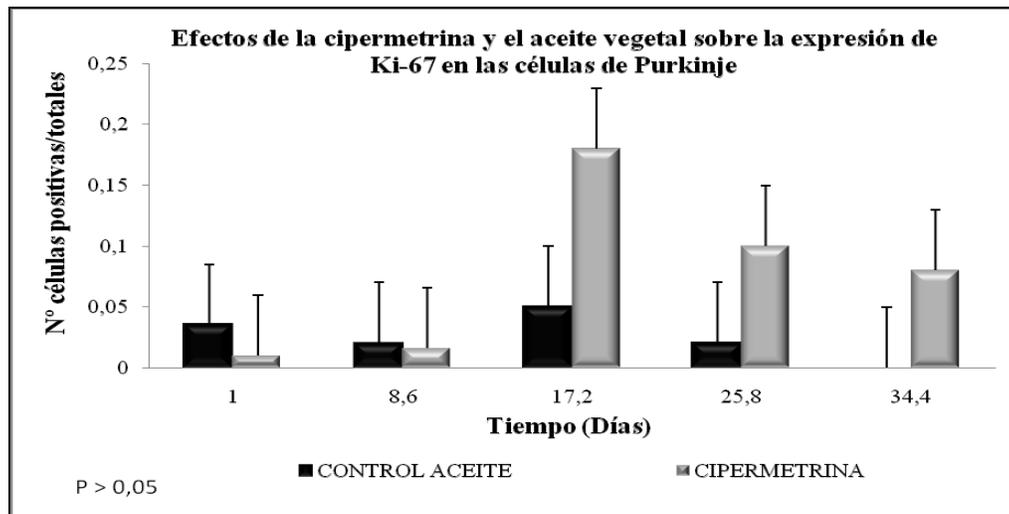


Gráfico Nro. 6: Se muestra el número (índice) de células de Purkinje positivas a Ki-67 entre los grupos control aceite y experimental a los diferentes intervalos de tiempo analizados.

El gráfico número 6 muestra la comparación del índice de células de Purkinje positivas a Ki-67 entre los grupos aceite y experimental. Se observa que de modo temprano la cipermetrina ejerce una acción inhibitoria sobre las células para el ingreso al ciclo celular. Sin embargo, a los intervalos 17 y 25 se observa un aumento sostenido del ingreso de células al ciclo celular. Aunque estas diferencias son estadísticamente no significativa, y de una desviación estándar amplia ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

Analizar la potencia de los piretroides y sus efectos adversos experimentales es complejo al considerar la diversidad de resultados publicados en la literatura especializada y de las diferentes condiciones experimentales. La neurotoxicidad inducida por los piretroides puede ser influenciada por una amplia variedad de factores biológicos y/o experimentales. El vehículo y ruta de exposición, junto con la dosis y edad, son sólo algunos de los factores más importantes (Husain *et al.*, 1996).

Los resultados morfológicos obtenidos por la inoculación del piretroide cipermetrina en forma intraperitoneal mostraron, a nivel cerebelar, una disminución estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) de la población de células de Purkinje en todas las edades evaluadas (Gráfico N°2), sin alteraciones morfológicas evidentes y con una mayor disminución numérica a los 25 días. Este hecho, la disminución importante en el número de células de Purkinje a los 25 días permite inferir un efecto crónico posterior a la injuria aguda producida por la cipermetrina.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Husain *et al.*, (1996), donde la exposición al piretroide deltametrina (piretroide tipo 2, igual que la cipermetrina) a nivel de células de Purkinje también provocó una disminución del número celular. De manera similar Abdel-Rahman (2001) demostró los efectos a nivel cerebelar del piretroide permetrina, describiendo una pérdida significativa de células de Purkinjes.

En el cerebelo las células de Purkinje son sensibles y vulnerables a la presencia de agentes neurotóxicos, y su respuesta generalmente se relaciona a una degeneración neuronal aguda por excesiva estimulación postsináptica de receptores ionotrópicos de glutamato (Sarna y Hawkes, 2003). Dentro de la familia de receptores de glutamato ionotrópicos están los receptores AMPA, los que participan en la mediación de la mayor parte de los daños excitotóxicos cerebelares (Brorson *et al.*, 1995) y más específicamente en las células de Purkinje, provocando cambios morfológicos evidentes (Garthwaite y Garthwaite, 1991).

Por otra parte, la inmunohistoquímica desarrollada para medir apoptosis celular a través de Apaf-1, y cuantificada a través de un índice de muerte celular cerebelar (células de Purkinje) mostró un aumento del número de células en apoptosis en todos los tiempos

evaluados, siendo mayor a los 25 días (ver gráfico N° 4). Este resultado si bien refuerza lo encontrado en el análisis histopatológico por conteo directo del número de células de Purkinje presentes en los cortes permitiendo correlacionar ambos resultados, no permite constatar empíricamente una relación con eventos apoptóticos. En el gráfico N° 4 se observa un aumento del número de células en apoptosis y se demuestra que esta característica es altamente variable y con una amplia desviación estándar, aún siendo las diferencias entre grupos y dentro de los mismos tiempos no significativas.

Adicionalmente no se detectaron cambios morfológicos celulares evidentes y cuantificables; por lo que la celularidad del este órgano frente a agentes estresores puede corresponder a fenómenos de plasticidad neuronal cerebelar donde las áreas dañadas reducen la actividad celular neuronal y sus ramificaciones.

Particularmente, en el tejido nervioso cada unidad celular potencialmente representa una conexión única, específica y de gran importancia funcional, donde la ausencia, o muerte celular quedaría sólo a expensas de la plasticidad neuronal en relación al cumplimiento de las funciones específicas.

Las neuronas pueden morir por un proceso patológico provocado por injurias o como un evento normal del desarrollo, donde cerca de la mitad de las neuronas generadas durante la neurogénesis mueren antes de la maduración completa del Sistema Nervioso Central (SNC). Esto se explica porque casi todos los tipos neuronales se producen en exceso durante el desarrollo (Lossi *et al.*, 2005).

Tradicionalmente, en las diversas áreas del SNC, incluyendo el cerebelo, se describen dos períodos de muerte celular como parte de los procesos normales del desarrollo temprano. El primero ocurre principalmente al comienzo de la neurogénesis y no se relaciona con la formación de las sinapsis; mientras que el segundo se relaciona con la conexión de las neuronas jóvenes post-mitóticas. En ambos períodos la muerte celular es apoptótica, por la vía mitocondrial, es decir, a través de Apaf-1 y también vía Bcl₂ (De la Rosa y De Pablo, 2000). Los componentes del SNC se desarrollan asincrónicamente, y en él las neuronas cerebelares experimentan los procesos de muerte celular por activación de la maquinaria de apoptosis en forma natural (NOND) hasta las primeras dos semanas posteriores al nacimiento en ratas (Tanaka y Marunouchi, 1998). Según Mooney y Miller (2000), con la

medición de caspasa 3 durante el desarrollo neurológico, determinaron que en el cerebelo existe una disminución de los niveles de caspasa 3 coincidente con el final del periodo NOND. Adicionalmente, esta información puede ser asociada a los resultados obtenidos y descritos en la presente investigación (gráficos N° 3 y 4), donde se muestra un aumento de la expresión de Apaf-1 en presencia de cipermetrina (componente de la vía intrínseca apoptótica cuyo efector final es la caspasa 3) en todos los tiempos analizados y cuantificados, siendo mayor a los tiempos de 17 y 25 días post inoculación experimental de cipermetrina.

Casco *et al.*, (2006) e Izaguirre *et al.*, (2001) describen que la cipermetrina induce la muerte celular apoptótica del SNC a través de cambios en los flujos de K^+ y Na^+ generados por el retardo en el cierre de los canales de Na^+ dependientes de voltaje. Esta neurointoxicación mediada por iones provoca un aumento de las concentraciones intracelulares de calcio, alterando la transmisión sináptica y llevando a las células de Purkinje a ser más vulnerables a la muerte (Welsh *et al.*, 2002).

En otros tejidos, como testículo de rata, también se han descrito inductores apoptóticos adicionales como óxido nítrico y especies oxígeno reactivas (El-Gohary *et al.*, 1999). Lo anterior es altamente relevante al considerar que la cipermetrina es una molécula inductora de la producción de especies reactivas del nitrógeno y de oxígeno, y por lo tanto capaz de alterar el funcionamiento de los receptores ionotrópicos de las membranas neuronales provocando anomalías morfológicas tipo condensación nuclear, vacuolización citoplasmática y disminución del tamaño somático (Barenberg *et al.*, 2001).

Por otro lado, la proteína Ki-67 está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G_1 , S, G_2 , y mitosis), pero ausente de las células en G_0 . Lo anterior hace que la proteína Ki-67 sea un marcador óptimo de la fracción de crecimiento en poblaciones celulares (Scholzen y Gerdes, 2000). Durante el desarrollo de la presente investigación se observó un aumento del número de células con expresión del antígeno Ki-67 a los días 17 y 25 post administración de la cipermetrina vía intraperitoneal, con un índice mayor que los grupos controles, pero con diferencias estadísticamente no significativas ($p > 0,05$) (ver gráficos N° 5 y 6). Rodríguez *et al.* (2009) describieron un efecto positivo de la cipermetrina sobre la proliferación celular medido a través de Ki-67 en glándulas seminales con un modelo

experimental similar al del presente estudio. Ellos concluyen que la cipermetrina ejerce un efecto significativo sobre la proliferación celular a tiempos tempranos de exposición (24 horas post inoculación), disminuyendo gradualmente según la cinética de eliminación del químico, cipermetrina, llegando a niveles normales con respecto al grupos control los días 17 y 25.

Según la cinética de eliminación principalmente renal y desde el tejido nervioso de la cipermetrina, un 78% se elimina antes de las 24 horas, el 12% antes del octavo día y el 10% restante entre los 18 y 24 días (Jiménez *et al.*, 2008). Por lo tanto, el aumento del índice proliferativo obtenido en este estudio no coincide con los niveles iniciales de cipermetrina en el tejido, sino que podría iniciarse más bien como una consecuencia a partir del momento de inoculación.

En el gráfico N° 6 se observa que el mayor índice proliferativo es paralelo al mayor índice apoptótico en los días 17 y 25, por lo que es probable que los resultados observados correspondan a un reflejo de la respuesta biológica de la fina homeostasis del balance entre proliferación y apoptosis celular, equilibrio necesario para mantener un correcto y adaptado funcionamiento tisular provocado por la cipermetrina (Alenzi, 2004). Frente a la disminución de la población de células de Purkinje y la interrupción de circuitos, se desencadena un proceso de proliferación celular con el objeto de reemplazar las células perdidas, sin embargo, la mayoría no entra en división celular propiamente tal, sino que puede retornar a un estado quiescente o transfiriéndose a la ruta de la muerte de la célula por vía apoptótica. En muchos tejidos la muerte celular provocada por elementos injuriantes como la cipermetrina produce una proliferación celular compensatoria de células vecinas (Ryoo *et al.*, 2004). Esto podría explicar el aumento del marcaje frente al antígeno Ki-67 sin un aumento efectivo de la población celular.

Basado en resultados descritos en *Drosopila*, Ryoo *et al.*, (2004) proponen un modelo donde células apoptóticas activan señales capaces de inducir la proliferación compensatoria. Esta proliferación no se produciría durante los eventos apoptóticos normales del desarrollo, sino que solamente en respuesta a injurias celulares en combinación con estrés.

CONCLUSIÓN

Con la administración de cipermetrina a 1/5 de la DL_{50} vía intraperitoneal en ratones machos adultos se concluye:

- 1) Existió una disminución permanente (durante el periodo experimental analizado) del número de células de Purkinje en el cerebelo.
- 2) Experimentalmente no es posible constatar la presencia de apoptosis ni tampoco de proliferación celular (bajo la influencia de la presencia de cipermetrina).

REFERENCIAS

- 1.- Abdel-Rahman A, Shetty AK, Abou-Donia MB. Subchronic dermal application of N,N-diethyl m-toluamide (DEET) and permethrin to adult rats, alone or in combination, causes diffuse neuronal cell death and cytoskeletal abnormalities in the cerebral cortex and the hippocampus, and Purkinje neuron loss in the cerebellum. *Experimental Neurology*. 2001; 172:153-171.
- 2.- Aldana L, Tsutsumi V, Craigmill A, Silveira MI, González de Mejía E. Alpha-Tocopherol modulates liver toxicity of the pyrethroid cypermethrin. *Toxicology Letters*. 2011; 125:107-116.
- 3.- Alenzi FQ. Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle. *British Journal of Biomedical Science*. 2004; 61:99-102.
- 4.- Barenberg P, Strahlendorf H, Strahlendorf J. Hypoxia induces an excitotoxic-type of dark cell degeneration in cerebellar Purkinje neurons. *Neuroscience Research*. 2001; 40:245-254.
- 5.- Benites BD, Fattori A, Hackel C, Lorand-Metze I, De Souza CA, Schulz E, *et al*. Low expression of apaf-1xl in acute myeloid leukemia may be associated with the failure of remission induction therapy. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008; 41:571-578.
- 6.- Brorson JR, Manzolillo PA, Gibbons SJ, Miller RJ. AMPA Receptor desensitization predicts the selective vulnerability of cerebellar Purkinje cells to excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience*. 1995; 15:4515-4524.

- 7.- Casco VH, Izaguirre MF, Marín L, Vergara MN, Lajmanovich RC, Peltzer P, *et al.* Apoptotic cell death in the central nervous system of *Bufo arenarum* tadpoles induced by cypermethrin. *Cell Biology and Toxicology*. 2006; 22:199-211.
- 8.- Cecconi F. Apaf1 and the apoptotic machinery. *Cell Death and Differentiation*. 1999; 6:1087-1098.
- 9.- De la Rosa EJ, De Pablo F. Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends in Neuroscience*. 2000; 23:454-458.
- 10.- El-Gohary M, Awara WM, Nassar S, Hawas S. Deltamethrin-induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor. *Toxicology*. 1999; 132:1-8.
- 11.- Garthwaite G, Garthwaite J. AMPA Neurotoxicity in Rat Cerebellar and Hippocampal Slices: Histological Evidence for Three Mechanisms. *The European Journal of Neuroscience*. 1991; 3:715-728.
- 12.- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer, Supplement*. 1983; 31:13-20.
- 13.- Husain R, Husain R, Adhami VM, Seth PK. Behavioral, neurochemical, and neuromorphological effects of deltamethrin in adult rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1996; 48:515-526.

14.- Izaguirre MF, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Soler AP, Casco VH. Cypermethrin-induced apoptosis in the telencephalon of *Physalaemus biligonigerus* tadpoles (Anura: Leptodactylidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2001; 65:501-507.

15.- Jiménez L, Quilodrán J, Miranda J, Rodríguez H. Efecto de dosis única intraperitoneal de cipermetrina en la corteza cerebral somatosensorial de ratones CF-1. *International Journal of Morphology*. 2008; 26:19-26.

16.- Kocaman AY, Topaktaş M. Genotoxic effects of particular mixture of acetamiprid and alpha-cypermethrin on chromosome aberration, sister chromatid exchange, and micronucleus formation in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental Toxicology*. 2010; 25:157-168.

17.- Lossi L, Cantile C, Tamagno I, Merighi A. Apoptosis in the mammalian CNS: Lessons from animal models. *Veterinary Journal*. 2005; 170:52-66.

18.- Luty S, Latuszynska J, Obuchowska-Przebirowska D, Tokarska M, Haratym-Maj A. Subacute toxicity of orally applied alpha-cypermethrin in Swiss mice. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2000; 7:33-41.

19.- Mooney SM, Miller MW. Expression of bcl-2, bax, and caspase-3 in the brain of the developing rat. *Brain Research Developmental Brain Research*. 2000; 123:103-117.

20.- Narahashi T. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology and Toxicology*. 1996; 79:1-14.

21.- Rodriguez H, Tamayo C, Inostroza J, Soto C, Bustos-Obregón E, Paniagua R. Cypermethrin effects on the adult mice seminal glands. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009; 72:658-662.

22.- Ryoo HD, Gorenc T, Steller H. Apoptotic Cells Can Induce Compensatory Cell Proliferation through the JNK and the Wntless Signaling Pathways. *Developmental Cell*. 2004; 7:491-501.

23.- Sarna JR, Hawkes R. Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Progress in Neurobiology*. 2003; 70:473-507.

24.- Shi Y. Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Current Opinion in Cell Biology*. 2006; 18:677-684.

25.- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*. 2000; 182:311-322.

26.- Snell RS. El cerebelo y sus conexiones. En: *Neuroanatomía Clínica*. Snell RS (ed.). Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina; 2006. pp. 225-246.

27.- Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, *et al.* Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*. 2002; 171:3-59.

28.- Tanaka M, Marunouchi T. Immunohistochemical analysis of developmental stage of external granular layer neurons which undergo apoptosis in postnatal rat cerebellum. *Neuroscience Letters*. 1998; 242:85-88.

29.- Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AL, Van Driel R, Brakenhoff GJ, *et al.* Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen I. Intracellular localization during interphase. *Journal of Cell Science.* 1989; 92:123-130.

30.- Welsh JP, Yuen G, Placantonakis DG, Vu TQ, Haiss F, O'Hearn E, *et al.* Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Advances in Neurology.* 2002; 89:331-359.