

**CARACTERIZACIÓN INMUNOTOXICOLÓGICA EN UN MODELO MURINO DE
NEUROTOXICIDAD ENCEFÁLICA INDUCIDA POR CLORPIRIFÓS**

SANDRA MABEL SÁNCHEZ SÁNCHEZ

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
IBAGUÉ
2012**

**CARACTERIZACIÓN INMUNOTOXICOLÓGICA EN UN MODELO MURINO DE
NEUROTOXICIDAD ENCEFÁLICA INDUCIDA POR CLORPIRIFÓS**

SANDRA MABEL SÁNCHEZ SÁNCHEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Biólogo**

**Director
ÁNGEL ENRIQUE CÉSPEDES RUBIO
PhD. en Ciencias Básicas Biomédicas**

**UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
IBAGUÉ
2012**

ADVERTENCIA


La Facultad de Ciencias de la Universidad del Tolima, el director del trabajo y el jurado calificador, no son responsables de los conceptos ni las ideas expuestas por el autor del presente trabajo.

Artículo 16, Acuerdo 032 de 1976 y Artículo 29, Acuerdo 064 de 1991, Consejo Académico de la Universidad del Tolima.

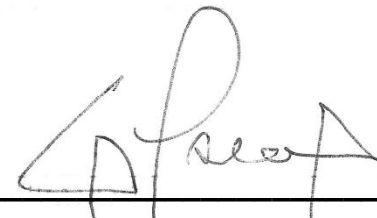
NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado “Caracterización inmunotoxicológica en un modelo murino de neurotoxicidad encefálica inducida por clorpirifós” presentado por la estudiante Sandra Mabel Sánchez Sánchez, para optar al título de Biólogo, fue revisado y calificado como:

5 (cinco)



Director
ÁNGEL ENRIQUE CÉSPEDES RUBIO
PhD. en Ciencias Básicas Biomédicas



Jurado
GERARDO ALBERTO ISEA FERNÁNDEZ
PhD. en Ciencias Veterinarias



Jurado
MARCO FIDEL ÁVILA RODRÍGUEZ
MSc. en Ciencias Biológicas

IBAGUÉ, NOVIEMBRE DE 2012

AGRADECIMIENTOS

Cada logro en la vida del ser humano entreteje una arquitectura compleja en la que muchas energías son partícipes. Todo hombre humilde sabe que se llega a la cima, tomado de la mano de muchos y la inspiración de otros tantos, pero sobre todo, cada logro en la vida se debe agradecer; por eso agradezco enormemente en primera instancia a Dios porque llevándome en sus manos, permitió que el plan perfecto que él tiene para mí se cumpliera en esta etapa de mi vida. “Todo tiene su tiempo”, el tiempo de Dios es diferente al de los hombres, pero claramente es perfecto.

Agradezco también la oportunidad que me da al poder compartir mis logros con personas tan especiales que ha puesto a mi alrededor: mi familia, el motor de mi vida, quienes me inculcaron responsabilidad y perseverancia y cuyas palabras de aliento siempre fueron puestas en el momento indicado; mis amigos y amigas del trabajo, universidad y laboratorio, por su eterna confianza, apoyo incondicional y motivación; a veces hasta sus silencios fueron prueba de su compañía. A mis profesores por su paciencia, comprensión y motivación, que no permitieron que desfalleciera en las altas y bajas que nos acompañan diariamente, ellos que ya en su nivel tienen la sabiduría para llevarnos seguros a la meta. Especialmente a Christian Ramírez, Angélica Sabogal, Adriana Gómez, Lina de los Reyes, Luisa Rojas, Ilang Rondón, Marcela Hernández y Carolina Buitrago, porque me ayudaron en alguna etapa del desarrollo y culminación de este trabajo, cada uno a su manera. Estas manifestaciones de firmeza siempre permanecerán en mi corazón y ojalá de alguna manera pueda retribuir el tiempo, esfuerzo y dedicación que me brindaron.

Al Dr. Ángel Céspedes, gracias, muchas gracias por compartirme sus conocimientos, y por la colaboración, paciencia y apoyo; no fue un camino fácil de recorrer y sé que muchas veces yo misma pude ser obstáculo, pero permaneció a mi lado, y ahora este también es su logro.

A la Universidad del Tolima, mi alma mater; al Comité Central de Investigaciones y Desarrollo Científico, por la financiación otorgada; a las Facultades de Ciencias y de Medicina Veterinaria y a los Grupos de Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas y Modelos Experimentales para las Ciencias Zoológicas por los recursos y el apoyo logístico suministrado durante la fase experimental.

No fue fácil para mí, puse todo mi esfuerzo, dedicación y empeño; supere mis propias limitaciones y viví mis propias peripecias. Gracias a todos quienes me rodearon de alguna u otra forma y permanecieron a mi lado. Gracias también a la vida que me enseñó de lo que soy capaz y que no existe nada que no se logre con perseverancia y disciplina.

RESUMEN

El uso indiscriminado de agroquímicos se ha relacionado con desórdenes neurocomportamentales que reflejan disfunción cognitiva y psicomotora, incluso tras exposición crónica a niveles bajos. Los plaguicidas organofosforados tipo oxón como el clorpirifós producen trastornos crónicos neurodegenerativos, como la neuropatía retardada y la leucoencefalopatía inducida por organofosforados, las cuales se caracterizan por disfunción motora, degeneración axonal y procesos de desmielinización. En el presente estudio se evaluaron los efectos tóxicos del clorpirifós sobre la población neuronal y la reactividad astrocitaria, microglial y de la proteína base mielina tras la exposición subcrónica (4 y 8 semanas) a dosis subletales bajas (114 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) en un modelo de neurotoxicidad encefálica inducida en ratas Wistar. Las dosis fueron administradas semanalmente por gavaje y 8 días después del último tratamiento se sacrificaron los animales y se obtuvieron cortes coronales encefálicos de 50 μm . Mediante técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica convencional se caracterizaron los cambios morfológicos de los astrocitos, la microglía y la proteína base mielina (MBP) en corteza, hipocampo (CA1), zona paraventricular, estriado y cápsula interna. De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró un incremento en la inmunorreactividad, densidad y población astrocitaria y microglial, con cambios morfológicos e hiperreactividad de MBP, formas aberrantes y distribución anómala de la proteína. En conclusión, el clorpirifós induce cambios morfológicos y de inmunorreactividad en astrocitos, microglía y mielina madura, compatibles con neurotoxicidad subcrónica. La evidencia experimental sugiere que los anticuerpos anti-GFAP, anti-OX42 y anti-MBP, pueden ser usados como biomarcadores de neurotoxicidad crónica causada por clorpirifós.

Palabras clave: Agroquímicos, Clorpirifós, neurotoxicidad, activación microglial, respuesta astrocitaria, desmielinización.

ABSTRACT

The indiscriminate use of agrochemicals has been associated with neurobehavioral disorders that reflect cognitive and psychomotor dysfunction, even after chronic exposure to low levels. Organophosphate pesticides such as chlorpyrifos oxon could produce chronic neurodegenerative disorders such as Delayed neuropathy induced by organophosphates which are characterized by motor dysfunction, axonal degeneration and demyelination processes. In this study, were evaluated the toxic effects of chlorpyrifos on the neuronal population, astrocytic reactivity, microglial reaction and myelin basic protein after subchronic exposure (4 and 8 weeks) at lower sublethal doses (114 mg / Kg and 228 mcg / kg) in a model of neurotoxicity induced in Wistar rat brain. Weekly doses of chlorpyrifos were administered by gavage and to 8 days after the last treatment the animals were sacrificed and coronal brain sections were obtained from 50 microns. By histochemical and immunohistochemical techniques conventional were characterized morphological changes of astrocytes, microglia and myelin basic protein (MBP) in cortex, hippocampus (CA1), paraventricular area, striatum and internal capsule. According to the obtained results was evident an increase in immunoreactivity and population density of astrocytes and microglial cells with morphological changes, Also hyperreactivity of MBP, aberrant forms and abnormal distribution of the protein. In conclusion, chlorpyrifos induces morphological changes and immunoreactivity in astrocytes, microglia and mature myelin compatible with subchronic neurotoxicity, whereby the anti-GFAP antibody, anti-MBP and anti-OX42, could serve as biomarkers of chronic neurotoxicity caused by this type of organophosphate.

Keywords: Agrochemicals, chlorpyrifos, neurotoxicity, microglial activation, astrocytic response, demyelination.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS	17
1.1. OBJETIVO GENERAL	17
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1. GENERALIDADES DE LOS PLAGUICIDAS	18
2.1.1. Clasificación.....	18
2.1.1.1. Según el tipo de organismo que se desea controlar	18
2.1.1.2. Según el grupo químico del principio activo.....	18
2.1.1.3. Según su persistencia en el medio ambiente.....	18
2.1.1.4. Según su toxicidad aguda (O.M.S.)	18
2.1.2. Epidemiología	19
2.1.3. Efectos secundarios de su aplicación	19
2.2. PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS	20
2.2.1. Mecanismo de acción de los organofosforados.....	21
2.3. ESTERASA BLANCO DE NEUROPATÍA (NTE)	22
2.4. MIELINA Y PROCESOS DE DESMIELINIZACIÓN	24
2.5. RESPUESTA CELULAR DEL SNC FRENTE AL TÓXICO.....	26

2.5.1. Células astrogliales.....	26
2.5.1.1. Respuesta de los astrocitos ante la injuria.....	27
2.5.2. Células microgliales	28
2.5.2.1. Respuesta de la microglía ante la injuria	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1. MANEJO Y CUIDADO DE LOS ANIMALES	31
3.2. AGENTE INDUCTOR	31
3.3. ENSAYO PRELIMINAR PARA ESTABLECIMIENTO DE LAS POSOLOGÍAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
3.4. INDUCCIÓN DE NEUROTOXICIDAD POR EXPOSICIÓN SUBCRÓNICA AL CPF.....	32
3.5. PERFUSIÓN, CRIOPRESERVACIÓN Y CORTES	32
3.6. TÉCNICA HISTOQUÍMICA.....	34
3.7. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.....	34
3.8. ZONAS DE ESTUDIO.....	35
3.9. REGISTRO FOTOGRÁFICO Y DENSITOMETRIA	35
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
4. RESULTADOS	38
4.1. ENSAYO PRELIMINAR PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LAS POSOLOGÍAS	38
4.2. INDUCCIÓN DE NEUROTOXICIDAD SUBCRÓNICA POR CPF.....	38
4.3. REACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS ASTROGLIALES POR EFECTO DEL CPF	39

4.4. CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LOS ASTROCITOS PROTOPLASMICOS EN ZONA CA1 DEL HIPOCAMPO POR EFECTO DEL CPF	42
4.5. CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LOS ASTROCITOS FIBROSOS EN LA ZPV POR EFECTO DEL CPF	45
4.6. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL CPF SOBRE LA POBLACIÓN NEURONAL EN ENCÉFALO.....	45
4.7. RESPUESTA DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES POR EFECTO DEL CPF	47
4.8. INMUNORREACTIVIDAD MICROGLIAL EN SUSTANCIA BLANCA ENCEFÁLICA LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A CPF	48
4.9. INMUNOREACTIVIDAD DE MBP EN ANIMALES TRATADOS CON CPF	50
5. DISCUSIÓN	55
5.1. EL CPF NO AFECTA LA GANANCIA DE PESO CORPORAL A DOSIS SUBLETALES Y EXPOSICIÓN SUBCRÓNICA	55
5.2. EL CPF A DOSIS SUBLETALES Y SUBCRÓNICAS NO AFECTA LA POBLACIÓN NEURONAL EN RATAS	55
5.3. EL CPF A DOSIS SUBLETALES Y SUBCRÓNICAS AFECTA LA ACTIVIDAD ASTROCITARIA ENCEFÁLICA EN RATAS	55
5.4. LA HIPERREACTIVIDAD MICROGLIAL DEPENDE DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN A CPF	57
5.5. LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR CPF EXACERBA LA INMUNORREACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA BASE MIELINA (MBP)	58
5.6. HIPÓTESIS DE LA DESMIELINIZACIÓN INDUCIDA POR EL CPF Y LA IMPLICACIÓN DE LA REACTIVIDAD CELULAR COMO MECANISMO DE REPARACIÓN DEL SNC.....	59
6. CONCLUSIONES	62

7. RECOMENDACIONES.....63

REFERENCIAS64

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

BHE: Barrera hematoencefálica

CI: Cápsula interna

CPF: Clorpirifós

GFAP: Proteína acídica fibrilar glial

LEIO: Leucoencefalopatía inducida por organofosforado.

MBP: Proteína Base Mielina

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NTE: Esterasa blanco de neuropatía.

OPIDN: Neuropatía retardada inducida por organofosforados.

OPs: Organofosforados

SIBF: Corteza somatosensorial en campos de Barrel

STR: Cuerpo estriado

ZPV: Zona paraventricular

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Estructura química general de los organofosforados y activación a tipo oxón.....	21
Figura 2. Mecanismo de la reacción general para producir OPIDN	23
Figura 3. Reacciones metabólicas de lipidos de membrana relacionadas con NTE	24
Figura 4. Procedimiento de perfusión intracardiaca	33
Figura 5. Zonas de estudio evaluadas en la neurotoxicidad inducida por CPF.....	36
Figura 6. Pesos corporales por tratamiento durante la inducción de neurotoxicidad subcrónica	
Figura 7. Hiperreactividad de las células astrogiales en ZPV e hipocampo CA1 por efecto del CPF	40
Figura 8. Inmunorreactividad de la proteína acídica fibrilar glial (GFAP) en ZPV e hipocampal CA1.....	41
Figura 9. Infiltración astrocitaria en zona CA1 y subgranular del giro dentado en el hipocampo	42
Figura 10. Cambios morfológicos de las células astrogiales en la zona hipocampal CA1 causados por CPF	44
Figura 11. Cambios morfológicos de los astrocitos fibrosos en la ZPV ocasionados por la administración de CPF.....	46
Figura 12. Densidad neuronal en tres segmentos encefálicos.....	47
Figura 13. Células microgliales activadas por la administración de CPF	48
Figura 14. Inmunorreactividad microglial como respuesta a la administración de CPF en sustancia blanca encefálica.....	49
Figura 15. Reactividad de las células microgliales producida por el CPF en dos segmentos encefálicos	49

Figura 16. Microglía activada en corteza somatosensorial	50
Figura 17. Microglia activada en diferentes áreas del hipocampo.....	51
Figura 18. Inmunorreactividad de la proteína base mielina (MBP) en diferentes cortes cerebrales de ratas tratadas con CPF a cuatro y ocho semanas.....	52
Figura 19. Reactividad de la proteína base de mielina (MBP) modulada por la administración de CPF en encéfalo	54
Figura 1. Hipótesis de la desmielinización inducida por CPF y la implicación de la reactividad celular como mecanismo de reparación del SNC	

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Diseño experimental para la inducción subcrónica del CPF	32
Tabla 2. Peso corporal en gramos (g) de ratas Wistar con neurotoxicidad inducida por CPF	38
Tabla 3. Longitud de los astrocitos protoplásmicos y fibrosos en zona hipocampal CA1 y ZPV tras la exposición a CPF	43

INTRODUCCIÓN

Actualmente se ha reportado que los compuestos químicos que se utilizan indiscriminadamente en el sector agropecuario, entre ellos los organofosforados, constituyen un riesgo potencial para la salud humana y pueden ser causa de trastornos neurológicos y psiquiátricos, siendo la población más vulnerable los trabajadores encargados de su manipulación y aplicación (Parrón, Requena, Hernández, & Alarcón, 2011a). Como ya es conocido, Colombia tiene una gran tradición en cultivos intensivos y las prácticas agropecuarias son una de las principales actividades económicas, que representan aproximadamente el 40% de la fuerza laboral (Bonilla, Peinado, Urdaneta, & Carrascal, 2000; Fernández, Mancipe, & Fernandez, 2010).

El clorpirifós (CPF) es un organofosforado utilizado como insecticida de amplio espectro en la agricultura y se ha demostrado que la exposición a dosis bajas por tiempo prolongado, puede producir síndromes subagudos o crónicos, como la neuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDIN) (Jokanović, Kosanović, Brkić, & Vukomanović, 2011) y la leucoencefalopatía inducida por organofosforados (LEIO); además, a niveles subletales altera la transmisión sináptica, inhibe la replicación celular neural, interfiere con cascadas de señalización involucradas en diferenciación celular (Saulsbury, Heyliger, Wang, & Johnson, 2009), aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Demir, Uzun, Durak, & Kalender, 2011) e inhibe la síntesis de ADN (Qiao, Seidler, & Slotkin, 2001), entre otras.

Si bien es cierto que los avances alcanzados en los últimos años en cuanto al estudio mecanístico de los organofosforados han sido positivos, la fisiopatología de estos procesos no está completamente definida (Ehrich & Jortner, 2002; Emerick, Deoliveira, Antonio, & Ehrich, 2012; Slotkin & Seidler, 2007). Por otra parte, la mayoría de los estudios de neurotoxicidad encefálica se han centrado en el efecto sobre las neuronas, dejando de lado otro tipo de poblaciones celulares especializadas como es el caso de las células gliales, que están involucradas en la activación inmune del sistema nervioso central (SNC) y tienen funciones claves en el curso de diferentes tipos de patologías (Griffiths, Gasque, & Neal, 2010); sobre la base de lo expuesto, se considero de importancia científica estudiar los cambios celulares de tipo morfológico y de la inmunorreactividad mediada por el clorpirifós a nivel astrocitario, microglial y de la proteína base mielina en un modelo de neurotoxicidad subcrónica inducida en ratas Wistar.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los cambios celulares morfológicos e inmunorreactivos inducidos por clorpirifós a nivel encefálico en un modelo de neurotoxicidad subcrónica inducida en ratas Wistar.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Valorar los cambios sobre la población neuronal a nivel cortical y subcortical por efecto del clorpirifós administrado vía enteral a dosis bajas durante 4 y 8 semanas en ratas Wistar, utilizando la tinción de Nissl con azul de toluidina

Evaluar la inmunorreactividad de los astrocitos y de la microglía como respuesta a la neurotoxicidad inducida por el clorpirifós mediante inmunohistoquímica convencional en cortes coronales encefálicos de rata Wistar.

Caracterizar los cambios astrocitarios y microgliales producto de la neurotoxicidad inducida por el clorpirifós, a través del análisis morfológico, morfométrico y densitométrico en cortes cerebrales de rata.

Determinar el tipo de inmunorreactividad de la proteína base mielina en diversos segmentos encefálicos como respuesta a la administración subcrónica de dosis subletales de clorpirifós, por medio de análisis densitométrico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES DE LOS PLAGUICIDAS

Los plaguicidas son sustancias o mezclas de otras sustancias de origen natural o sintético, que se emplean con el fin de prevenir, destruir o controlar cualquier plaga o especie indeseada de plantas o animales, incluyendo vectores de enfermedades humana o animal (Fernández et al., 2010).

La utilización de los plaguicidas se ha dado ampliamente en áreas de producción alimentaria, agrícola, ganadera, de alimento concentrado para animales y en la industria maderera y sus derivados (Philp, 2001). Aunque su empleo conlleva a un notable incremento en el rendimiento de la producción y contribuye al control de enfermedades como: la malaria, el tifus, el dengue y la fiebre amarilla, entre otras, su uso a gran escala presenta una serie de efectos secundarios tanto para la salud humana como para el medio ambiente (Bonilla et al., 2000).

2.1.1. Clasificación. De acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas los plaguicidas se clasifican (Asociación Colombiana de Neurología, 2001; Philp, 2001) :

2.1.1.1. Según el tipo de organismo que se desea controlar: Insecticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, molusquicidas, rodenticidas, avicidas.

2.1.1.2. Según el grupo químico del principio activo: Compuestos organofosforados, compuestos carbamatos, compuestos organoclorados, piretroides, derivados del bupiridilo, triazinas, tiocarbamatos, derivados del ácido fenoxiacético, derivados de la cumarina, derivados del cloronitrofenol, compuestos organomercuriales, entre otros.

2.1.1.3. Según su persistencia en el medio ambiente: Hace referencia al tiempo que permanece el plaguicida en el suelo manteniendo su actividad biológica, se clasifican en persistentes, poco persistentes, no persistentes.

2.1.1.4. Según su toxicidad aguda (O.M.S.): Esta se basa principalmente en la toxicidad por vía oral en ratas y ratones. Usualmente la dosis se registra como el valor DL50 (Dosis Letal Media) siendo la dosis requerida para causar la muerte al 50% de la población de animales de experimentación y se expresa en términos de mg/Kg del peso corporal del animal. Se clasifican como extremadamente tóxico (Ia), altamente tóxico (Ib), moderadamente tóxico (II), ligeramente tóxico (III) (Philp, 2001).

2.1.2. Epidemiología. Reportes de la organización mundial de salud (OMS) muestran que las intoxicaciones representan un problema significativo de salud pública mundial, principalmente entre quienes realizan labores agrícolas en países de bajos y medianos ingresos; sin embargo no existe un cálculo exacto de la magnitud del problema y solo se tienen como referencia algunas estimaciones por diversas entidades (Thundiyil, 2008). Se reportan aproximadamente tres millones de casos de intoxicaciones agudas con insecticidas, de las cuales un millón son accidentales y dos millones provocadas (suicidios u homicidios) y aproximadamente 370.000 de estos casos terminaron en muerte (WHO, 2012)

En América latina, Colombia es el tercer país, después de Brasil y México, en el consumo de plaguicidas. Según el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) la producción de plaguicidas para el año 2007 en nuestro país fue de 25.326.188 Kg y según el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural el consumo total de plaguicidas para el mismo año fue de 94.092 toneladas métricas/Km² (DANE, 2010), de los que aproximadamente el 97% corresponden a insecticidas (organofosforados y carbamatos), herbicidas y fungicidas (Hurtado C & Gutiérrez de Salazar, 2005). Esto debido al tradicional uso en cultivos intensivos y al gran porcentaje que representa la agricultura como actividad laboral en el país (Bonilla et al., 2000).

En Colombia se han reportado tres eventos masivos de intoxicación por organofosforados en las últimas décadas: En Chiquinquirá, en el año 1967, donde cerca de 500 personas se intoxicaron con metilparatión, de las cuales murieron 63 personas. En 1970 en Puerto López, cerca de 190 personas se intoxicaron con un organofosforado no determinado, causando la muerte a siete de ellas. y en Pasto en 1977, 300 personas resultaron intoxicadas con paratión, causando la muerte a 15 de ellas (Fernández et al., 2010)

2.1.3. Efectos secundarios de su aplicación. Los efectos tóxicos que causan los plaguicidas por su masiva e indiscriminada aplicación y su variada composición química pesan más que sus efectos benéficos (Asociación Colombiana de Neurología, 2001), dado que se estima que menos del 0.3% de los plaguicidas aplicados sobre una zona agrícola alcanzan el organismo blanco (insectos, ácaros, etc.) y más del 99% se dispersa en el medioambiente presentando un riesgo potencial para los ecosistemas vecinos, particularmente con aquellos plaguicidas de alta persistencia (Philp, 2001).

El uso generalizado de los pesticidas en diversas áreas puede llegar a producir efectos tales como: empobrecimiento de la biodiversidad, inhibición de otras especies predatoras naturales, que ayudan al control de otro tipo de plagas; contaminación de aguas tanto subterráneas como superficiales y amenaza para la salud humana, ya sea por exposición directa ó por medio de residuos en alimentos o en aguas potables (Arquimbau, 2001). Se ha demostrado que en humanos la exposición a ciertos plaguicidas durante largos periodos de tiempo, incluso a

niveles bajos causa intoxicaciones, mutaciones genéticas, desórdenes comportamentales y del sistema nervioso, además de efectos en el sistema endocrino e inmune (Miller, 2009).

Otra desventaja del frecuente uso de los plaguicidas, es que con el transcurrir del tiempo las plagas generan inmunidad, tolerancia o resistencia genética a una amplia gama de estos agentes químicos, por procesos de selección natural haciéndolos menos efectivos y llevando a la necesidad de crear plaguicidas con mayor potencia (Arquimbau, 2001).

2.2. PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

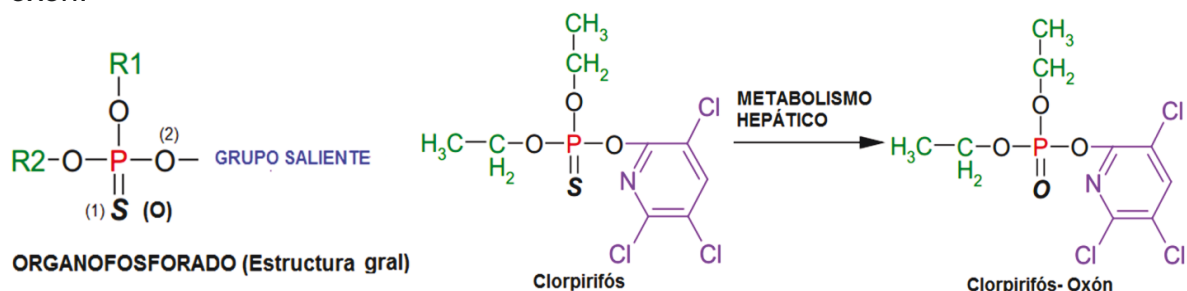
Los organofosforados (OPs) son sustancias orgánicas derivadas de la molécula del ácido fosfórico. Constituyen el grupo más numeroso de plaguicidas y son utilizados ampliamente a nivel mundial, como insecticidas, nematocidas, herbicidas, fungicidas, plastificantes, fluidos hidráulicos (en la industria), y en algunos países como armas químicas. Su uso se ha dado en gran medida para remplazar a los plaguicidas organoclorados persistentes en el medio (Milla & Palomino, 2002).

Estos compuestos OPs por sus propiedades químicas no persisten en el ambiente, son liposolubles y volátiles, características que facilitan su absorción por vía inhalatoria, dérmica, oral, conjuntival, parenteral y rectal (Hurtado C & Gutiérrez de Salazar, 2005). Se distribuyen rápidamente por vía sanguínea y atraviesan fácilmente las barreras biológicas, incluida la barrera hematoencefalica, penetrando en el Sistema Nervioso Central. Algunos productos pueden almacenarse en tejido graso lo que puede provocar toxicidad retardada debido a la liberación tardía (Milla & Palomino, 2002).

Los plaguicidas OPs se caracterizan por la presencia en su estructura química de un átomo de fósforo central con un doble enlace a un átomo de azufre u oxígeno, dos grupos R1 y R2 etilo o metilo, y un grupo saliente que es específico para el tipo de OP (Figura 1) (Rezg, Mornagui, El-Fazaa, & Gharbi, 2010).

Los OPs se dividen en 14 grupos, en los que se destacan: los fosfatos, con un oxígeno en las posiciones [1] y [2]; O-fosforotioatos (o tionatos), con un azufre en la posición [1] y un oxígeno en la [2], S-fosforotioatos (o-tiolatos), con un azufre en la posición [2] y un oxígeno en [1]; fosforoditioatos (o tiolotionatos), con un azufre en las posiciones [1] y [2]; fosfonatos, con R1 (en lugar de R1O), oxígeno ó bien azufre en [1] y oxígeno en [2], y fosforoamidatos, con un Oxígeno en [1] y un Nitrógeno en [2] (Rezg et al., 2010).

Figura 2. Estructura química general de los organofosforados y activación a tipo oxón.*



Fuente: Adaptado del (National Pesticide Information Center, s.f.)

*Reacciones químicas para la activación metabólica del clorpirifós

El clorpirifós (CPF) un fosforotioato empleado como insecticida de amplio espectro a nivel mundial en el sector agrícola, nombrado bajo la nomenclatura IUPAC como [0,0-dietil 0- (3, 5,6-tricloro-2- piridil fosforotioato)] y registrado con las marcas comerciales Lorsban® y Dursban® (Carod Benedico, 2002). Está clasificado como moderadamente tóxico; sin embargo, una vez en el interior del organismo se lleva a cabo una reacción química, llamada desulfuración oxidativa, en la cual ocurre una transformación en el doble enlace del átomo de fósforo central y el azufre es cambiado por oxígeno (P=S a P=O). Esta reacción metabólica se realiza en el hígado y produce la activación del OP a un tipo llamado oxon, un inhibidor más potente de las enzimas esterásicas (Figura 1) (Galloway & Handy, 2003).

2.2.1. Mecanismo de acción de los organofosforados. Los OPs causan sus efectos tóxicos a través de la fosforilación de enzimas con actividad esterásica, de las cuales la enzima más importante por su cantidad y actividad fisiológica es la acetilcolinesterasa AChE (colinesterasa eritrocítica), y la colinesterasa plasmática (butirilcolinesterasa), responsables de la hidrólisis de la acetilcolina (Ach) (Hurtado C & Gutiérrez de Salazar, 2005). Su inhibición produce la acumulación de este neurotransmisor (imprescindible para el control normal de la transmisión de los impulsos nerviosos) en la hendidura sináptica de las terminaciones nerviosas, con la consecuente sobre-estimulación de órganos efectores, lo cual desencadena síntomas de toxicidad aguda conocidos como síndrome colinérgico (Jokanović et al., 2011).

El síndrome colinérgico aparece entre pocos minutos hasta doce horas posterior al contacto con el tóxico. Se manifiesta con efectos muscarínicos (uniones colinérgicas neuroefectoras), nicotínicos (uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos) y en el sistema nervioso central (Roldán-Tapia & Sánchez-Santed, 2004), caracterizados por debilidad muscular, excesiva actividad secretora, cambios en el estado de conciencia, alteraciones sensoriales y del comportamiento, incoordinación, depresión de la función motora y depresión respiratoria (Kosanovi, 2010). El aumento en las secreciones pulmonares y la

depresión respiratoria son las causas usuales de muerte en el envenenamiento agudo por OPs (Fernández et al., 2010).

Luego de los efectos agudos, es decir de 24 a 48 horas después de la exposición al OP, en algunos casos se puede presentar un síndrome conocido como síndrome intermedio caracterizado por la inhibición prolongada de la AChE. Se manifiesta por debilidad de los músculos proximales de las extremidades, flexores del cuello, lengua, faringe y músculos respiratorios, con compromiso de la función respiratoria, disminución o ausencia de los reflejos miotendinosos y compromiso de pares craneales (principalmente el sexto nervio abducens) (Kosanovi, 2010). Presenta una incidencia del 57,1% y en Colombia se ha observado que los agentes más asociados a la aparición de este síndrome son el fentión, dimetoato, monocrotofos y metamidofos (Fernández et al., 2010).

Por otro lado, se ha demostrado que la exposición a ciertos OPs (leptofos, diclorvos, fentión, isofenfos, tricloronato, triclorfón, merfos, metamidofos, clorpirifós) puede producir daño neurológico a largo tiempo, luego de intoxicaciones agudas o posterior a intoxicaciones crónicas que han pasado desapercibidas (Carod Benedico, 2002), con síntomas extrapiramidales y psiquiátricos como psicosis, ansiedad, depresión, alucinaciones, agresividad; además del inadecuado funcionamiento en una variedad de pruebas neurocomportamentales en las cuales se incluye la memoria, la concentración y el aprendizaje. Incluso se ha asociado como una de las causas de la enfermedad de Parkinson y Alzheimer (Hurtado C & Gutiérrez de Salazar, 2005; Parrón, Requena, Hernández, & Alarcón, 2011b)

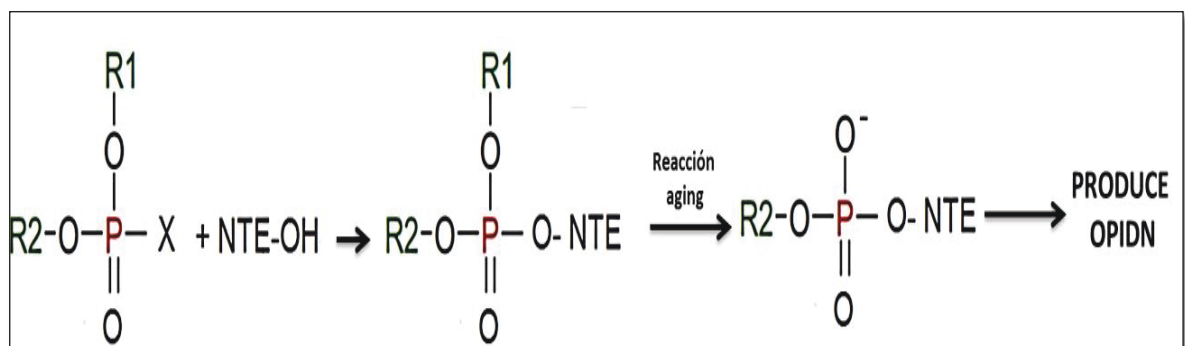
Entre estos síndromes se encuentra la neuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDN) (Carod-Artal & Speck-Martins C., 1999; Ehrich & Jortner, 2002), que se caracteriza por la fosforilación e inhibición de otro tipo de enzima, la esterasa neurotóxica o esterasa blanco de neuropatía (NTE) y el incremento del Ca^{2+} intracelular por alteración de la enzima calcio-calmodulina-quinasa II, lo cual puede llevar a degeneración axonal en grandes neuronas distales del sistema nervioso central y periférico (El-fawal & McCain, 2008).

2.3. ESTERASA BLANCO DE NEUROPATÍA (NTE)

La esterasa blanco de neuropatía fue descubierta por Johnson, M. K en 1969, es una proteína ampliamente distribuida en el sistema nervioso, principalmente en el cerebro y sustancialmente menos en médula espinal y nervios periféricos (Roldán-Tapia & Sánchez-Santed, 2004); en el cerebro se encuentra en el retículo endoplasmático de neuronas pero no en el de las células gliales; además, se encuentra en otros tejidos, como el intestino, los riñones, los linfocitos y su actividad depende del contenido lipídico (Jokanović et al., 2011).

La NTE está constituida por 1327 aminoácidos con un peso molecular de 155 KDa y es fácilmente fosforilada por acción de los OPs; sin embargo, para el desarrollo de la OPIDN, además de la inhibición simple de la NTE se debe producir una segunda reacción llamada envejecimiento “aging” (Ehrich & Jortner, 2002), nombre que se le ha asignado por la progresión lenta del proceso, la cual consiste en la pérdida, por parte del OP de uno de los grupos R, al romperse un enlace en la cadena R-O-P, dejando un grupo fosforilo cargado negativamente. Este paso es indispensable ya que forma un complejo enzima-organofosforado muy estable y resistente al rompimiento o hidrolisis; de no ser así se podría reactivar la enzima por factores endógenos (Figura 2) (Emerick, Peccinini, & Oliveira, 2010)

Figura 3. Mecanismo de la reacción general para producir OPIDN*



Fuente: Modificado de (Emerick et al., 2012).

*Esquema ilustrativo de la reacción asociada con la inhibición de NTE (fosforilación de la enzima), seguida de la reacción de envejecimiento enzimático “aging” que da como resultado OPIDN.

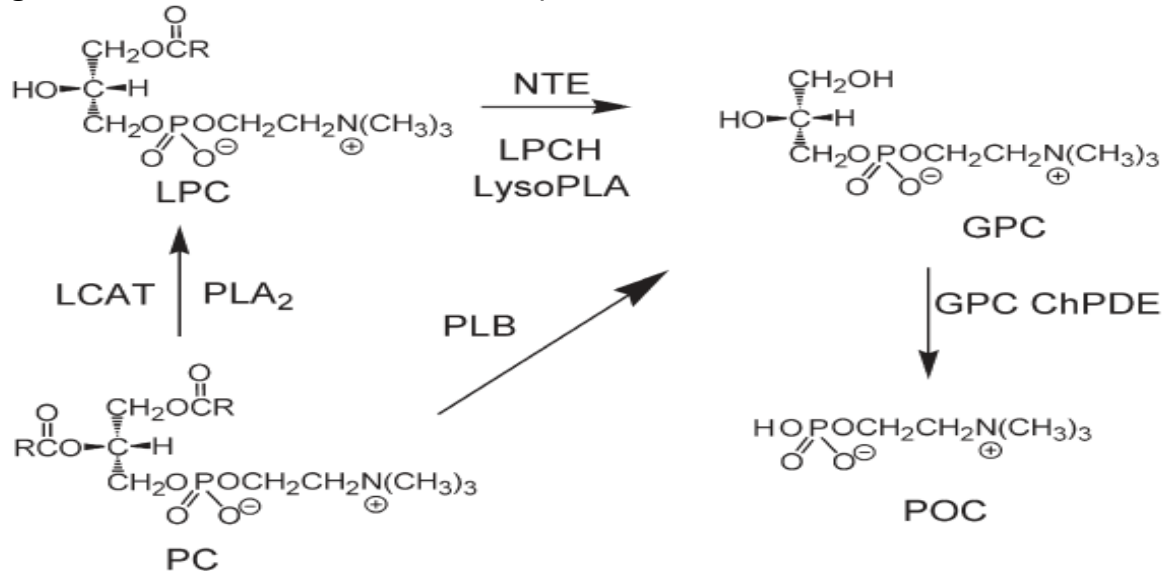
Funcionalmente se ha demostrado que la NTE hidroliza lípidos asociados a la membrana, por lo cual presenta un papel importante en la regulación del metabolismo de fosfolípidos; es conocida por ser una fosfolipasa B; su inactivación puede reducir la degradación de la fosfatidilcolina a glicerofosfocolina, por lo que su deficiencia lleva a la acumulación anormal del contenido de fosfatidilcolina o de lisofosfatidilcolina en la membranas de las células, lo cual genera citotoxicidad asociada con desmielinización (Vose et al., 2008); lo anterior puede interferir con la homeostasis normal de los lípidos de membrana, afectando la iniciación de las neuritas. Ésta afección también se da por acumulación de lisolecitina, donde la NTE esta implicada en su hidrolisis (Emerick et al., 2012) (Figura 3).

La NTE también juega un importante papel en el desarrollo embrionario en mamíferos, es esencial en la supervivencia del embrión y su depleción causa muerte por falla en la formación de la placenta y de su vasculatura (Chang & Wu, 2010).

Del mismo modo, la NTE está involucrada en el transporte de membrana intracelular y rutas de señalización celular entre neuronas y células gliales; además que facilita el transporte de macromoléculas de las neuronas al extremo

distal de axones largos, aportando de esta manera al mantenimiento axonal (Chang & Wu, 2010).

Figura 4. Reacciones metabólicas de lípidos de membrana relacionadas con NTE*



Fuente: Tomado de (Vose et al., 2008)

*GPC, glicerofosfocolina; GPC ChPDE, glicerofosfocolina colinefosfodiesterasa; LCAT, lecitina: colesterol aciltransferasa; LPC, lisofosfatidilcolina; LPCH, lisofosfatidilcolina hidrolizada; LysoPLA, lisofosfolípasa; PC, fosfatidilcolina; PLA₂, fosfolípasa A₂; PLB, fosfolípasa B; POC, fosforilcolina.

A pesar de que no ha sido completamente esclarecida la función bioquímica de la NTE está implicada en la regulación y funcionamiento normal de los canales de calcio en la membrana celular (Emerick et al., 2012). La entrada excesiva de calcio a la célula, induce degeneración similar a la degeneración walleriana, con la consecuente activación de la proteasa neutral activada del calcio (CANP), que promueve la digestión de la porción terminal de los axones impidiendo la transmisión de los impulsos nerviosos de las células postsinápticas y por ende provocando procesos neurodegenerativos (Emerick et al., 2010).

El cuadro clínico de esta neuropatía se caracteriza por parestesias en pies y manos, dolor en las pantorrillas, debilidad progresiva y ascendente, arreflexia generalizada, que suele iniciar con compromiso del reflejo aquiliano. Dichos síntomas pueden persistir por semanas o años y su recuperación suele ser lenta e incompleta (Hurtado C & Gutiérrez de Salazar, 2005).

2.4. MIELINA Y PROCESOS DE DESMIELINIZACIÓN

La mielina o vainas de mielina es una estructura de múltiples capas alrededor del axón, producida luego de una modificación de la membrana plasmática de los oligodendrocitos (Miron, Kuhlmann, & Antel, 2011); estas membranas, tienen un contenido de proteínas especialmente bajo (25-30%) y un alto contenido lipídico

(70-75%) que le confiere la capacidad de ser excelentes aislantes (Baumann & Pham-Dinh, 2001). La vaina de mielina facilita la conducción del impulso nervioso en los axones con velocidad y precisión, su capacidad de aislar también permite que haya millones de fibras en contacto unas con otras y no se produzcan interferencias ni confusiones en las señales (Mekhail, Almazan, & Tabrizian, 2012).

Dentro de los lípidos estructurales de la membrana de mielina se encuentran los fosfoglicéridos (fosfatidilcolina), los fosfoesfingolípidos (esfingomielina) y el colesterol; a nivel del SNC las principales proteínas son: la proteína proteolipídica de la mielina, proteínas básicas de mielina, que constituyen el 80 % del total de las proteínas y la glicoproteína asociada a la mielina (Baumann & Pham-Dinh, 2001).

Se han documentado una serie de alteraciones en la mielina, causadas tanto por factores exógenos (exposición a xenobióticos) como endógenos (alteraciones genéticas), en los que se pueden afectar tanto la estructura (lípidos y proteínas), la biosíntesis como las células involucradas en el proceso de formación de la mielina (Ziemann, Wahl, Hattingen, & Tumani, 2011). Estas alteraciones finalmente llevan a trastornos desmielinizantes, donde hay pérdida o destrucción de mielina, que ralentiza o detiene los impulsos nerviosos, dando lugar a una gran cantidad de síntomas neurológicos (Mekhail et al., 2012).

Durante los procesos de desmielinización se presentan una serie de mecanismos de reparación, donde las células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs) proliferan y migran rápidamente cubriendo el área desmielinizada (Miron et al., 2011). Este proceso consta de cuatro fases coordinadas: reclutamiento, proliferación, migración y diferenciación y alguna falla en cualquiera de estas etapas puede contribuir significativamente al fallo en el proceso de remielinización (Bruce, Zhao, & Franklin, 2010).

Este tipo de patologías se han podido identificar por medio de marcadores de las proteínas estructurales de la mielina, entre las que se encuentra la proteína base mielina (MBP), un grupo de 7 proteínas producidas a partir de un gen único (Baumann & Pham-Dinh, 2001). Contribuyen a la formación, compactación y maduración de las vainas de mielina y se expresan considerablemente en los oligodendrocitos maduros y células de Schwann. Durante la mielinización, estas proteínas son expresadas en una secuencia altamente coordinada, además, se ha demostrado que en procesos de desmielinización la expresión del mRNA para MBP se reduce y luego durante la fase de remielinización (proceso en el que se restaura las vainas de mielina) se encuentra sobre-regulado (Mozafari, Sherafat, Javan, Mirnajafi-Zadeh, & Tiraihi, 2010).

2.5. RESPUESTA CELULAR DEL SNC FRENTE AL TÓXICO

El sistema nervioso central presenta una serie de características específicas que le otorgan un estatus privilegiado, confiriéndole capacidades para proteger su ambiente y defenderse por sí mismo de una variedad de patologías (Galea, Bechmann, & Perry, 2007). Entre ellas, se cuenta la presencia de una barrera hematoencefálica (BHE) conformada por células especializadas que lo aíslan del flujo sanguíneo y le permiten regular la entrada de moléculas a su interior, la carencia de drenaje linfático, un microambiente inmunosupresivo y la presencia del sistema Fas Ligando que le aporta la capacidad de inducir apoptosis celular (Griffiths et al., 2010).

No obstante, en los últimos años se ha demostrado la presencia de interacciones entre el sistema nervioso y el sistema inmune, ejemplo de ello es la salida de las células dendríticas del cerebro y la capacidad de las células T del sistema inmune para acumularse en el cerebro, aportando vigilancia permanente como respuesta a antígenos en ausencia de inflamación o infección (Reinke & Fabry, 2006); aunado a ello, se encuentran las células gliales, particularmente los astrocitos y la microglia, los cuales constituyen la población celular más abundante del sistema nervioso central y cumplen funciones claves como células reguladoras del microambiente neuronal, empleando mecanismos que modulan la respuesta inmune y limitan la inflamación inducida por cualquier injuria tisular (Hauwel et al., 2005).

2.5.1. Células astrogliales. Los astrocitos son una enorme población de células gliales de origen neuroectodérmico, no excitables, que representan el 80% del volumen cerebral y se encuentran dispuestos entre las neuronas (Pascual, González-Llanos, Cerdán, Carceller, & Roda, 2000). En cuanto a su morfología y distribución se clasifican en tres grupos principales (Chen & Swanson, 2003):

- Protoplásmicos. con una morfología arbustiva, numerosas ramas y procesos cortos, se encuentran a través de toda la sustancia gris.
- Fibrosos: presentes en sustancia blanca, exhiben una forma menos ramificada, los procesos son más largos y finos.
- Radiales: se distribuyen alrededor de los ventrículos, orientados perpendicularmente a la superficie de estos y tienen unos procesos largos no ramificados.

Los astrocitos por medio de canales proteicos de uniones gap, ubicados en los pies perivasculares al final de sus prolongaciones citoplasmáticas, presentan interacciones con las neuronas (los protoplásmicos envuelven las sinapsis y los fibrosos los nódulos de Ranvier) (Sofroniew & Vinters, 2010), los capilares

sanguíneos e intercelularmente con otras células gliales, intercambiando de esta manera moléculas como inositol trifosfato, glucosa, glutamato, glutamina y lactato (D. D. Wang & Bordey, 2008). Estas interacciones están implicadas en una variedad de rutas de señalización esenciales para el buen funcionamiento del cerebro (Ricci, Volpi, Pasquali, Petrozzi, & Siciliano, 2009).

Los astrocitos son responsables de una amplia variedad de complejas y esenciales funciones para mantener la actividad normal del cerebro (Pascual et al., 2000), éstas se pueden llevar a cabo gracias a características específicas en su estructura como la expresión de enzimas claves involucradas en varias rutas metabólicas, el elevado contenido de mitocondrias y la gran variedad de canales iónicos y transportadores de diversos metabolitos presentes en sus membranas (D. D. Wang & Bordey, 2008).

Dentro de las funciones están la participación en la transmisión sináptica y procesamiento de la información por las neuronas (Sofroniew & Vinters, 2010), contribución en el soporte neuronal, regulación del metabolismo energético por conservación y reserva del glicógeno, formación de la BHE, absorción y degradación de neurotransmisores (Hamby & Sofroniew, 2011), regulación de la composición iónica extracelular y de especies reactivas de oxígeno (ROS); por lo tanto, mantenimiento del ambiente extracelular (De Keyser, Mostert, & Koch, 2008).

Por otro lado, los astrocitos también se han asociado con la producción de factores neurotróficos (factor de crecimiento neural [NGF], factor neurotrófico derivado de cerebro [BDNF], factor neurotrófico derivado de la línea celular glial [GDNF]), contribución tanto en la inmunidad innata como adaptativa (Nair, Frederick, & Miller, 2010) y formación de cicatriz glial cuando hay pérdida neuronal; funciones claves en la regulación del metabolismo y supervivencia neuronal. (Takuma, Baba, & Matsuda, 2004)

2.5.1.1. Respuesta de los astrocitos ante la injuria. En respuesta a condiciones patológicas como isquemias, infecciones, inflamaciones, traumas, enfermedades neurodegenerativas, entre otras, los astrocitos sufren una serie de cambios comunes, transformándose en un fenotipo reactivo (Hamby & Sofroniew, 2011). Los cambios experimentados por los astrocitos comprenden edema, acortamiento de sus procesos, incremento en la producción de filamentos intermedios, proliferación celular, los cuales ocurren debido a hiperactividad de sus mecanismos de amortiguación por alteraciones del espacio extracelular (Middeldorp & Hol, 2011). Este fenómeno conocido como astrogliosis, permite limitar el daño causado, proteger las neuronas y evitar su muerte por eventos de excitotoxicidad (Sofroniew, 2010).

Entre los marcadores que permiten determinar ese tipo de cambios en los astrocitos reactivos, se encuentra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la

principal proteína estructural de los filamentos intermedios primarios, presentes en los astrocitos, que mantiene su morfología por lo que funcionan como marcador de astrocitos maduros (Middeldorp & Hol, 2011); además, se ha demostrado que mantiene la integridad de la BHE y modula la eficacia de las sinapsis. La sobrerregulación de GFAP, es un indicador significativo de gliosis como respuesta a daños en el SNC (Fatemi et al., 2008; Garcia, Seidler, & Slotkin, 2005).

Los astrocitos presentan una serie de mecanismos de protección neuronal, los cuales están relacionados con la captación de glutamato, un aminoácido excitotóxico que se incrementa en la hendidura sináptica luego de una lesión (Zou et al., 2011). Este aminoácido es transformado en glutamina (aminoácido sin actividad) por medio de la enzima glutamina-sintetasa, evitando de esta forma la activación de receptores ionotrópicos y por consiguiente, bloqueando una serie de cascadas que inician eventos de excitotoxicidad, continúan con incremento del calcio intracelular y finalmente llevan a la muerte celular (Nair et al., 2010). Igualmente, por el alto contenido de antioxidantes presentes en los astrocitos y por la producción extracelular de precursores para el sistema antioxidante glutatión neuronal (GSH), resisten la acidosis metabólica y permanecen viables en pH muy bajos, por lo cual son capaces de regular iones perjudiciales para la viabilidad neuronal, como el K^+ incrementado por la lisis celular y en condiciones de estrés oxidativo regulan el desbalance de este catión (Ricci et al., 2009).

No obstante, en situaciones donde la astrogliosis se hace persistente por la progresión del daño, se presentan procesos neurodegenerativos como lo es la formación de cicatriz glial, la cual se compone principalmente de astrocitos reactivos y proteoglicanos (Sofroniew, 2010). Esta cicatriz aísla el tejido, los procesos de neurotransmisión y regeneración de axones lesionados (Nieto-sampedro, Collazos-castro, Taylor, & Gudiño-cabrera, 2002); además, los astrocitos también contribuyen al incremento del daño por la producción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1B, IL-6 y TNF α (Zou et al., 2011).

2.5.2. Células microgliales. Las microglías son células dinámicas, inmunoresidentes que representan del 10 al 20 % del total de la población celular en el SNC del adulto (Loane & Byrnes, 2010). Se encuentran uniformemente distribuidas, siendo más comunes en sustancia gris que en sustancia blanca (Kitamura, Yanagisawa, Takata, & Taniguchi, 2009). Pertenecen a la línea fagocítica mononuclear, actúan como biosensores inmunes de la regulación homeostática, en consideración a que mantienen vigilancia estricta y como mediadores primarios de la respuesta inmune innata del cerebro contra la infección, el daño y las enfermedades (Liu & Hong, 2003a).

De acuerdo a su morfología, la microglía se divide principalmente en 2 tipos: ramificada y ameboides (Polazzi & Monti, 2010). Ésta última tiene un gran cuerpo celular con procesos cortos asemejándose a los macrófagos, se encuentra en gran proporción en el desarrollo del cerebro debido a que en estados embrionarios

tardíos o estados postnatales tempranos un gran número de neuronas y oligodendrocitos sufren muerte celular de manera natural, por lo cual, induce apoptosis y actúa como barredores de restos o debrís celulares por fagocitosis (Nakajima & Kohsaka, 1993); además, está implicada en la formación de vasos sanguíneos y en la producción de factores neurotróficos que contribuyen al crecimiento y guía de las neuritas (Kitamura et al., 2009).

Con el desarrollo del cerebro, la forma ameboide desaparece y la microglía altamente ramificada, incrementa su número y es considerada residente. Esta microglía presenta un cuerpo celular pequeño, con procesos largos que se extienden en todas las direcciones, exhibe pequeños movimientos y cambios estructurales (Kitamura et al., 2009), está involucrada activamente en la vigilancia inmune (sensor) y limpieza del fluido extracelular, fagocitando según sea necesario para proteger y preservar el tejido sano (Luo & Chen, 2012); además, expresa bajos niveles de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II, así como moléculas coestimuladoras tales como CD86 y CD40, mostrando un rol como célula presentadora de antígenos (Yang, Han, Kaur, Crane, & Parsa, 2010).

2.5.2.1. Respuesta de la microglía ante la injuria. Cuando el cerebro es lesionado por algún tipo de trauma o es afectado con algún desorden neurodegenerativo, la microglía sufre cambios morfológicos y moleculares graduados pero estereotipados (Luo & Chen, 2012), transformándose en un fenotipo activado y acumulándose en los sitios afectados. Dichos cambios son proporcionados por la severidad del tejido dañado (Kettenmann, Hanisch, Noda, & Verkhratsky, 2011)

Los movimientos graduados y estereotipados que sufre la microglía en su proceso de activación se caracterizan por diversos estados. El primer estado luego de la activación se denomina “*estado de retracción*”, donde la microglía activada comienza a desramificarse y desarrolla un gran cuerpo celular con varios procesos cortos y engrosados (Luo & Chen, 2012). Esto ocurre durante las primeras horas de activación y coincide con la búsqueda, reconocimiento y adhesión a las neuronas dañadas; es decir, coincide con el rápido movimiento a los sitios focales del daño, donde proliferan, engullen células dañadas o muertas y presentan antígenos para la infiltración de linfocitos (Kettenmann et al., 2011). Durante el final de esta fase algunas células generan nuevas protrusiones, presentando un “*estado de transición*”, en el cual, la retracción de los procesos viejos ocurre concomitantemente con la emergencia de nuevos procesos; siendo estos últimos más dinámicos (Stence, Waite, & Dailey, 2001).

Posteriormente, gran cantidad de células microgliales realizan una transformación abrupta hacia un “*estado de movilidad*” más dinámico, que involucra ciclos de extensión y retracción de los nuevos procesos (Kettenmann et al., 2011; Stence et al., 2001). Algunas células después de la aparición de los nuevos procesos, comienzan a formar perfiles en forma de copa en los que envainan, de forma

temporal objetos del tamaño de una célula con el fin de registrar las propiedades de su superficie celular y así, distinguir entre células sanas y células dañadas o muertas, que luego serán removidas (Stence et al., 2001). La acción de registrar juega también un papel importante en la presentación de antígenos, en la respuesta inmune, en remover localmente sustancias tóxicas y en la distribución de sustancias protectoras (factores neurotróficos) producidas por la microglía activada (Polazzi & Monti, 2010). Finalmente, si el daño del tejido es extensivo, la microglía desarrolla una apariencia ameboide, en el cual continúa fagocitando; posteriormente se convierte a una forma reactiva que muestra una morfología esferoide con pocos procesos pero que retiene la actividad fagocítica. Las formas reactiva y activada pueden eventualmente retornar al estado residente-ramificado (Kettenmann et al., 2011).

Los cambios exhibidos por la microglía durante su activación se pueden identificar a través de diferentes marcadores, entre los que se encuentra OX42-CD11b una proteína expresada por la microglía y los macrófagos que invaden el SNC, reconoce el receptor 3 del complemento (CR3) (Yang et al., 2010). Actualmente no existe ningún marcador específico para microglía, debido a que estas células por pertenecer a la línea fagocítica mononuclear comparten muchos receptores de superficie con los macrófagos, por lo cual se hace difícil diferenciar la microglía con morfología ameboide de los macrófagos (Gao et al., 2008; Windelborn & Mitchell, 2012)

Cabe resaltar que bajo condiciones patológicas la función de la microglía permanece en controversia debido al doble papel que juega (Polazzi & Monti, 2010). Inicialmente, la producción de factores neurotróficos tales como factor derivado de la línea celular glial (GDNF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor de crecimiento neural, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), neurotrofinas (NTs) factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), citoquinas anti-inflamatorias, IL-10, receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) y posteriormente la reparación del tejido dañado por eliminación de fragmentos de células muertas y sustancias tóxicas por fagocitosis, contribuyen con los eventos neuroprotectivos (Kettenmann et al., 2011; Kitamura et al., 2009).

Por otro lado, la expresión de sustancias neurotóxicas como la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL12, IL6, TNF- α), radicales libres (óxido nítrico y superóxido) que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), ácidos grasos y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), contribuyen negativamente al aumentar el daño neuronal (Liu & Hong, 2003). A pesar de ello se sabe que son más los efectos neuroprotectivos que ejerce que los efectos neurodegenerativos (Kitamura et al., 2009).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MANEJO Y CUIDADO DE LOS ANIMALES

Los animales se manipularon bajo aprobación del comité de ética de la Universidad del Tolima, quien consideró adecuados los procedimientos de mantenimiento, ensayo y eutanasia. Además, se aplicaron las normas internacionales de protección y manejo de animales de laboratorio incluidas en el '*Guide for care and use of laboratory animals*', y lo descrito en la ley 84 de 1989 (protección animal en Colombia) y la ley 576 de 2000 (regulación para el ejercicio de la medicina veterinaria en Colombia).

Las unidades experimentales usadas en este estudio fueron ratas macho albinas de la línea Wistar, de 8 a 10 semanas de edad. Fueron suministradas por el Bioterio de Experimentación Animal de la Universidad del Tolima (BEA-UT) y mantenidas bajo condiciones sanitarias convencionales, controlando variables ambientales, como humedad relativa (70–80 %), temperatura ($22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclo luz: oscuridad de 12 horas, cambios de aire: de 12 a 15 cambios por hora, alimento balanceado comercial (Rodentina® extrudizado-Agrinal Colombia S.A.) a 15 g/rata y agua de bebida acidulada *ad-libitum*.

3.2. AGENTE INDUCTOR

Como agente para inducir la neurotoxicidad se usó Clorpirifós (CPF), con nombre comercial Lorsban al 48%, comercializado por Dow Agrosciences de Colombia S.A. El CPF fue diluido en aceite de maíz para preparar una solución madre al 0,48% (1 ml de CPF y 9 ml de aceite de maíz), a partir de la cual se preparo una solución de trabajo al 0,048%, conteniendo 1 ml de la solución madre y 99 ml de aceite. Ésta solución fue almacenada herméticamente por bioseguridad y porque el CPF es sensible a oxidación, para ser utilizada cada semana en la administración de los diferentes tratamientos

3.3. ENSAYO PRELIMINAR PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LAS POSOLOGIAS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

Inicialmente se realizó un ensayo piloto, en el cual se evaluaron dos posologías de CPF (910 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 455 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), basadas en los datos de toxicidad en rata, disponibles en la literatura científica (Dam, Seidler, & Slotkin, 1998), con el fin de ajustar la dosis máxima subletal a la cual el CPF no desencadenara un síndrome colinérgico y de esta manera establecer las posologías para el diseño experimental. Para cada posología se emplearon 2 ratas de 260 g al inicio del experimento. Las dosis calculadas para cada animal de acuerdo a su peso fueron suministradas mediante sondaje gastroesofágico (gavaje) utilizando como vehículo aceite de maíz a un volumen de 2 ml por dosis. Las observaciones clínicas se

efectuaron mediante monitoreo permanente de cada individuo desde la administración del organofosforado hasta 48 horas post tratamiento.

3.4. INDUCCIÓN DE NEUROTOXICIDAD POR EXPOSICIÓN SUBCRÓNICA AL CPF

Se utilizaron 16 ratas con un peso promedio de 263 g al inicio del experimento, distribuidas aleatoriamente en cuatro grupos experimentales (T1, T2, T3 y T4), conformados por 3 animales cada uno (n=4x3) y dos grupos control (C1 y C2) cada uno con dos ratas (n=2x2).

Todos los animales fueron tratados con igual volumen (2 ml). A las ratas de los grupos experimentales 1 y 2 se les administraron cuatro dosis de CPF con un intervalo entre dosis de 8 días, a posologías de 114 µg/Kg y 228 µg/Kg respectivamente. A los grupos 3 y 4, se les administraron ocho dosis de CPF a iguales posologías e intervalos de tiempo. Para los animales de los grupos control se empleó aceite de maíz como placebo administrado bajo las mismas condiciones de los grupos tratados. El número de réplicas para los controles fue reducido a dos de acuerdo a las recomendaciones de reducción en la experimentación con animales vivos (Tabla 1).

El CPF para todos los animales fue mezclado y homogenizado en aceite de maíz como vehículo y las dosis fueron calculadas de acuerdo al peso de los animales cada semana y suministradas mediante sondaje gastroesofágico.

Tabla 1. Diseño experimental para la inducción subcrónica del CPF

Posología CPF (µg/Kg) oral	DOSIS o SEMANAS	
	4	8
114	T1 (n=3)	T3 (n=3)
228	T2 (n=3)	T4 (n=3)
CONTROL	C1 (n=2)	C2 (n=2)

*T1 y T2: CPF por 4 semanas; T3 y T4: CPF por 8 semanas; C1: aceite de maíz por 4 semanas; C2: aceite de maíz por 8 semanas.

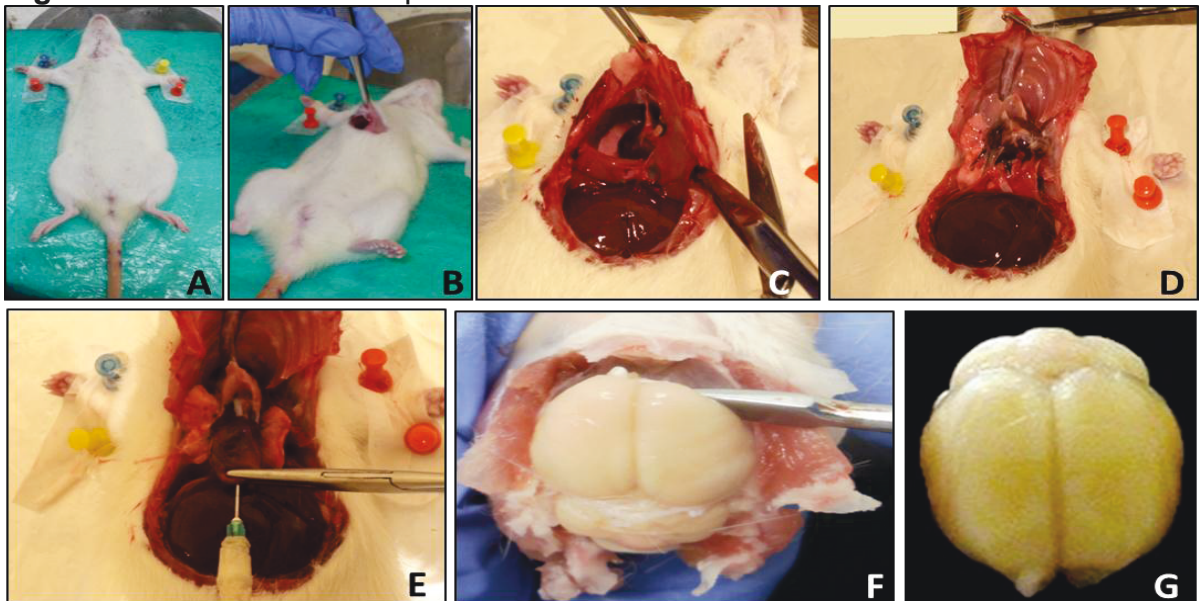
3.5. PERFUSIÓN, CRIOPRESERVACIÓN Y CORTES

Después de ocho días de haber recibido el último tratamiento, todos los animales de cada grupo fueron sacrificados, empleando una dosis intraperitoneal de anestesia general con pentobarbital sódico al 0,64% a posología de 60 mg/Kg p.v. y Xilacina al 2% (10 mg/Kg p.v.). Doce horas antes de éste procedimiento se suspendió el alimento con el fin de facilitar el efecto del agente anestésico. Luego de su administración, se comprobó la presencia de signos de anestesia somática

profunda con pérdida de sensibilidad y de los reflejos tanto superficiales como profundos. Tiempo seguido los cerebros fueron perfundidos por vía intracardiaca y avance aórtico con solución salina (200 ml) y luego con paraformaldehido (PFA) al 4% a igual volumen. Se procedió a extraer cuidadosamente los cerebros, dejándolos por 48 horas en PFA al 4% (4°C) para completar la fijación por imbibición (Figura 4). Posteriormente los cerebros fueron tratados con sacarosa en gradientes de concentración al 7%, 15% y 30% con intervalo de un día para cada concentración. Finalmente se colocaron en una solución criopreservante (30% etilenglicol, 30% Glicerol, 25% tampón fosfato 0,4 M y 15% agua desionizada) y se almacenaron a - 20°C, hasta la realización de los cortes.

Se obtuvieron cortes coronales con un grosor de 50 µm empleando un vibratomo Vibratome 1500 Sectioning System, las muestras fueron recolectadas y criopreservadas en cajas multipozos hasta la realización de las pruebas histoquímicas e inmunohistoquímicas. Como objeto de estudio se seleccionaron los bregmas entre - 2.16 mm y - 3.12 mm (Paxinos, G., & Watson, C. 2007).

Figura 5. Procedimiento de perfusión intracardiaca*



Fuente: Autor.

*Posición decúbito supino del animal para iniciar el procedimiento (A), Incisión a nivel de la apéndice xifoides (B) visualización del hígado, entrada a la cavidad torácica (C) exposición del corazón, los grandes vasos y los pulmones (D), introducción de la aguja de perfusión a través de la pared del ventrículo izquierdo (E), decapitación del animal y extracción del cerebro (F), Obtención del cerebro perfundido (G).

3.6. TÉCNICA HISTOQUÍMICA

Con el fin de valorar la viabilidad y distribución de las neuronas, se realizó la tinción básica de Nissl, empleando como colorante el azul de toluidina. Para ello se siguió el protocolo estandarizado, basado en la técnica descrita de tinción con azul de toluidina para células Mast, (IHC World., 2011).

Inicialmente, se preparó una solución madre al 1% (0,5 g de azul de toluidina y 50 ml de alcohol al 70%). Luego, se prepararon 200 ml de una solución de trabajo, conteniendo 160 ml de cloruro de sodio al 1% (pH ajustado a 2,2) y 40 ml de la solución madre. A continuación, los cortes previamente montados en láminas tratadas con gelatina porcina y completamente secos a temperatura ambiente fueron sumergidos en la solución de trabajo durante 10 minutos, seguidamente se lavaron 3 veces en agua desionizada. Finalmente, se realizó el proceso de deshidratación con alcoholes al 70% y 95% durante 2 minutos cada uno y al 100% por 4 minutos. El proceso de aclaramiento se realizó 2 veces durante 4 minutos en xileno y las láminas fueron selladas con Consult Mount.

3.7. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Se seleccionaron los cortes en el bregma adecuado y se depositaron en cajas multipozos para proceder a realizar 5 lavados con tampón fosfato (PB) 0,1M durante 10 minutos cada uno. Luego se realizó la inhibición de la peroxidasa endógena empleando una solución de metanol y PB 0,1M (1:1) con peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 30%, dejándola actuar por 20 minutos. Seguidamente se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno y se procedió a saturar los posibles sitios de unión inespecífica por medio del tampón de preincubación con albúmina sérica bovina (BSA 1%) y Tritón X-100 al 0,3% en PB 0,1M durante 90 minutos. Posteriormente, los cortes fueron incubados toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-GFAP (1:500) anti-OX42 (1:100) y anti-MBP (1:100) según el caso, diluidos en tampón de incubación BSA al 0,3% y Tritón X-100 al 0,3% en PB 0,1M.

Al día siguiente, se recuperó el anticuerpo primario para su reutilización por 1 vez. Los cortes fueron lavados 3 veces con PB 0,1 M por 10 minutos e incubados a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado anti-mouse o anti-rabbit según el anticuerpo primario empleado (1:250), por 2 horas. De nuevo, se realizaron 3 lavados de 10 minutos y los tejidos se incubaron en el complejo avidina-biotina peroxidasa (1:250 para cada reactivo A y B), por 2 horas a temperatura ambiente, evitando su exposición a la luz; este complejo se preparó media hora antes de su uso. Luego, los cortes fueron lavados 3 veces con PB 0,1 M y se llevó a cabo el revelado con el cromógeno diaminobenzidina (DAB) al 0,1% y H_2O_2 al 0,02 % en PB 0,1 M, hasta que los cortes viraron a un color marrón claro. Inmediatamente, se detuvo la reacción con PB 0,1 M.

Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación constante (shaker) para asegurar un máximo contacto de los tejidos con los reactivos. Finalmente, los cortes fueron montados en láminas portaobjetos tratadas con gelatina porcina. Después de 24 horas se realizó el proceso de deshidratación con alcoholes al 70%, 96%, 100% y xileno, para su posterior fijación con el medio de montaje permanente consult mount.

En la inmunohistoquímica con el marcador anti-MBP previo al procedimiento de deshidratación y fijación se realizó el proceso de contratinción empleando como colorante el azul de toluidina durante 1 minuto, con el fin de contrastar la inmunorreactividad de la proteína base de mielina con los somas neuronales.

3.8. ZONAS DE ESTUDIO

La sustancia blanca ha tomado gran importancia en el desarrollo de diversos trastornos neurodegenerativos, dado que es el principal conector entre distintas regiones cerebrales, que permite que trabajen de forma unificada; además, por la implicación directa con funciones cognitivas (lenguaje, atención, memoria, funciones ejecutivas) y motoras (Kaur & Ling, 2009). La mielina junto con los axones son los directamente implicados en este tipo de daños ya sea por alteración en su estructura (proteínas y lípidos) o en las células implicadas en su desarrollo (Miron et al., 2011). Actualmente, se ha demostrado que la exposición crónica a los compuestos organofosforados constituye una afectación clara sobre este tipo de sustancia (Saulsbury et al., 2009).

Los OPs son transportados por el líquido cefalorraquídeo penetrando al cerebro a través de los ventrículos laterales. Territorios adyacentes a ellos representan zonas fronterizas, en donde células especializadas (astrocitos y microglía) llegan a defender y controlar los efectos contraproducentes que causan dichos compuestos (Bruce et al., 2010).

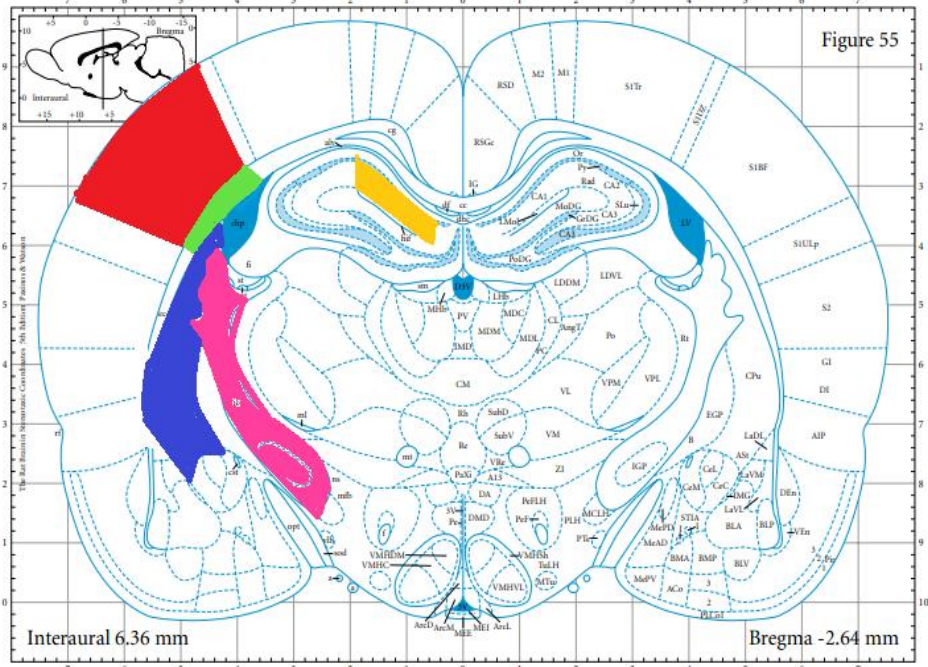
En este sentido, se establecieron diversas zonas de estudio que permitieran caracterizar morfológicamente las células gliales, la mielina y los diferentes cambios exhibidos por efecto de la neurotoxicidad. Estas zonas fueron definidas de acuerdo a la reactividad de los marcadores, a la susceptibilidad de algunas áreas frente a los tóxicos y a la correspondencia con territorios de sustancia gris o blanca. Tales como, la zona subcortical paraventricular (ZPV), zona hipocampal CA1, corteza somatosensorial (SIBF), capsula interna (CI) y estriado (STR) (Figura 5).

3.9. REGISTRO FOTOGRÁFICO Y DENSITOMETRIA

La determinación de los cambios en la expresión de las proteínas (GFAP, OX42, MBP) y la tinción de Nissl, entre los animales tratados respecto de los controles, se realizó mediante el registro fotográfico a 10X de aumento, con la cámara Motic

Images Plus 2.0, seguido del análisis densitométrico usando el paquete de procesamiento de imágenes Fiji-Win64 (Image-J, NIH), que genera datos en unidades relativas de densidad.

Figura 6. Zonas de estudio evaluadas en la neurotoxicidad inducida por CPF*



Fuente: Modificado del Atlas estereotáxico de (Paxinos & Watson, 2007).

*Representación gráfica del Bregma - 2.64 mm . Rojo: corteza somatosensorial (SIBF) Verde: zona subcortical paraventricular (ZPV); Amarillo: hipocampo CA1; Azul: cuerpo estriado lateral; Rosado: cápsula interna.

Adicionalmente, con el marcador GFAP se determinaron y cuantificaron las alteraciones en la morfología de los astrocitos, evaluando variables como densidad, área y longitud. Para ello, se tomaron imágenes a 40 X de aumento y se midieron 15 astrocitos por zona y tratamiento. La densidad y el área fueron analizadas a través del mismo software Fiji-Win64 y la variable longitud fue calculada calibrando la cámara y usando el Software Motic Images Plus 2.0 Multi-Language.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La variable considerada para el análisis estadístico fue densidad interior para todos los marcadores y tinciones. Adicionalmente para el estudio de los astrocitos de forma individual se sometieron al análisis las variables longitud, densidad y área. Inicialmente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) posterior a la comprobación de los supuestos estadísticos de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Levene). Seguidamente, se realizó una prueba de comparación múltiple entre tratamientos de Tukey ó de Games-Howell,

dependiendo de los resultados obtenidos en la prueba de Levene. Para todas las pruebas el nivel de significancia fue del 5% ($\alpha=0.05$). Los datos fueron procesados mediante el uso del paquete estadístico SPSS Statistics Version 20 para Windows (IBM, USA).

4. RESULTADOS

4.1. ENSAYO PRELIMINAR PARA ESTABLECIMIENTO DE LAS POSOLOGÍAS

En el ensayo piloto de toxicidad realizado para el establecimiento de la dosis subletal las cuatro ratas entraron en un síndrome colinérgico aproximadamente dos horas y media después de la administración del CPF, manifestando signos muscarínicos como salivación, lagrimeo e hipermotilidad gastrointestinal con presencia de heces blandas y húmedas. Los signos nicotínicos no fueron claramente visibles, aunque en algunos animales se observaron trismos faciales.

Todos los animales sobrevivieron a la crisis colinérgica la cual duró aproximadamente 3 horas; sin embargo, una de las ratas a la cual se le administro el CPF a 910 µg/Kg fue la más afectada, expresando signos nicotínicos más evidentes, tales como rechinar de dientes, fasciculaciones, movimientos masticatorios y trismos, por lo cual ésta posología fue descartada inmediatamente por causar un síndrome agudo no adecuado para los fines del experimento.

Por la presencia de efectos muscarínicos característicos de síndrome colinérgico incluso a la posología de 455 µg/Kg, se establecieron para el diseño experimental, la mitad y la cuarta parte de esta, es decir 228 µg/Kg y 114 µg/Kg, para garantizar que estuvieran por debajo del nivel de toxicidad baja, asegurando la inducción neurotóxica a dosis subletales.

4.2. INDUCCIÓN DE NEUROTOXICIDAD SUBCRÓNICA POR CPF

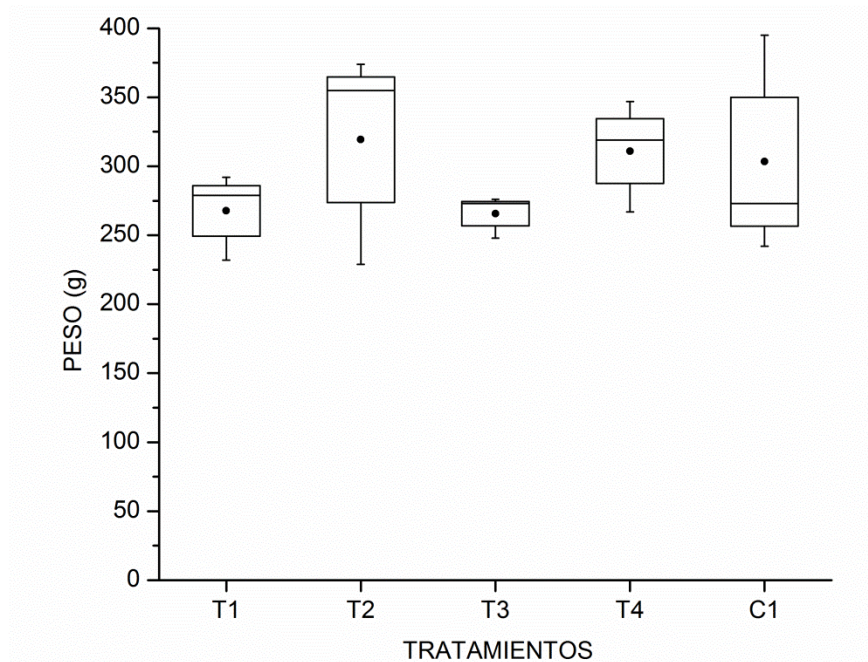
La administración de CPF en los animales tratados, no modificó el consumo de alimento ni la ganancia de peso, el cual fue monitoreado cada semana, sin diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2, Figura 6).

Tabla 2. Peso corporal en gramos (g) de ratas Wistar con neurotoxicidad inducida por CPF*

SEMANAS	TRATAMIENTOS												CONTROLES			
	T1			T2			T3			T4			C1		C2	
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R1	R2
1	197	260	270	344	194	364	200	202	182	220	312	316	256	230	383	271
2	229	280	297	357	225	471	235	235	213	236	310	325	276	243	385	293
3	245	280	289	351	243	380	257	252	235	255	305	334	270	240	389	312
4	255	297	312	366	254	380	264	267	244	256	317	341	290	255	393	315
5							296	278	273	274	322	335			401	341
6							313	311	276	286	328	369			401	358
7							318	313	278	305	330	377			400	371
8							327	322	285	303	326	379			405	373

*T1 y T2: CPF por 4 semanas; T3 y T4: CPF por 8 semanas; C1: aceite de maíz por 4 semanas; C2: aceite de maíz por 8 semanas. R1, R2, R3 número de individuos por tratamiento.

Figura 7. Pesos corporales por tratamiento durante la inducción de neurotoxicidad subcrónica*



Fuente: Autor

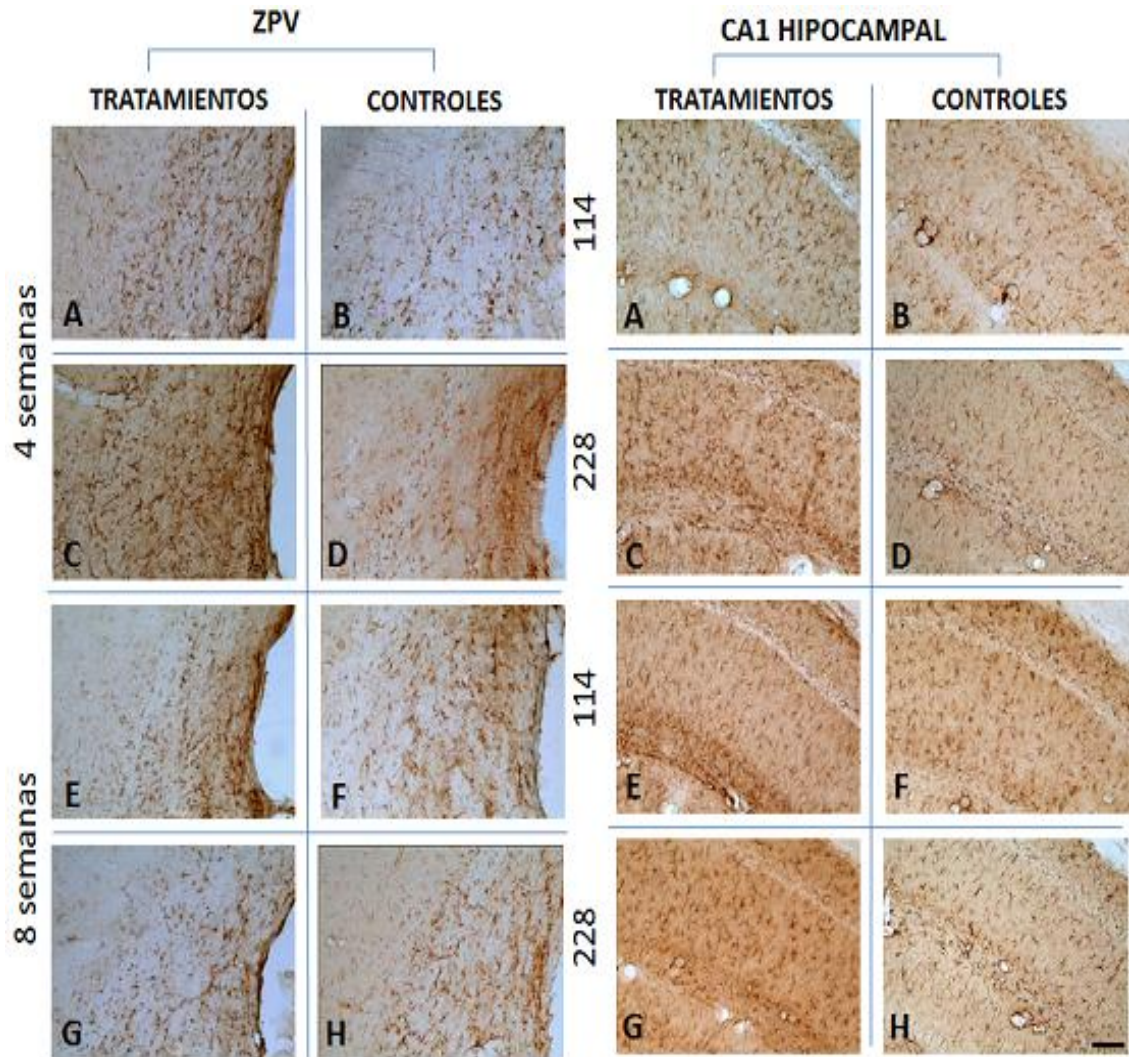
*Promedio de pesos corporales por tratamiento. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Grupos tratados con CPF durante 4 semanas de exposición a posologías de 114 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ respectivamente (T1,T2) y 8 semanas de exposición a iguales dosis (T3,T4); animales del grupo control (placebo= aceite de maíz). Grupos tratados n=3; Grupos control n=2. F= 7,13.

Asimismo, con las posologías empleadas en el ensayo (228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 114 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) no se presentó mortalidad durante el tiempo de experimentación, lo cual ratifica el manejo de dosis subletales establecidas para la inducción de neurotoxicidad aguda y subcrónica por CPF.

4.3. REACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS ASTROGLIALES POR EFECTO DEL CPF

En la zona subcortical paraventricular (ZPV) se observó un incremento en la densidad de astrocitos reactivos en los grupos tratados con CPF a posologías de 114 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ durante 4 semanas en relación con el grupo control. Ésta hiperreactividad se redujo significativamente hacia las 8 semanas de tratamiento. Por otro lado, en la zona CA1 del hipocampo se evidenció un incremento de la reactividad astrogliar en los dos tiempos (4 y 8 semanas) y ambas posologías (114 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), siendo más evidente en los animales tratados a 228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de CPF (Figura 7).

Figura 8. Hiperreactividad de las células astrogliales en ZPV e hipocampo CA1 por efecto del CPF*

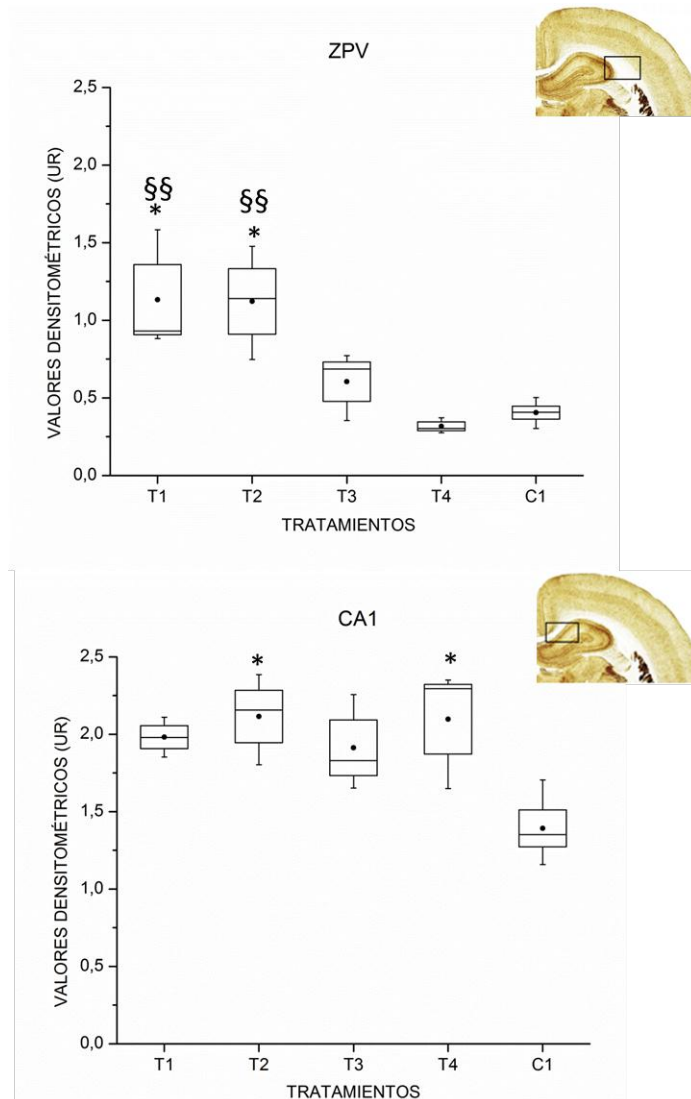


Fuente: Autor.

*Inmunohistoquímica del marcador de Proteína Ácida Glial Fibrilar (GFAP). Cortes coronales representativos de animales tratados con CPF a 114 µg/Kg (A,E) y 228 µg/Kg (C,G) y sus respectivos controles (B,D,F,H) en la ZPV e hipocampal CA1. Grupos tratados n=3, Grupos control n=2. Bregma - 2.64. Barra de escala=100 µm (10X).

Dichas observaciones fueron corroboradas en el análisis estadístico obteniendo para la ZPV diferencias significativas entre el tratamiento 1 respecto al tratamiento 4 y el control, al igual que el tratamiento 2 respecto al 4 y al control ($p=0,004$). Asimismo, para la zona hipocampal CA1 se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de los tratamientos 2 y 4 con relación al grupo control ($P=0,029$); sin presentarse diferencias mediadas por la dosis o por el tiempo entre los tratamientos (Figura 8).

Figura 9. Inmunorreactividad de la proteína acídica fibrilar glial (GFAP) en ZPV e hipocampal CA1*

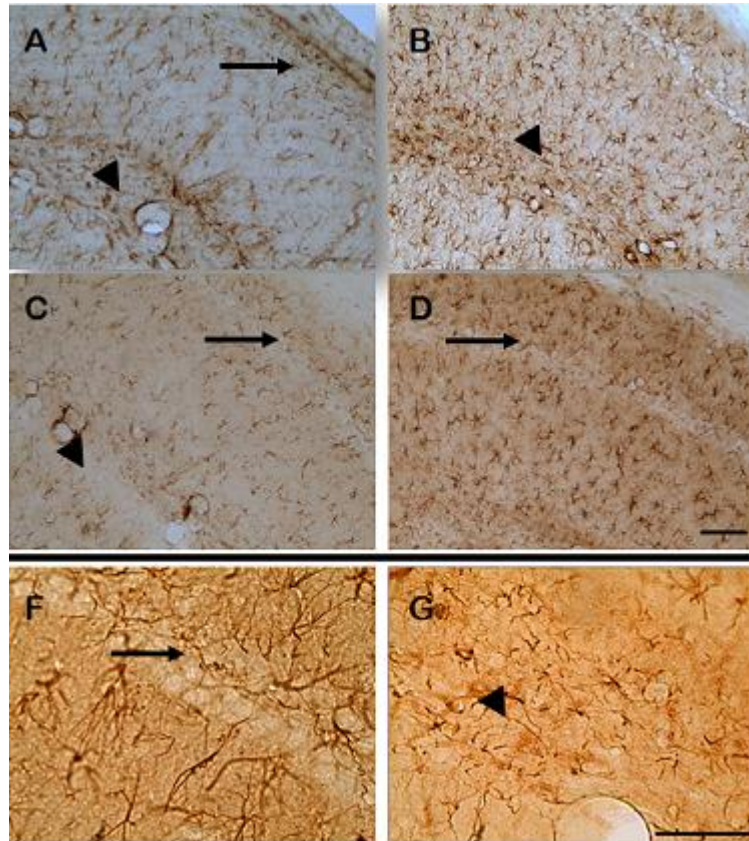


Fuente: Autor.

*Valores densitométricos en unidades relativas (UR) para el marcador de astrocitos GFAP en ZPV e hipocampal CA1. Grupos tratados con CPF durante 4 semanas de exposición a posologías de 114 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ respectivamente (T1,T2) y 8 semanas de exposición a iguales dosis (T3,T4); animales del grupo control (placebo= aceite de maíz). Grupos tratados n=3; Grupos control n=2. *p<0.05 vs. Control; §§ p< 0.01 vs. T4.

Además de la reactividad de los astrocitos, se evidenció infiltración o migración de astrocitos hacia la zona del hipocampo CA1 y hacia la zona subgranular del giro dentado, (zonas ricas en neuronas) en los tratamientos a 4 semanas de exposición comparado con el grupo control. Ésta infiltración no fue evidente en los tratamientos a 8 semanas. (Ver figura 9).

Figura 10. Infiltración astrocitaria en zona CA1 y subgranular del giro dentado en el hipocampo*



Fuente: Autor.

*Infiltración de astrocitos reactivos en hipocampo. (A, B) animales tratados con CPF a posologías de 114 µg/Kg y 228 µg/Kg respectivamente durante 4 semanas de exposición. 10X. (C, D) animales control tratados con aceite de maíz. 10X. (F, G) animales tratados con CPF a 4 semanas. 40X. Flechas indican astrocitos en la zona CA1 del hipocampo y puntas de flecha los astrocitos presentes en zona subgranular. Barra de escala en D = 100 µm y G = 50 µm.

4.4. CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LOS ASTROCITOS PROTOPLASMICOS EN ZONA CA1 DEL HIPOCAMPO POR EFECTO DEL CPF

Una vez hecha la valoración de la densidad global relativa y aleatoria, se realizó un estudio morfológico y morfométrico para determinar los cambios presentes en los astrocitos. En dicho estudio se midieron 15 astrocitos por tratamiento y por zona, evaluando la longitud, el área relativa y la densidad individual de área medida en cada astrocito.

En cuanto a morfología los animales control presentaron una leve inmunotinción del marcador GFAP. Esto permitió identificar astrocitos de aspecto normal, no reactivos, caracterizados por ser delgados, con un soma pequeño, estrecho y fusiforme; además con abundantes proyecciones citoplasmáticas primarias y secundarias largas y delgadas (Figura 10A).

Por el contrario, en los animales tratados con CPF a diferentes dosis e intervalos de tiempo se observó un aumento en la inmunoreactividad de GFAP, expresada por hipercromía somática y citoplasmática. En ellos, se apreció astrocitos con el citoplasma prominente alrededor del núcleo, e hipertrofia y acortamiento de los procesos primarios. Además, fue evidente el polimorfismo de los somas o cuerpos celulares (fusiformes, ovales y/o redondeados) y una disminución en la expresión proteica de las proyecciones secundarias. Morfología característica de la activación de las células astrogiales (Figura 10A).

Por otro lado, a través del estudio morfométrico se pudo corroborar estadísticamente que la longitud de los astrocitos aumento significativamente en los animales tratados con la dosis de 114 µg/Kg durante 4 semanas respecto de los demás tratamientos incluidos los controles (p=0,001) (Figura 10B, Tabla 3).

En cuanto al área de cada astrocito protoplásmico, se observó un aumento significativo en todos los tratamientos a los cuales se les administro CPF respecto a los controles (p=0,001); además se observaron diferencias significativas entre el T2 y el T3, diferente dosis y tiempo de exposición (p=0,016) (Figura 10B).

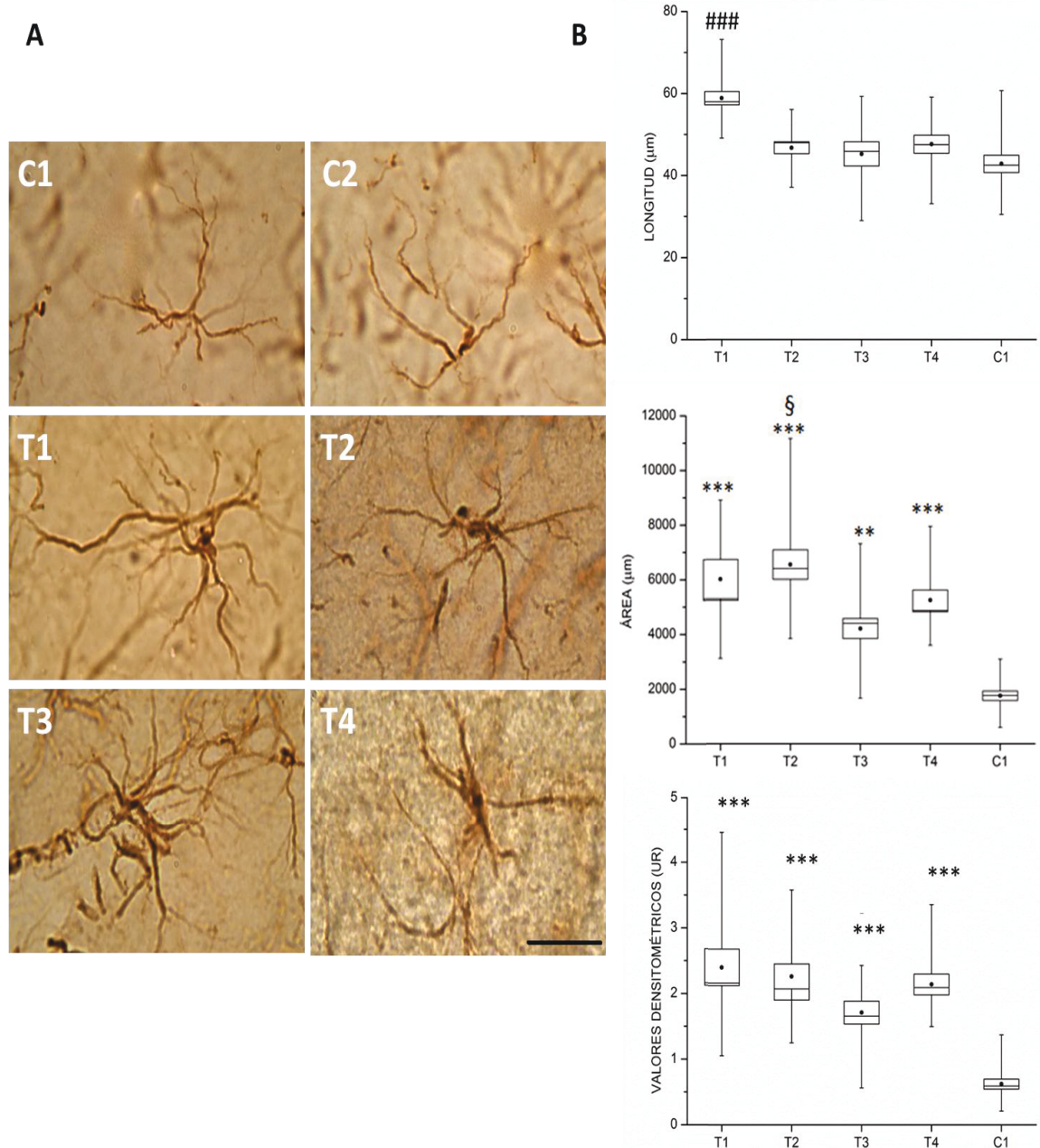
Finalmente la densidad de cada astrocito también aumento en los animales tratados con CPF respecto a los grupos control, obteniendo diferencias estadísticamente significativas con un valor p=0,001 (Figura 10B).

Tabla 3. Longitud de los astrocitos protoplásmicos y fibrosos en zona hipocampal CA1 y ZPV tras la exposición a CPF*

	TRATAMIENTOS				CONTROLES	
	T1	T2	T3	T4	C1	C2
HIPOCAMPO CA1	58,85 ±6,30	46,75 ±5,66	45,24 ±11,45	47,61 ±8,56	41,28 ±6,68	38,93 ±5,08
ZPV	46,75 ±5,66	42,18 ±8,93	33,74 ±6,74	27,94 ±7,68	40,45 ±5,47	38,06 ±9,89

*Tabla de datos expresando la media y la desviación estándar de las longitudes de todos los astrocitos (n=15/zona/grupo).

Figura 11. Cambios morfológicos de las células astrogliales en la zona hipocampal CA1 causados por CPF*



Fuente: Autor.

*Cambios morfológicos de astrocitos protoplásmicos reactivos en hipocampo CA1. (A) microfotografías que muestran astrocitos normales de animales control (C1 y C2). Astrocitos reactivos de animales tratados durante 4 semanas de exposición con CPF a posologías de 114 µg/Kg y 228 µg/Kg respectivamente (T1,T2) y 8 semanas de exposición a iguales dosis (T3,T4). Grupos tratados n=3; Grupos controles n=2. Bregma -2.64. Barra de escala=20 µm. 100X. (B) salidas estadísticas de las variables evaluadas en astrocitos individuales. **p < 0.01, *** p < 0.001 vs. Control; § (T2 vs. T3 p< 0.05); ### p<0.001 (T1 vs. T2, T3, T4 y C1).

4.5. CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LOS ASTROCITOS FIBROSOS DE LA ZPV POR EFECTO DEL CPF

En la ZPV los astrocitos fibrosos del grupo control mostraron una morfología delgada con poca inmunoreactividad del marcador GFAP y soma fusiforme. Los astrocitos fibrosos exhibieron pocas proyecciones primarias de forma delgada y no se evidenciaron proyecciones secundarias. (Figura 11A). Contrario ocurrió en los animales a los que se les administró CPF los cuales mostraron unos astrocitos fibrosos hiperreactivos, evidenciando hipertrofia de los procesos o proyecciones primarias y somas polimórficos. Asimismo, en los tratamientos a 8 semanas en cualquiera de las dosis se observó fragmentación de los procesos y desorganización celular (astrocitos agolpados en determinadas regiones), tal y como se aprecia en la figura 11A.

Estadísticamente estos cambios en los astrocitos fibrosos fueron evidentes al medir la variable longitud, debido que los animales tratados con la dosis de 114 $\mu\text{g/Kg}$ a 4 semanas, aumentaron significativamente el tamaño de los astrocitos mostrando diferencias con los demás tratamientos y el control ($p=0,001$); caso contrario sucedió con los animales tratados con la dosis de 228 $\mu\text{g/Kg}$ a 8 semanas (T4) que presentaron una marcada disminución en la longitud de los astrocitos obteniéndose diferencias estadísticamente significativas frente al T2 ($p=0,001$) y al control ($p=0,005$). También se obtuvieron diferencias entre el T2 y el T3 con diferentes dosis y tiempos de exposición ($p=0,015$) (Figura 11B, Tabla 3).

Por otro lado, los animales tratados con la dosis de 114 $\mu\text{g/Kg}$ a 4 semanas, presentaron un aumento en el área de los astrocitos fibrosos con diferencias estadísticamente significativas en relación al T4 ($p=0,011$) y al control ($p=0,002$). Igualmente, los animales tratados con la dosis de 228 $\mu\text{g/Kg}$ a 4 semanas exhibieron un aumento en la reactividad con diferencias significativas en relación al T4 ($p=0,005$) y al control ($p=0,001$). (Figura 11B)

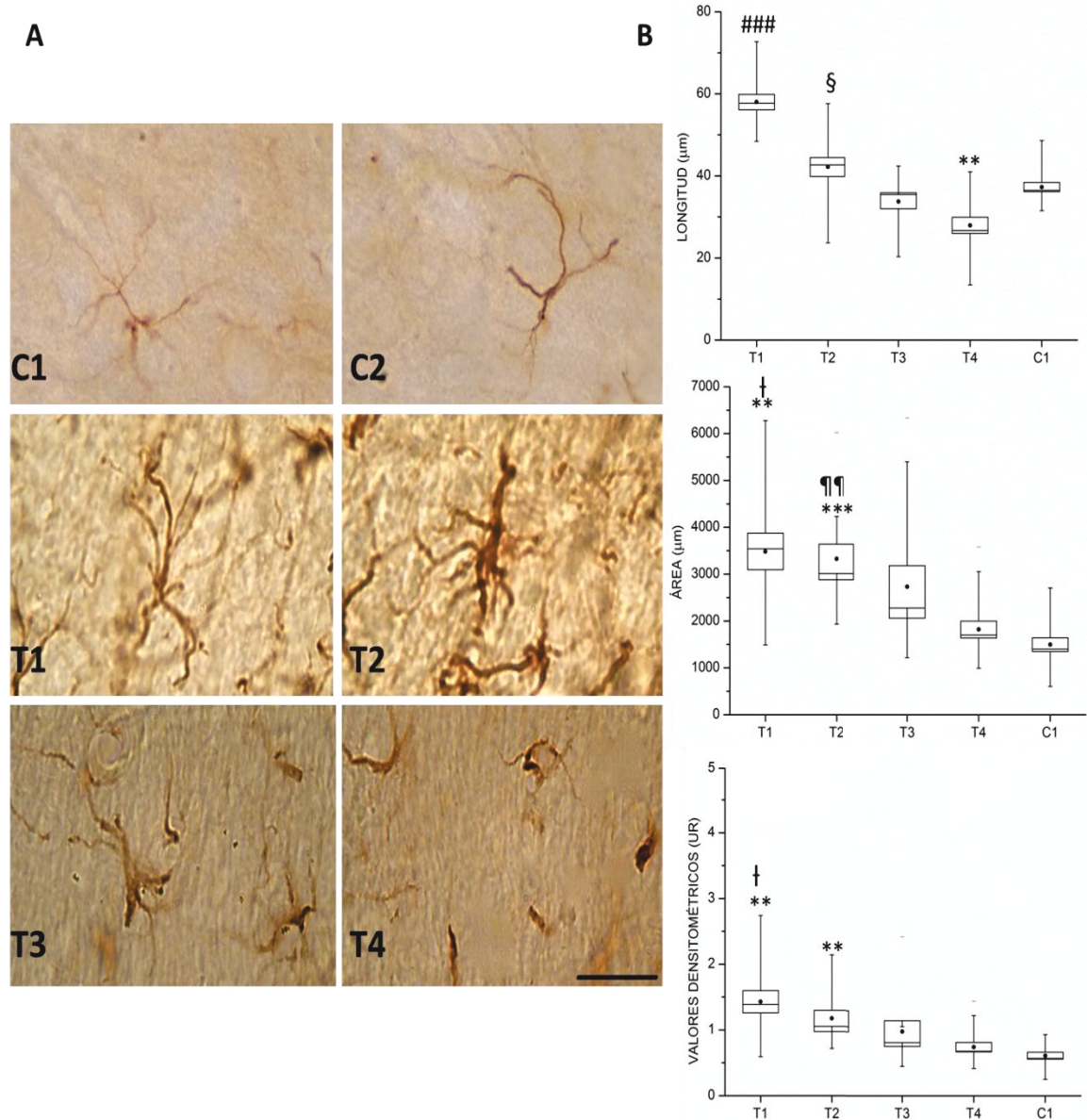
En cuanto a la densidad individual relativa hubo un aumento significativo en los astrocitos fibrosos de los animales tratados a 4 semanas respecto de los del grupo control ($p=0,005$). Además, los animales del T1 (114 $\mu\text{g/Kg}$ p.v. a 4 semanas) presentaron diferencias estadísticamente significativas con el T4 ($p=0,015$). (Figura 11B).

4.6. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE CPF SOBRE LA POBLACIÓN NEURONAL EN ENCÉFALO.

No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto a la densidad neuronal, a ninguna de las dosis (114 $\mu\text{g/Kg}$ y 228 $\mu\text{g/Kg}$) y tiempos de exposición (4 y 8 semanas) al CPF en corteza, hipocampo ni cuerpo estriado, realizada con la tinción de Nissl con azul de toluidina; aunque no se presenta la imagen a color se muestran los cortes representativos de las imágenes

procesadas en contraste de blancos y negros obtenida con el software para procesamiento de imágenes Fiji (Figura 12).

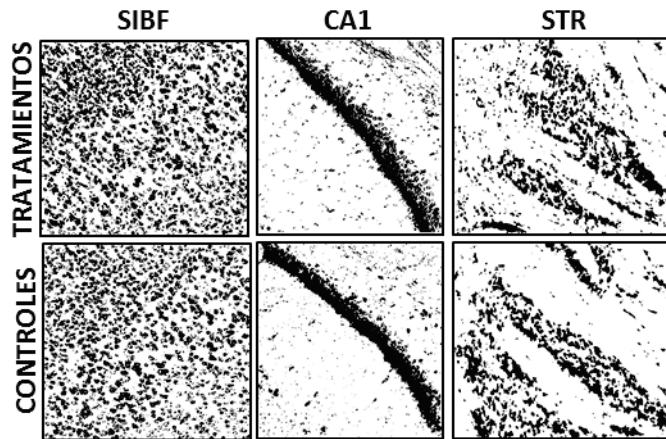
Figura 12. Cambios morfológicos de los astrocitos fibrosos en la ZPV ocasionados por la administración de CPF*



Fuente: Autor.

*Cambios morfológicos de astrocitos fibrosos en ZPV. (A) microfotografías que muestran astrocitos normales de animales control (C1 y C2) y astrocitos reactivos de animales tratados con CPF durante 4 semanas de exposición a posologías de 114 µg/Kg y 228 µg/Kg respectivamente (T1,T2) y 8 semanas de exposición a iguales dosis (T3,T4). Grupos tratados n=3; Grupos controles n=2. Bregma -2.64. Barra de escala=20 µm. 100X. (B) salidas estadísticas de las variables evaluadas en astrocitos individuales. **p < 0,01, *** p < 0,001 vs. Control; § (T2 vs. T3 p < 0,05); ### p < 0,001 (T1 vs. T2, T3, T4 y C1); † p < 0,05 (T1 vs. T4); ¶¶ p < 0,01 (T2 vs. T4).

Figura 13. Densidad neuronal en tres segmentos encefálicos*



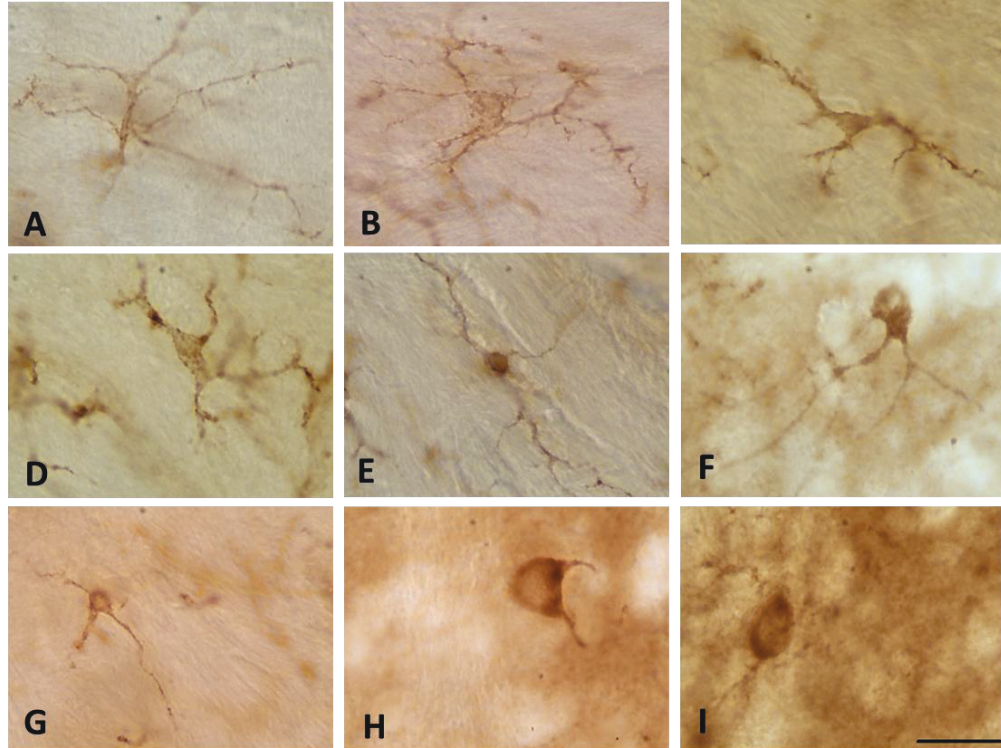
Fuente: Autor.

* Densidades relativas en contraste de negros de la tinción de Nissl. El CPF no redujo la población neuronal en corteza somatosensorial (SIBF), hipocampo CA1 y estriado (STR). Cortes representativos de animales tratados con CPF y sus respectivos controles. Grupos tratados n=3, grupos control n=2. Bregma - 2,64.10X.

4.7. RESPUESTA DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES POR EFECTO DEL CPF

En los animales de los grupos control las células microgliales presentaron una morfología ramificada, en la que se diferenció un soma denso, pequeño y alargado o en forma de vástago; además varios procesos largos y delgados con protrusiones (bulbos o abultamientos) digitiformes, dispersos en todas las direcciones (Figura 13A). Ésta forma ramificada se mantuvo en la mayoría de los grupos tratados con CPF; sin embargo, se evidenció activación microglial caracterizada por hiperreactividad del marcador OX42, y morfología variada de la microglía. Dichos cambios morfológicos fueron registrados con base en el trabajo publicado por Jonas et al (2012), en el cual se reconoce un primer estado de activación con incremento en el tamaño del soma y los procesos comienzan a retraerse (Figura 13B); segundo, sigue aumentando el tamaño del soma los procesos se retraen y se tornan gruesos (Figura 13 C,D); tercero, a medida que se retraen los procesos antiguos emergen unos nuevos, estos nuevos procesos se dirigen hacia un lado y la célula comienza a orientarse hacia el sitio del daño (Figura 13 E,F); cuarto, todos los largos procesos se han retraído y solo permanecen uno o dos gruesos (Figura 13 G,H); sexto, microglia se encuentra completamente activada y presenta una apariencia de macrófago, la cual presentaba aumento significativo del tamaño del soma y ausencia de procesos (Figura 13 I).

Figura 14. Células microgliales activadas por la administración de CPF*



Fuente: Autor.

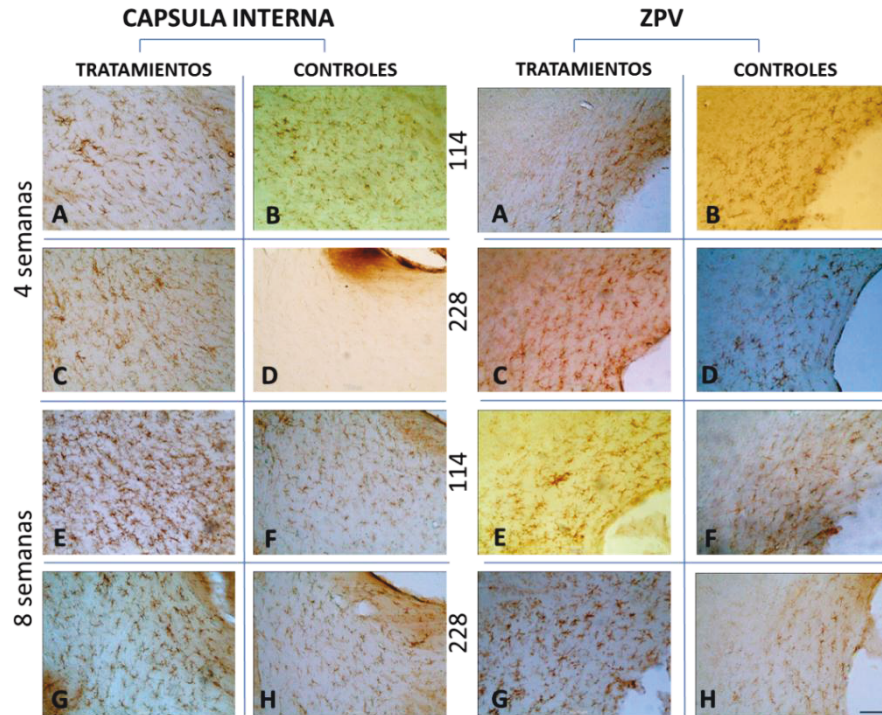
*Cambios morfológicos exhibidos por la microglía a medida que se activa en animales tratados con CPF. (A) microglía animal control (B) aumento del cuerpo celular (C, D) pérdida de la cantidad y longitud de los procesos (E, F) nuevos procesos delgados orientados en la dirección del daño (G,H) retracción de los procesos, permaneciendo uno o dos gruesos y cortos (I) microglía completamente activada con apariencia de macrófago. Barra de escala = 20 μ m. 100X

4.8. INMUNORREACTIVIDAD MICROGLIAL EN SUSTANCIA BLANCA ENCEFÁLICA LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A CPF

En la capsula interna y ZPV se observa un incremento de la inmunorreactividad del marcador OX42 comparado con el grupo control. (Figura 14).

Luego del análisis estadístico se demostró que en la capsula interna el CPF indujo la respuesta microglial aún desde las 4 semanas a dosis bajas; sin embargo, el mayor efecto se observó a 8 semanas de tratamiento mostrando diferencias estadísticamente significativas con relación al grupo control. ($p=0,005$). Igualmente, en la ZPV se evidenció hiperreactividad de la microglía en los tratamientos a 8 semanas de exposición en las dos dosis empleadas, comparado con el grupo control. ($p=0,001$); no obstante, en ésta zona se evidenció una muy baja reactividad en los animales tratados con 114 μ g/Kg a 4 semanas de exposición, con presencia de células microgliales de aspecto ameboides y muy poca microglía ramificada, disminuyendo de esta forma la densitometría (Figura 15).

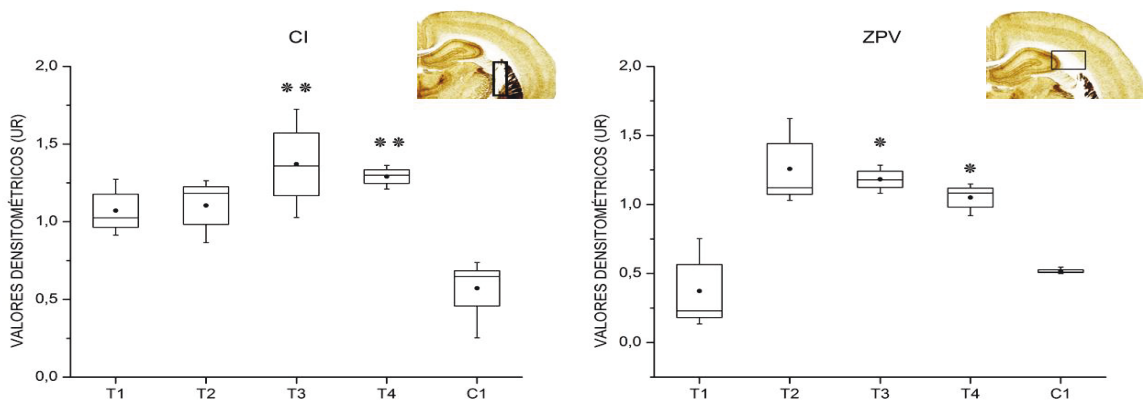
Figura 15. Inmunorreactividad microglial como respuesta a la administración de CPF en sustancia blanca encefálica.*



Fuente: Autor.

*Inmunohistoquímica del marcador de microglía CD11b (OX42). Cortes coronales representativos de animales tratados con CPF a 114 µg/Kg (A, E,) y 228 µg/Kg (C, G,) y sus respectivos controles (B,D Y F,H) en la CI y la ZPV. Grupos tratados n=3; Grupos controles n=2. Bregma -2.64. Barra de escala=100µm. 10X.

Figura 16. Reactividad de las células microgliales producida por el CPF en dos segmentos encefálicos*

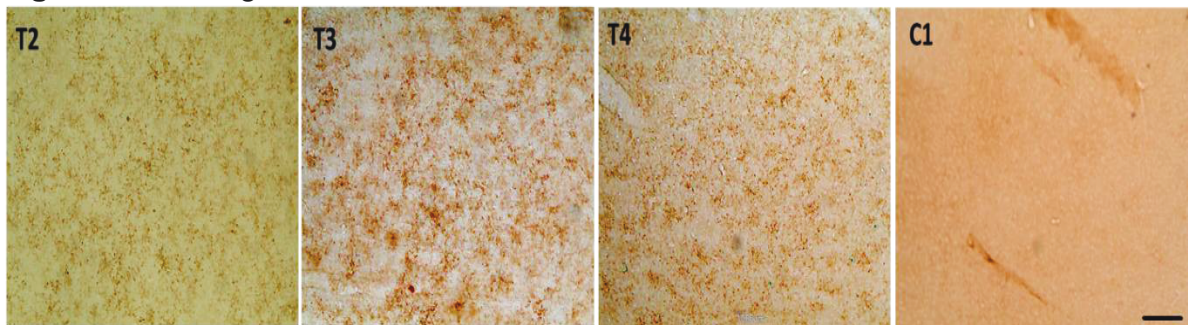


Fuente: Autor.

*Valores densitométricos en unidades relativas para el marcador de microglía OX42 en CI y ZPV. Grupos tratados con CPF durante 4 semanas de exposición a posologías de 114 µg/Kg y 228 µg/Kg respectivamente (T1, T2) y 8 semanas de exposición a iguales dosis (T3, T4); animales del grupo control (placebo= aceite de maíz). Grupos tratados n=3; Grupos controles n=2. *p< 0,05, **p<0,01 vs. Control.

De forma ocasional algunos animales tratados con CPF a ambas dosis y en los intervalos de tiempo establecidos presentaron microglía activada comparado con el grupo control en segmentos como corteza somatosensorial (Ver Figura 16) y zonas de frontera adyacentes al tercer ventrículo y a la corteza cingulada (Imágenes no mostradas).

Figura 17. Microglía activada en corteza somatosensorial*



Fuente: Autor.

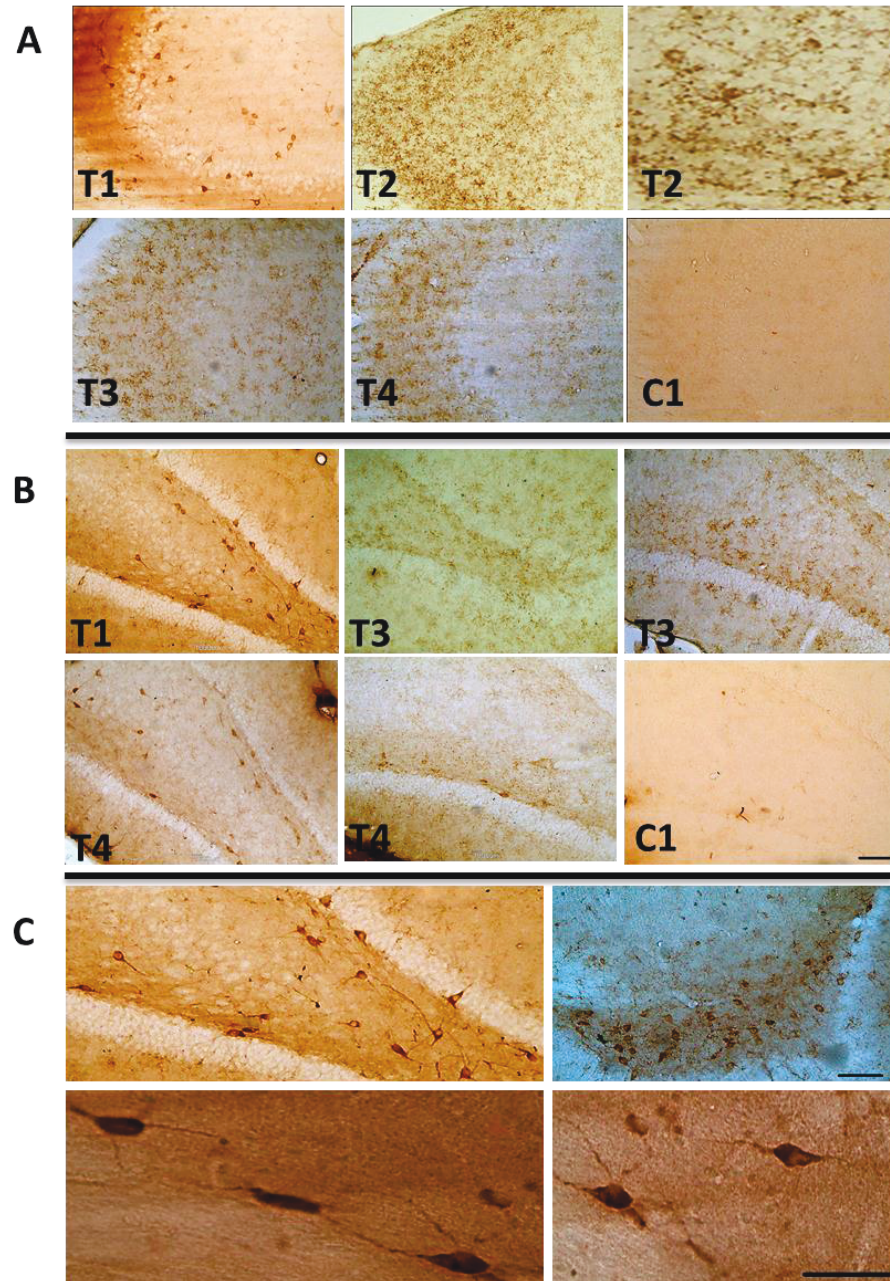
*Microglía hiperreactiva presente en capa 3 y 4 de la corteza somatosensorial, de animales tratados con CPF a 4 semanas con dosis de 228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (T2) Y a 8 semanas con dosis de 114 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ respectivamente (T3 Y T4) comparado con el grupo control, sin ser una constante en todas las replicas. Bregma - 2.64. Barra de escala=100 μm . 10 X.

Otros hallazgos encontrados en el presente estudio, corresponden a la microglía activada en las zonas CA2, CA3 y giro dentado del hipocampo. Esta microglía normalmente presenta una morfología puntiforme, sin embargo en algunos animales se identificó un cambio morfológico con apariencia ameboide. (Figura 17)

4.9. INMUNOREACTIVIDAD DE MBP EN ANIMALES TRATADOS CON CPF

En las tres zonas evaluadas (corteza somatosensorial, capsula interna y estriado) se observó un aumento de la expresión de la proteína base mielina en los animales tratados con CPF respecto del grupo control, siendo más evidente el efecto a medida que aumentó el tiempo de exposición y en las zonas que presentaban mayor distribución de sustancia blanca como es el caso de la capsula interna y el cuerpo estriado; además, en estas dos zonas fue evidente la presencia de formas anormales o aberrantes de la proteína, resultado que se presentó incluso en los tratamientos a 4 semanas, pero que fue más contundente en los tratamientos a 8 semanas (Figura 18).

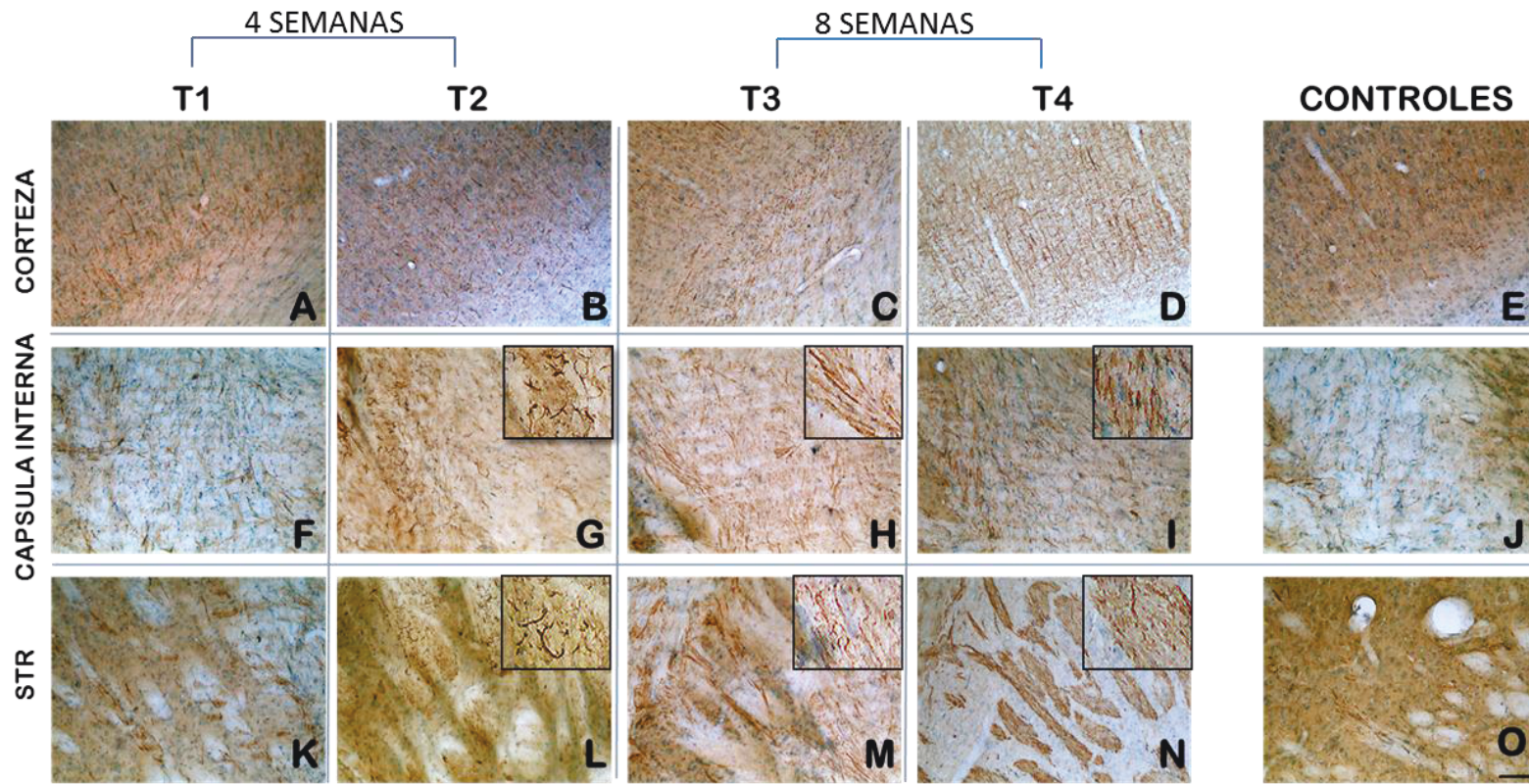
Figura 18. Microglía activada en diferentes áreas del hipocampo*



Fuente: Autor.

* Morfología exhibida por la microglía reactiva en hipocampo. (A) Microglía activada en zona CA2 Y CA3 de animales tratados a 4 semanas con dosis de 114 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ respectivamente (T1 y T2), 8 semanas de exposición a iguales dosis (T3, T4) y su respectivo control (B) microglía activada en giro dentado de animales tratados con iguales dosis e intervalos de tiempo de CPF y su respectivo control. Barra de escala=100 μm . 10X. (C) microglía ameboide en giro dentado. Imagen superior 10X. Barra de escala=100 μm . Imagen inferior 40X. Barra de escala = 50 μm .

Figura 19. Inmunorreactividad de la proteína base mielina (MBP) en diferentes cortes cerebrales de ratas tratadas con CPF a cuatro y ocho semanas*



Fuente: Autor.

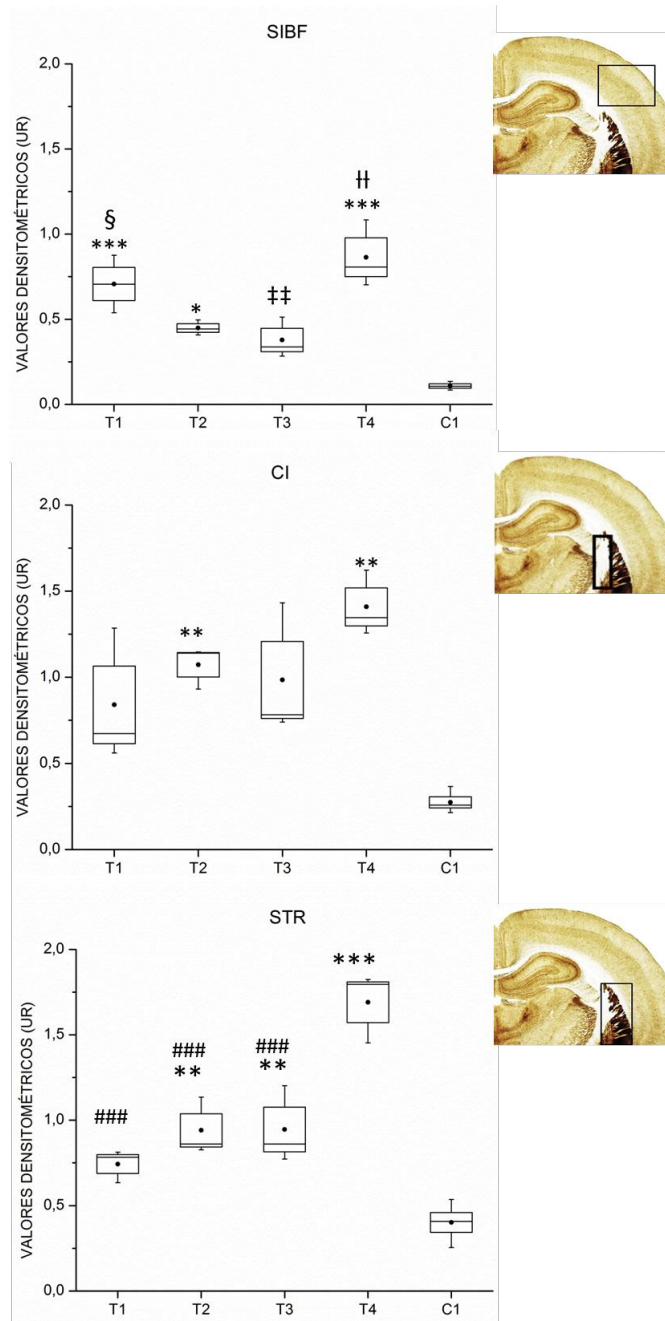
*reactividad de MBP por exposición a dos posologías de CPF (114 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) durante 4 y 8 semanas. Se aprecia un aumento en la densidad de la proteína de los animales tratados en relación a los controles. Cortes cerebrales representativos de animales tratados con CPF a 114 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (A,F,K y C,H,M) y 228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (B,G,L y D,I,N) y sus respectivos controles (E,J,O) en corteza somatosensorial, capsula interna y estriado lateral. Los recuadros muestran imágenes de formas aberrantes de la proteína. Grupos tratados n=3; grupos controles n=2. Barra de escala=100 μm . 10X.

A nivel de la corteza somatosensorial, la administración de CPF en todos los grupos tratados, incrementó la inmunorreactividad de la proteína base mielina (MBP) con relación a los controles, con diferencias estadísticas altamente significativas para los tratamientos T1 ($p=0,001$), T2 ($p=0,027$) y T4 ($p=0,001$) (Figura 17). Asimismo, los animales del T4 a los que se les administro la dosis más alta (228 $\mu\text{g/Kg}$) a 8 semanas, fueron los que presentaron mayor reactividad de MBP respecto al T2 ($p=0,012$) y T3 ($p=0,004$); además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con bajas dosis de CPF (114 $\mu\text{g/Kg}$) a 4 semanas T1 y 8 semanas T2 ($p=0,049$) (Figura 19).

En el cuerpo estriado el T1 no evidenció un marcaje importante de MBP, al aumentar la dosis y el tiempo de exposición, se presentó un incremento en la reactividad de la proteína obteniendo diferencias significativas con respecto al grupo control (T2 $p=0,010$, T3 $p=0,009$ y T4 $p=0,001$). Los animales tratados con la dosis de 228 $\mu\text{g/Kg}$ a 8 semanas (T4) presentaron gran reactividad con diferencias significativas en relación a los demás tratamientos ($p=0,001$) (Figura 19).

Por otro lado, en capsula interna se observó un aumento del inmunomarcaje de MBP, que se hizo más evidente en los tratamientos con la dosis de 228 $\mu\text{g/Kg}$ (T2 y T4), que difieren estadísticamente del grupo control (T2 $p=0,009$ y T4 $p=0,019$) (Figura 19).

Figura 20. Reactividad de la proteína base de mielina (MBP) modulada por la administración de CPF en encéfalo*



Fuente: Autor.

*Valores densitométricos en unidades relativas de la inmunorreactividad de la proteína base mielina en corteza somatosensorial (SIBF), cápsula interna (CI) y cuerpo estriado (STR). Grupos tratados con CPF a posologías de 114 µg/Kg (T1) y 228 µg/Kg (T2) durante cuatro semanas y ocho semanas de exposición a iguales posologías respectivamente (T3,T4). Animales del grupo control (placebo= aceite de maíz). Grupos tratados n=3; Grupos controles n=2. *p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001 vs. Control; § (T1 vs. T3 p< 0,05); ## (T4 vs. T3 p< 0,01); # (T4 vs. T2 p< 0,01); ### p<0,001 vs. T4

5. DISCUSIÓN

5.1. EL CPF NO AFECTA LA GANANCIA DE PESO CORPORAL A DOSIS SUBLETALES Y EXPOSICIÓN SUBCRÓNICA

En la presente investigación no se evidenciaron signos clínicos de toxicidad aguda o síndrome colinérgico debido al manejo de dosis subletales para la inducción de neurotoxicidad subcrónica, estas dosis se encuentran aproximadamente 20 veces por debajo de lo reportado por algunos autores (Marty et al., 2012; Yan et al., 2012). Por otro lado, no se alteró el comportamiento del consumo de alimento ni la ganancia de peso corporal, quizá por el manejo de dosis bajas, los intervalos de administración y el tiempo de duración del experimento, no influyeron en el metabolismo energético de los animales, permitiendo de esta manera que no hubiese pérdida de peso (Tabla 2). Si bien es cierto que no se han reportado estudios crónicos con este organofosforado, se ha documentado pérdida de peso en estudios de toxicidad aguda con CPF en ratones, asociada con signos colinérgicos (Lim, Tay, Nadarajah, & Mitra, 2011).

5.2. EL CPF A DOSIS SUBLETALES Y SUBCRÓNICAS NO AFECTA LA POBLACIÓN NEURONAL EN RATAS

La administración semanal de CPF a posologías de 114 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y 228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ durante 4 y 8 semanas no produjo cambios en la densidad neuronal en corteza, hipocampo ni cuerpo estriado. Resultados que pueden ser comparables con el estudio de neurotoxicidad con CPF realizado por Mitra, Nadarajah, & Siong, (2009), quienes tampoco encontraron reducción significativa del recuento neuronal en tres zonas del hipocampo (CA1, CA2, CA3); sin embargo hallaron disolución de los gránulos de Nissl, discontinuidad en la membrana celular, picnosis en algunas células, efecto que fue dependiente de la concentración.

5.3. EL CPF A DOSIS SUBLETALES Y SUBCRÓNICAS AFECTA LA ACTIVIDAD ASTROCITARIA ENCEFÁLICA EN RATAS

En el presente trabajo se pudo demostrar que la administración semanal de CPF por 4 y 8 semanas, incrementa la inmunorreactividad de GFAP en la zona CA1 del hipocampo; sin embargo, la densidad más alta se registró a la dosis de 228 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, lo cual sugiere un efecto dosis-dependiente. A pesar de que no se han referenciado trabajos similares con CPF, Lim et al (2011) reportan aumento en la reactividad de GFAP en la región hipocampal luego de la exposición aguda a CPF. Por otro lado, se ha documentado un incremento importante en la expresión de GFAP luego de la exposición de astrocitos a diversos componentes tóxicos como plomo (Sansar, Ahboucha, & Gamrani, 2011), acetato de plomo (Luthman et al., 1991), trimetiltin (Harry et al., 2002), alcaloides piperidínicos (Hughes et al.,

2006; Silva et al., 2007), flavonoides derivados de plantas (Silva et al., in press), entre otros.

El incremento en la inmunorreactividad de GFAP obtenido en el presente estudio podría deberse a una gliosis reactiva, en respuesta al daño causado por la exposición subcrónica al CPF (Sofroniew, 2010). La activación astrocitaria evidenciada puede estar relacionada con un aumento en la captación de glutamato extracelular, reduciendo de esta forma la excitotoxicidad (Hamby & Sofroniew, 2011); sin embargo, la hiperreactividad astrocitaria por tiempo prolongado observada en la zona CA1 hipocampal, puede sugerir que este sitio es susceptible a un proceso de cicatrización glial, perjudicial para la interconexión neuronal entre segmentos encefálicos y para la remodelación tisular durante los eventos de plasticidad (Nair et al., 2010), resultados comparables con lo reportado por (Collombet et al., 2007) quienes demostraron formación de cicatriz glial detectable después de 60 días luego de neurotoxicidad por SOMAN. Al igual que Lim et al (2011), también se observó un aumento en la longitud, densidad y área celular astrocitaria, que podrían explicarse por la hipertrofia y condensación del cuerpo celular e incremento y retracción de los procesos, morfología característica de la activación de las células astrogiales (Figura 4) (Middeldorp & Hol, 2011).

En la ZPV, se evidenció incremento en la inmunorreactividad de GFAP y cambios fenotípicos en los astrocitos fibrosos de los individuos tratados con CPF a 4 semanas; sin embargo, en los animales tratados a 8 semanas se evidenció una disminución marcada en la reactividad, además de formas astrocitarias aberrantes en las que solo se diferenciaba el citoplasma o prolongaciones del mismo (Figura 5). Por tal motivo, se podría considerar que en esta zona de sustancia blanca la respuesta astrocitaria es tiempo-dependiente. Resultados similares obtuvieron Suárez et al (1999), quienes reportaron degeneración en los procesos de los astrocitos y reducción del 50% en el número de astrocitos viables en un modelo de neurotoxicidad por aluminio, lo cual sugiere que podría deberse a la fragmentación de DNA y a células que experimentan procesos de apoptosis. También se ha evidenciado disminución en el tamaño de los astrocitos en sustancia blanca subcortical en isquemia cerebral (Sullivan, Björkman, Miller, Colditz, & Pow, 2010) y condensación de la cromatina, fragmentación y disrupción de GFAP, por dehidromonocrotalina (Barreto et al., 2008).

Por lo anterior, se puede inferir que los astrocitos permanecen viables y funcionalmente activos durante las primeras etapas de intoxicación, pero se van degenerando con la progresión del daño neurotóxico (Pascual et al., 2000). Dicha degeneración puede estar relacionada con clasmotodendrocis, un fenómeno en el cual los astrocitos sufren cambios degenerativos irreversibles que incluyen hinchazón, desintegración y fragmentación de los procesos y vacuolización de los cuerpos celulares; debido a que pueden llegar a estar tan acidóticos, por el intento de regular las concentraciones de glutamato e iones, llevando a procesos

posteriores de autofagia (Hulse, R, Winterfield, Kunkler, & Kraig, 2001; Ryu et al., 2011)

5.4. LA HIPERREACTIVIDAD MICROGLIAL DEPENDE DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN A CPF

La administración semanal de CPF a dosis de 114 µg/Kg y 228 µg/Kg induce una respuesta microglial aún a 4 semanas de tratamiento, tanto en cápsula interna como en ZPV; sin embargo, los grupos tratados a 8 semanas fueron los que registraron la densidad más alta en la inmunorreactividad de OX42, lo cual sugiere un efecto tiempo-dependiente. Resultados similares muestran estudios previos como los reportados por Wang et al (2011) quienes encontraron un incremento en el inmunomarcaje de OX42 en ratones expuestos por 40 días a nanopartículas de óxido férrico (Fe₂O₃). Igualmente, Pott et al (2009) observaron un aumento de las células microgliales luego de inducir procesos de desmielinización durante 8 semanas con cuprizona. Si bien es cierto que no se han reportado estudios crónicos con CPF, si se ha documentado inmunorreactividad de OX42 en intoxicaciones agudas con otro tipo de organofosforados (Collombet, 2005; Zimmer, Ennis, & Shipley, 1997).

El aumento en la inmunorreactividad de OX42 puede estar relacionado con tres eventos principales que ocurren cuando la microglía se activa, tales como: a) incremento en la expresión de receptores de superficie, entre los que podemos mencionar el receptor 3 del complemento (CR3/MAC1), receptor scavenger AI YII (SRAI YII) que median la fagocitosis de mielina después del daño axonal (Rotshenker, 2003), siendo el CR3 el que se expresa en un mayor porcentaje; además, media otro tipo de actividades como producción de citoquinas y citotoxicidad (Yefenof, 2000); b) rápida proliferación celular, mediada por la vía MAP quinasas, que se inicia por factores de crecimiento (Neuroregulin1) (Calvo et al., 2011) y por factores estimulantes de colonia (M-CSF, GM-CSF) liberados por las neuronas y los astrocitos (Zhang et al., 2009); c) cambios morfológicos exhibidos por estas células (Block et al., 2004; Kettenmann et al., 2011). En el presente estudio los cambios morfológicos evidenciados por la microglía (a pesar de mantener su morfología ramificada) fueron: acortamiento, engrosamiento y disminución en la cantidad de los procesos, aumento en el volumen perinuclear y presencia de numerosas protrusiones en ZPV y capsula interna; además, en algunos casos se encontró microglía activada en zonas como corteza, hipocampo y estriado; e incluso formas ameboides; resultados consistentes con lo publicado por Wang et al (2011).

La activación de la microglía, podría estar relacionada con daño directo sobre los oligodendrocitos y las neuronas, por posibles efectos de excitotoxicidad e incluso por alteraciones en la mielina (Kaur & Ling, 2009). Se puede sugerir que la microglía reduce el daño y favorece la supervivencia de células adyacentes (oligodendrocitos y neuronas), por su función inicial como célula presentadora de

antígenos y su actividad fagocítica al remover restos celulares, mielina, proteína aberrante, lípidos o sustancias extrañas (Kraft & Harry, 2011; Luo & Chen, 2012); sin embargo, se ha mencionado que el tiempo e intensidad en la activación de la microglía son componentes cruciales en el resultado del daño, ya que si son bien controlados por factores internos se mantiene el rol neuroprotectivo de éstas células (Luo & Chen, 2012). No obstante, se ha reportado que la microglía activada puede ejercer efectos deletéreos sobre las neuronas y los oligodendrocitos a través de la producción y liberación de varias citoquinas proinflamatorias y neurotóxicas, además de liberación de radicales libres (Pott et al., 2009). En el presente trabajo, el estímulo neurotóxico permanente inducido por CPF posiblemente sea el responsable de una actividad microglial sostenida siendo factible que ésta se vea modificada en la medida que se suspenda el agente inductor.

5.5. LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR CPF EXACERBA LA INMUNORREACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA BASE MIELINA (MBP)

En comparación con el grupo control, la administración semanal de CPF a dosis de 114 µg/Kg y 228 µg/Kg incrementa la inmunorreactividad de MBP en todos los grupos tratados, tanto en capsula interna como en corteza y estriado. Aunque lo anterior sugiere un efecto que depende del tiempo y la concentración de CPF, la mayor inmunorreactividad se presentó en los animales sometidos a la dosis de 228 µg/Kg por 8 semanas y en las zonas con mayor porcentaje de sustancia blanca como capsula interna y estriado. Resultados similares obtuvieron El-fawal & McCain (2008) evaluando anti-MBP sérico en un modelo de OPIDN con fenil-saligenil fosfato. Por el contrario, otros autores han evidenciado disminución de MBP en diferentes modelos de desmielinización con diferentes agentes tóxicos como cuprizona (Pott et al., 2009; Steelman, Thompson, & Li, 2012) o lisolecitina (Mozafari et al., 2010)

Se evidenció morfología aberrante de MBP, que condujo a la formación de estructuras desorganizadas con parches y distribución anómala de la proteína. Este fenómeno se presenció en la dosis 228 µg/Kg de CPF a 4 semanas de tratamiento, pero fue más contundente en los grupos expuestos a 8 semanas de tratamiento. Estos datos son consistentes con lo publicado por Millet, Marder, & Pasquini (2012), quienes observaron procesos de mielinización ectópica y aberrante en un modelo de desmielinización con cuprizona.

Cabe resaltar que diversos estudios relacionados con desmielinización, han determinado que este proceso se produce luego de la tercer a cuarta semana de inducción de la neurotoxicidad (Gudi et al., 2009; Millet et al., 2012; Pott et al., 2009) y que la remielinización puede comenzar aún dentro de uno o dos meses después de la desmielinización activa (Hanafy & Sloane, 2011); por lo cual, se podría sugerir que el aumento en la inmunorreactividad de MBP y las formas de mielina aberrante exhibidas en el presente estudio, pueden estar asociadas con

mecanismos compensatorios del organismo por los procesos de desmielinización-remielinización que se pueden estar llevando a cabo por la neurotoxicidad inducida con el CPF. No obstante, los procesos se podrían estar presentando de manera acelerada mediante la síntesis de proteína de forma exacerbada y sin obtener una mielina de morfología y distribución normal. Incluso, se ha documentado un aumento en la densidad de las mitocondrias en procesos de desmielinización como una respuesta adaptativa al aumento en la demanda energética (Millet et al., 2012).

Ahora bien, estudios recientes sugieren que la exposición a CPF puede desencadenar una serie de eventos, que también podrían contribuir a la formación de estructuras aberrantes en la mielina por bloqueo en alguna fase del proceso de remielinización (Hanafy & Sloane, 2011); entre ellos se encuentran: alteración de la función celular, viabilidad y genes de expresión de los oligodendrocitos (Slotkin & Seidler, 2007), alteraciones en la expresión de MBP (Garcia, Seidler, & Slotkin, 2002), reducción de los niveles de mRNA de la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) (Betancourt, Burgess, & Carr, 2006) e inhibición de la síntesis de DNA en oligodendrocitos indiferenciados (Garcia et al., 2002).

Del mismo modo, se ha reportado aumento en los niveles de expresión del mRNA para MBP, durante la fase de remielinización alrededor de las áreas desmielinizadas, que se ha relacionado con el aumento en el número de oligodendrocitos mielinizantes y con la edad de éstas células, dado que los oligodendrocitos más jóvenes reflejan mayores niveles de expresión que las células de la sustancia blanca intacta (Mozafari et al., 2010). Igualmente, este aumento en el mRNA para MBP ha sido reportado por otros autores (Nagasato, Farris, Dubois-Dalcq, & Voskuhl, 1997; Sim, Hinks, & Franklin, 2000). Dichos reportes del aumento en el mRNA para MBP se podrían relacionar con el aumento significativo que observamos con el marcador inmunohistoquímico anti-MBP.

5.6. HIPÓTESIS DE LA DESMIELINIZACIÓN INDUCIDA POR EL CPF Y LA IMPLICACIÓN DE LA REACTIVIDAD CELULAR COMO MECANISMO DE REPARACIÓN DEL SNC

Se presume que de una a tres semanas luego de la intoxicación con un organofosforado en este caso el CPF se ha producido la inhibición de la NTE y la consecuente formación de un complejo enzima-organofosforado muy estable, producto de la reacción de envejecimiento enzimático (“aging”), reacción indispensable para que se produzca la OPIDN (Emerick et al., 2012).

Se ha documentado que la OPIDN causa degeneración axonal y procesos de desmielinización, los cuales se podrían explicar principalmente por tres razones: la primera, que la inhibición de la NTE altera la regulación normal de los canales de calcio, presentando un aumento del calcio intracelular y activando la proteasa neutral activada por el calcio (CANP) o calpaínas, las cuales promueven la

digestión proteica en el axón terminal. Segundo, la NTE regula los fosfolípidos y al ser inhibida por acción del OP se incrementan los niveles de lisofosfatidilcolina en la membrana celular produciéndose citotoxicidad, lo cual está asociado con desmielinización (Vose et al., 2008) y tercero la inhibición en la NTE lleva a un incremento de las proteínas quinasas dependientes de calcio/calmodulina ($\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$ quinasas), lo cual produce fosforilación aberrante de las proteínas del citoesqueleto; por lo anterior, se presentaría una desintegración secundaria de las vainas de mielina y procesos de desmielinización (Chang & Wu, 2010).

Por otro lado, después de 3 semanas de toxicidad inducida, se ha reportado que se produce desmielinización (Gudi et al., 2009; Millet et al., 2012; Pott et al., 2009) y a partir del mes se empiezan a llevar a cabo mecanismos de reparación ó remielinización (Hanafy & Sloane, 2011)

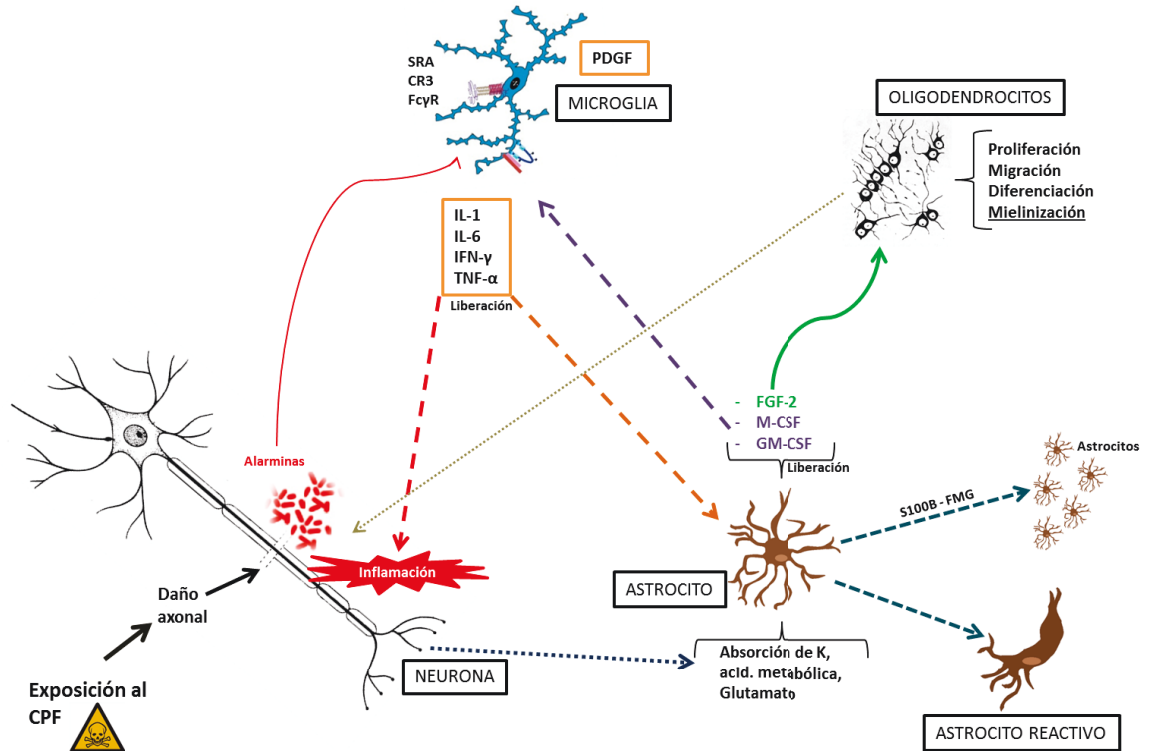
El daño en la mielina y en los axones activa moléculas denominadas alarminas (moléculas de tejidos dañados, como fragmentos de mielina, células muertas, productos denaturados, etc), que a su vez activan la microglia, la cual, presenta receptores específicos para esas alarminas. La microglia migra al sitio del daño y cumple la función de fagocitar y limpiar debris de mielina en pro de la reparación; además, libera citoquinas (IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α) que contribuyen en el proceso inflamatorio y a la proliferación de astrocitos. Se ha demostrado que la respuesta inflamatoria incrementa la remielinización, además, citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF- α promueven la proliferación de OPCs y mantienen elevada la densidad de oligodendrocitos en las áreas lesionadas, dado que su maduración parece estar influenciada significativamente por el ambiente inflamatorio local (Bruce et al., 2010). Por otra parte, la microglia libera factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) potente regulador de la respuesta proliferativa seguida de la desmielinización y actúa como célula presentadora de antígenos para la infiltración de linfocitos-T y macrófagos

Por su parte, los astrocitos en el sitio del daño desempeñan funciones claves para la homeostasis del medio extracelular, absorbiendo iones como K^+ , regulando la acidosis metabólica y amortiguando neurotransmisores como el glutamato; de esta manera, favorecen la supervivencia tanto de las neuronas como de los oligodendrocitos, disminuyendo la excitotoxicidad. El astrocito a su vez libera factor 2 de crecimiento fibroblástico (FGF-2) el cual está implicado en la supervivencia, proliferación y migración de oligodendrocitos, que luego se diferencian e inician la reparación del daño, formando de nuevo las vainas de mielina, proceso denominado remielinización. Los astrocitos también liberan factores derivados por ellos mismo como la proteína S100B y el factor de maduración glial (FGM) que ayudan a su proliferación.

Finalmente, este mecanismo se efectúa en pro de reparar el daño y se podría indicar que es un proceso que demuestra retroalimentación, dado que una célula libera factores que estimula a la otra y así sucesivamente, pudiendo en un

momento dado tender a volverse redundante. En la figura 20 se plantea el posible mecanismo de desmielinización y reparación implicado en la neurotoxicidad inducida por el CPF.

Figura 21. Hipótesis de la desmielinización inducida por CPF y la implicación de la reactividad celular como mecanismo de reparación del SNC



Fuente: Autor.

De acuerdo con los complejos mecanismos de respuesta celular que se suscitan frente a sustancias con potencial neurotóxico, se puede inferir que la exposición al CPF por un tiempo inferior a 60 días, a dosis subletales múltiples semanales, fijadas para los experimentos de la presente investigación, induce una respuesta celular (astrocitaria y microglial) acorde al compromiso de éstas células con el mantenimiento de la homeostasis cerebral. De igual forma, los cambios histológicos y de respuesta inmunológica, soportan el efecto desmielinizante de los OPs tipo oxón como el CPF y el efecto remielinizante consecuente al proceso reparativo frente a la injuria; sin embargo, no se apreció pérdida neuronal posiblemente debido a todos los mecanismos celulares de reparación tisular activados a partir de la neurotoxicidad inducida por el CPF. Finalmente, puede ser posible que el CPF *per se* esté afectando directamente la estructura y la función de los astrocitos. Posteriores estudios de cronicidad por exposición a largo plazo, ayudarán a dilucidar el mecanismo fisiopatológico de las enfermedades desmielinizantes inducidas por este y otros tipos de agentes químicos.

6 CONCLUSIONES

6.1. Por medio del estudio histoquímico se pudo evidenciar que el CPF proporcionado a las dosis y en los intervalos de administración utilizados, a 4 y 8 semanas no altera la densidad neuronal en corteza, hipocampo (CA1) y estriado.

6.2. El clorpirifós administrado a dosis subletales (114 µg/Kg y 228 µg/Kg) y de forma subcrónica (4 y 8 semanas) genera procesos de desmielinización, con un efecto tiempo y concentración dependiente, evidenciados por la subsecuente remielinización e inmunorreactividad de MBP.

6.3. La exposición subcrónica y a dosis subletales de CPF ocasiona cambios evidenciables en las células astrogliales y microgliales.

6.4. La administración de CPF a dosis subletales (114 µg/Kg y 228 µg/Kg) y de forma subcrónica (4 y 8 semanas) incrementa la reactividad astrocitaria en la zona hipocampal CA1, en tanto en la ZPV a 8 semanas de tratamiento redujo su densidad.

6.5. A 8 semanas de la administración del CPF a dosis subletales, se incrementa significativamente la reactividad microglial en ZPV y capsula interna (efecto tiempo-dependiente), como respuesta a la toxicidad inducida, al daño axonal y a las alteraciones en la mielina.

7. RECOMENDACIONES

Profundizar en la morfología y cuantificación de otras poblaciones celulares como células progenitoras de oligodendrocitos en los territorios lesionados.

Realizar estudios celulares de toxicidad crónica y el efecto a largo plazo del CPF.

Estudiar la expresión y activación de los receptores de superficie microglial (CR3/MAC1 y SRAI YII), las interleucinas (IL-1, IL-6) y otros factores (IFN- γ , TNF- α) implicados en inflamación, por efecto de la neurotoxicidad inducida por OPs.

Investigar mediante técnicas bioquímicas y de biología molecular las proteínas implicadas en la estructura de las vainas de mielina y sus rutas metabólicas de supervivencia y muerte, para determinar procesos de desmielinización o remielinización errónea causada por el CPF

Evaluar estos marcadores en otras enfermedades neuroinmunotxicológicas de carácter crónico.

REFERENCIAS

- Albrecht, P. J., Murtie, J. C., Ness, J. K., Redwine, J. M., Enterline, J. R., Armstrong, R. C., & Levison, S. W. (2003). Astrocytes produce CNTF during the remyelination phase of viral-induced spinal cord demyelination to stimulate FGF-2 production. *Neurobiology of Disease*, 13(2), 89–101. doi:10.1016/S0969-9961(03)00019-6
- Arquimbau, E. P. (2001). *Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas*. Universitat Jaume I de Castellón. Recuperado de <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/10403/pitarch.pdf;jsessionid=1D25F0C38902605C877BA43FD28E9E7C.tdx2?sequence=1>
- Asociación Colombiana de Neurología. (2001). *Neurotoxicología*. Exlibris E. Colombia.
- Barreto, R. A., Sousa, C. S., Silva, V. D. A., Silva, A. R., Veloso, E. S., Cunha, S. D., Costa, M. F. D., et al. (2008). Monocrotaline pyrrol is cytotoxic and alters the patterns of GFAP expression on astrocyte primary cultures. *Toxicology in Vitro*, 22, 1191–1197. doi:10.1016/j.tiv.2008.03.013
- Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews*, 81(2), 871–927. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274346>
- Betancourt, A. M., Burgess, S. C., & Carr, R. L. (2006). Effect of developmental exposure to chlorpyrifos on the expression of neurotrophin growth factors and cell-specific markers in neonatal rat brain. *Toxicological Sciences*, 92(2), 500–6. doi:10.1093/toxsci/kfl004
- Block, M. L., Wu, X., Pei, Z., Li, G., Wang, T., Qin, L., Wilson, B., et al. (2004). Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons: the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(13), 1618–20. doi:10.1096/fj.04-1945fje
- Bonilla, J., Peinado, J., Urdaneta, M., & Carrascal, E. (2000). *Informe nacional sobre el uso y manejo de plaguicidas en Colombia, tendiente a identificar y proponer alternativas para reducir el escurrimiento de plaguicidas al Mar Caribe*. Bogotá, Colombia.

- Bruce, C. C., Zhao, C., & Franklin, R. J. M. (2010). Remyelination - An effective means of neuroprotection. *Hormones and Behavior*, 57(1), 56–62. doi:10.1016/j.yhbeh.2009.06.004
- Calvo, M., Zhu, N., Grist, J., Ma, Z., Loeb, J. a, & Bennett, D. L. H. (2011). Following nerve injury neuregulin-1 drives microglial proliferation and neuropathic pain via the MEK/ERK pathway. *Glia*, 59(4), 554–68. doi:10.1002/glia.21124
- Carod Benedico, E. (2002). Insecticidas organofosforados. De la guerra química al riesgo laboral y doméstico. *Medifam* 12(5), 333–340.
- Carod-Artal, F. J., & Speck-Martins C. (1999). Polineuropatía tardía inducida por exposición a organofosforados. *Revista de Neurología*, 29(2), 123–127.
- Chang, P., & Wu, Y. (2010). Neuropathy target esterase : An essential enzyme for neural development and axonal maintenance. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(5), 573–575. doi:10.1016/j.biocel.2009.12.007
- Chen, Y., & Swanson, R. A. (2003). Astrocytes and Brain Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23(2), 137–149. doi:10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C
- Collombet, J., Four, E., Fauquette, W., Burckhart, M., Baubichon, D., Lallement, G., Masqueliez, C., et al. (2007). Soman poisoning induces delayed astroglitic scar and angiogenesis in damaged mouse brain areas. *Neurotoxicology*, 28, 38–48. doi:10.1016/j.neuro.2006.07.011
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2010). *Estadísticas ambientales Colombia*. Recuperado de http://estadisticas.comunidadandina.org/eportal/contenidos/1041_8.pdf
- Dam, K., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (1998). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos : delayed targeting of DNA synthesis after repeated administration. *Developmental Brain Research*, 108, 39–45.
- De Keyser, J., Mostert, J. P., & Koch, M. W. (2008). Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *Journal of the neurological sciences*, 267(1-2), 3–16. doi:10.1016/j.jns.2007.08.044
- Demir, F., Uzun, F. G., Durak, D., & Kalender, Y. (2011). Subacute chlorpyrifos-induced oxidative stress in rat erythrocytes and the protective effects of

- catechin and quercetin. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(1), 77–81. doi:10.1016/j.pestbp.2010.11.002
- Ehrich, M., & Jortner, B. (2002). Organophosphate-Induced Delayed Neuropathy. In E. J. Massaro (Ed.), *Handbook of Neurotoxicology* (Humana pre., Vol. 1, p. 668). Totowa.
- El-fawal, H. A. N., & McCain, W. C. (2008). Antibodies to neural proteins in organophosphorus-induced delayed neuropathy (OPIDN) and its amelioration. *Neurotoxicology and Teratology*, 30, 161–166. doi:10.1016/j.ntt.2008.01.005
- Emerick, G. L., Deoliveira, G. H., Antonio, C., & Ehrich, M. (2012). Mechanisms for consideration for intervention in the development of organophosphorus-induced delayed neuropathy. *Chemico-Biological Interactions*, 199(3), 177–184. doi:10.1016/j.cbi.2012.07.002
- Emerick, G. L., Peccinini, R. G., & Oliveira, G. H. D. (2010). Organophosphorus-induced delayed neuropathy: A simple and efficient therapeutic strategy. *Public Health*, 192, 238–244. doi:10.1016/j.toxlet.2009.10.032
- Fatemi, S. H., Folsom, T. D., Reutiman, T. J., Pandian, T., Braun, N. N., & Haug, K. (2008). Chronic psychotropic drug treatment causes differential expression of connexin 43 and GFAP in frontal cortex of rats. *Schizophrenia research*, 104(1-3), 127–34. doi:10.1016/j.schres.2008.05.016
- Fernández, D., Mancipe, L., & Fernandez, D. (2010). Intoxicación por organofosforados. *Revista Facultad de Medicina Universidad Militar Nueva Granada*, 18(49), 84–92.
- Galea, I., Bechmann, I., & Perry, V. H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends in Immunology*, 28(1), 12–8. doi:10.1016/j.it.2006.11.004
- Galloway, T., & Handy, R. (2003). Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides. *Ecotoxicology*, 12, 345–363.
- Gao, X., Hu, X., Qian, L., Yang, S., Zhang, W., Zhang, D., Wu, X., et al. (2008). Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced dopaminergic neurotoxicity via microglial activation: a mediator between peripheral infection and neurodegeneration? *Environmental Health Perspectives*, 116(5), 593–8. doi:10.1289/ehp.11031
- Garcia, S. J., Seidler, F. J., & Slotkin, T. a. (2002). Developmental Neurotoxicity Elicited by Prenatal or Postnatal Chlorpyrifos Exposure: Effects on

- Neurospecific Proteins Indicate Changing Vulnerabilities. *Environmental Health Perspectives*, 111(3), 297–303. doi:10.1289/ehp.5791
- Garcia, S. J., Seidler, F. J., & Slotkin, T. a. (2005). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: targeting glial cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(3), 455–61. doi:10.1016/j.etap.2004.12.007
- Griffiths, M. R., Gasque, P., & Neal, J. W. (2010). The Regulation of the CNS Innate Immune Response Is Vital for the Restoration of Tissue Homeostasis (Repair) after Acute Brain Injury: A Brief Review. *International Journal of Inflammation*, 18. doi:10.4061/2010/151097
- Gudi, V., Moharregg-Khiabani, D., Skripuletz, T., Koutsoudaki, P. N., Kotsiari, A., Skuljec, J., Trebst, C., et al. (2009). Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. *Brain Research*, 1283, 127–38. doi:10.1016/j.brainres.2009.06.005
- Hamby, M. E., & Sofroniew, M. V. (2011). Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics*, 7(4), 494–506. doi:10.1016/j.nurt.2010.07.003.Reactive
- Hanafy, K. A., & Sloane, J. A. (2011). Regulation of remyelination in multiple sclerosis. *FEBS Letters*, 585(23), 3821–3828. doi:10.1016/j.febslet.2011.03.048
- Hauwel, M., Furon, E., Canova, C., Griffiths, M., Neal, J., & Gasque, P. (2005). Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, “protective” glial stem cells and stromal ependymal cells. *Brain Research Reviews*, 48(2), 220–33. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.12.012
- Hulse, R. E., Winterfield, J., Kunkler, P. E., & Kraig, R. P. (2001). Astrocytic Glasmatodendrosis in Hippocampal Organ Culture. *Glia*, 33(2), 169–179.
- Hurtado C, C., & Gutiérrez de Salazar, M. (2005). Enfoque del paciente con intoxicación aguda por plaguicidas organofosforados. *Revista Facultad Medicina Universidad Nacional de Colombia*, 53(4), 244–258.
- Immunohistochemistry World. (2011). Toluidine Blue Staining Protocol for Mast Cells. Recuperado de http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/toluidine_blue.htm
- Jokanović, M., Kosanović, M., Brkić, D., & Vukomanović, P. (2011). Organophosphate induced delayed polyneuropathy in man: an overview.

Clinical Neurology and Neurosurgery, 113(1), 7–10.
doi:10.1016/j.clineuro.2010.08.015

- Kaur, C., & Ling, E. a. (2009). Periventricular white matter damage in the hypoxic neonatal brain: role of microglial cells. *Progress in Neurobiology*, 87(4), 264–80. doi:10.1016/j.pneurobio.2009.01.003
- Kettenmann, H., Hanisch, U., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, 91, 461–553. doi:10.1152/physrev.00011.2010.
- Kitamura, Y., Yanagisawa, D., Takata, K., & Taniguchi, T. (2009). Neuroprotective function in brain microglia. *Current Anaesthesia & Critical Care*, 20(3), 142–147. doi:10.1016/j.cacc.2008.12.007
- Kosanovi, M. (2010). Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29, 195–201. doi:10.1016/j.etap.2010.01.006
- Kraft, A. D., & Harry, G. J. (2011). Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(7), 2980–3018. doi:10.3390/ijerph8072980
- Lim, K. L., Tay, A., Nadarajah, V. D., & Mitra, N. K. (2011). The effect of consequent exposure of stress and dermal application of low doses of chlorpyrifos on the expression of glial fibrillary acidic protein in the hippocampus of adult mice. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 6(1), 4. doi:10.1186/1745-6673-6-4
- Liu, B. I. N., & Hong, J. (2003a). Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. *Neurology*, 304(1), 1–7. doi:10.1124/jpet.102.035048.logical
- Liu, B. I. N., & Hong, J. (2003b). Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(1), 1–7. doi:10.1124/jpet.102.035048.logical
- Loane, D. J., & Byrnes, K. R. (2010). Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*, 7(4), 366–77. doi:10.1016/j.nurt.2010.07.002

- Luo, X.-G., & Chen, S.-D. (2012). The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Translational Neurodegeneration*, 1(1), 9. doi:10.1186/2047-9158-1-9
- Marty, M. S., Andrus, a K., Bell, M. P., Passage, J. K., Perala, a W., Brzak, K. a, Bartels, M. J., et al. (2012). Cholinesterase inhibition and toxicokinetics in immature and adult rats after acute or repeated exposures to chlorpyrifos or chlorpyrifos-oxon. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63(2), 209–24. doi:10.1016/j.yrtph.2012.03.015
- Mekhail, M., Almazan, G., & Tabrizian, M. (2012). Oligodendrocyte-protection and remyelination post-spinal cord injuries: a review. *Progress in Neurobiology*, 96(3), 322–39. doi:10.1016/j.pneurobio.2012.01.008
- Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). Progress in Neurobiology GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 421–443. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.005
- Milla, O., & Palomino, W. (2002). *Niveles de colinesterasa sérica en agricultores de la localidad de Carapongo (Perú) y determinación de residuos de plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa en frutas y hortalizas cultivadas*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/Milla_C_O/t_completo.pdf
- Miller, G. & Spoolman, S. (2009). *Sustaining the Earth: An Integrated Approach*. Canada: Cengage Learning
- Millet, V., Marder, M., & Pasquini, L. A. (2012). Adult CNP :: EGFP transgenic mouse shows pronounced hypomyelination and an increased vulnerability to cuprizone-induced demyelination. *Experimental Neurology*, 233(1), 490–504. doi:10.1016/j.expneurol.2011.11.028
- Miron, V. E., Kuhlmann, T., & Antel, J. P. (2011). Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. *Biochimica et biophysica acta*, 1812(2), 184–93. doi:10.1016/j.bbadis.2010.09.010
- Mitra, N. K., Nadarajah, V. D., & Siong, H. H. (2009). Effect of concurrent application of heat , swim stress and repeated dermal application of chlorpyrifos on the hippocampal neurons in mice. *Folia Neuropathologica*, 28(126), 60–68.
- Mozafari, S., Sherafat, M. A., Javan, M., Mirnajafi-Zadeh, J., & Tiraihi, T. (2010). Visual evoked potentials and MBP gene expression imply endogenous myelin

repair in adult rat optic nerve and chiasm following local lysolecithin induced demyelination. *Brain Research*, 1351, 50–6. doi:10.1016/j.brainres.2010.07.026

Nagasato, K., Farris, R. W., Dubois-Dalcq, M., & Voskuhl, R. R. (1997). Exon 2 containing myelin basic protein (MBP) transcripts are expressed in lesions of experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *Journal of Neuroimmunology*, 72(1), 21–25. doi:10.1016/S0165-5728(96)00137-3

Nair, A., Frederick, T. J., & Miller, S. D. (2010). Astrocytes in Multiple Sclerosis : A Product of their Environment, 65(17), 2702–2720. doi:10.1007/s00018-008-8059-5.Astrocytes

Nakajima, K., & Kohsaka, S. (1993). Functional roles of microglia in the brain. *Neuroscience Research*, 17(3), 187–203. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8233123>

National Pesticide Information Center. (s.f.). Biomarkers of Exposure: Organophosphates. Recuperado de <http://npic.orst.edu/mcapro/OPBIOMARKERS.pdf>

Nieto-sampedro, M., Collazos-castro, J. E., Taylor, J. S., & Gudiño-cabrera, G. (2002). Trauma en el sistema nervioso central y su reparación, 35(6), 534–552.

Parrón, T., Requena, M., Hernández, A. F., & Alarcón, R. (2011a). Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology*. doi:10.1016/j.taap.2011.05.006

Parrón, T., Requena, M., Hernández, A. F., & Alarcón, R. (2011b). Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256(3), 379–85. doi:10.1016/j.taap.2011.05.006

Pascual, J. ., González-Llanos, F., Cerdán, S., Carceller, F., & Roda, J. . (2000). Fisiopatología de las células gliales en la isquemia cerebral. *Neurocirugia*, (11), 247–259.

Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, California, USA. Elsevier, Ed.

Philp, R. (2001). *Ecosystems and Human Health: Toxicology and Environmental Hazards*. (p. 352). Washington, D.C: Lewis Publishers.

- Polazzi, E., & Monti, B. (2010). Progress in Neurobiology Microglia and neuroprotection : From in vitro studies to therapeutic applications. *Progress in Neurobiology*, 92(3), 293–315. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.06.009
- Pott, F., Gingele, S., Clarner, T., Dang, J., Baumgartner, W., Beyer, C., & Kipp, M. (2009). Cuprizone effect on myelination, astrogliosis and microglia attraction in the mouse basal ganglia. *Brain Research*, 1305, 137–49. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.084
- Qiao, D., Seidler, F. J., & Slotkin, T. a. (2001). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos modeled in vitro: comparative effects of metabolites and other cholinesterase inhibitors on DNA synthesis in PC12 and C6 cells. *Environmental Health Perspectives*, 109(9), 909–13. Recuperado de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1240440&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Reinke, E., & Fabry, Z. (2006). Breaking or making immunological privilege in the central nervous system: the regulation of immunity by neuropeptides. *Immunology Letters*, 104(1-2), 102–9. doi:10.1016/j.imlet.2005.11.009
- Rezg, R., Mornagui, B., El-Fazaa, S., & Gharbi, N. (2010). Organophosphorus pesticides as food chain contaminants and type 2 diabetes: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 345–357. doi:10.1016/j.tifs.2010.04.006
- Ricci, G., Volpi, L., Pasquali, L., Petrozzi, L., & Siciliano, G. (2009). Astrocyte-neuron interactions in neurological disorders. *Journal of biological physics*, 35(4), 317–36. doi:10.1007/s10867-009-9157-9
- Roldán-Tapia, L., & Sánchez-Santed, F. (2004). Secuelas neuropsicológicas de las intoxicaciones agudas por plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. *Revista de Neurología*, 38(6), 591–597.
- Rotshenker, S. (2003). Microglia and Macrophage Activation and the Regulation Myelin Phagocytosis in Injury and Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, 21, 65–72.
- Ryu, H. J., Kim, J.-E., Yeo, S.-I., Kim, D.-W., Kwon, O.-S., Choi, S. Y... Kang, T.-C. (2011). F-actin depolymerization accelerates clasmotodendrosis via activation of lysosome-derived autophagic astroglial death. *Brain research bulletin*, 85(6), 368–73. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.05.007
- Sansar, W., Ahboucha, S., & Gamrani, H. (2011). Chronic lead intoxication affects glial and neural systems and induces hypoactivity in adult rat. *Acta Histochemica*, 113(6), 601–7. doi:10.1016/j.acthis.2010.06.005

- Saulsbury, M. D., Heyliger, S. O., Wang, K., & Johnson, D. J. (2009). Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. *Toxicology*, 259(1-2), 1–9. doi:10.1016/j.tox.2008.12.026
- Sim, F. J., Hinks, G. L., & Franklin, R. J. (2000). The re-expression of the homeodomain transcription factor Gtx during remyelination of experimentally induced demyelinating lesions in young and old rat brain. *Neuroscience*, 100(1), 131–9. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996464>
- Slotkin, T. a, & Seidler, F. J. (2007). Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. *Brain Research Bulletin*, 72(4-6), 232–74. doi:10.1016/j.brainresbull.2007.01.005
- Sofroniew, M. V. (2010). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32(12), 638–647. doi:10.1016/j.tins.2009.08.002.Molecular
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Steelman, A. J., Thompson, J. P., & Li, J. (2012). Demyelination and remyelination in anatomically distinct regions of the corpus callosum following cuprizone intoxication. *Neuroscience Research*, 72(1), 32–42. doi:10.1016/j.neures.2011.10.002
- Stence, N., Waite, M., & Dailey, M. E. (2001). Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*, 33(3), 256–66. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11241743>
- Sullivan, S. M., Björkman, S. T., Miller, S. M., Colditz, P. B., & Pow, D. V. (2010). Morphological changes in white matter astrocytes in response to hypoxia / ischemia in the neonatal pig. *Brain Research*, 1319, 164–174. doi:10.1016/j.brainres.2010.01.010
- Suárez-Fernández, M. B., Soldado, a B., Sanz-Medel, A., Vega, J. a, Novelli, A., & Fernández-Sánchez, M. T. (1999). Aluminum-induced degeneration of astrocytes occurs via apoptosis and results in neuronal death. *Brain Research*, 835(2), 125–36. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415367>
- Takuma, K., Baba, A., & Matsuda, T. (2004). Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, 72(2), 111–27. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.02.001

- Thundiyil, J. (2008). Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(3), 205–209. doi:10.2471/BLT.07.041814
- Vose, S. C., Fujioka, K., Gulevich, A. G., Lin, A. Y., Holland, N. T., & Casida, J. E. (2008). Cellular function of neuropathy target esterase in lysophosphatidylcholine action. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232, 376–383. doi:10.1016/j.taap.2008.07.015
- Wang, D. D., & Bordey, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology*, 86(4), 342–67. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.09.015
- Wang, Y., Wang, B., Zhu, M.-T., Li, M., Wang, H.-J., Wang, M., Ouyang, H., et al. (2011). Microglial activation, recruitment and phagocytosis as linked phenomena in ferric oxide nanoparticle exposure. *Toxicology Letters*, 205(1), 26–37. doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.001
- Windelborn, J. a, & Mitchell, G. S. (2012). Glial activation in the spinal ventral horn caudal to cervical injury. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 180(1), 61–8. doi:10.1016/j.resp.2011.10.011
- World Health Organization. (2012). Toxic hazard. Recuperado de <http://www.who.int/heli/risks/toxics/chemicals/en/index.html>
- Yan, C., Jiao, L., Zhao, J., Yang, H., & Peng, S. (2012). Repeated exposures to chlorpyrifos lead to spatial memory retrieval impairment and motor activity alteration. *Neurotoxicology and Teratology*, 34(4), 442–9. doi:10.1016/j.ntt.2012.05.053
- Yang, I., Han, S. J., Kaur, G., Crane, C., & Parsa, A. T. (2010). The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *Journal of Clinical Neuroscience*, 17(1), 6–10. doi:10.1016/j.jocn.2009.05.006
- Yefenof, E. (2000). Complement receptor 3 (CR3): A public transducer of innate immunity signals in macrophages. In Y. Keisari & I. Ofek (Eds.), *The Biology and Pathology of Innate Immunity Mechanisms*. Kluwer Academic Publishers.
- Zhang, P., Wong, T. a, Lokuta, K. M., Turner, D. E., Vujisic, K., & Liu, B. (2009). Microglia enhance manganese chloride-induced dopaminergic neurodegeneration: role of free radical generation. *Experimental Neurology*, 217(1), 219–30. doi:10.1016/j.expneurol.2009.02.013

- Ziemann, U., Wahl, M., Hattingen, E., & Tumani, H. (2011). Development of biomarkers for multiple sclerosis as a neurodegenerative disorder. *Progress in Neurobiology*, 95(4), 670–85. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.04.007
- Zimmer, L., Ennis, M., & Shipley, M. (1997). Soman-induced seizures rapidly activate astrocytes and microglia in discrete brain regions. *Comparative Neurology*, 378(4), 482–92.
- Zou, J., Wang, Y.-X., Dou, F.-F., Lü, H.-Z., Ma, Z.-W., Lu, P.-H., & Xu, and X.-M. (2011). Glutamine synthetase downregulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochemistry International*, 56(4), 577–584. doi:10.1016/j.neuint.2009.12.021.Glutamine