

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE POSGRADO: CIENCIAS EN

GASTROENTEROLOGÍA Y HEPATOLOGÍA



**TOXICIDAD HEPÁTICA DEL ETILENEBISDITIOCARBAMATO EN UN
MODELO EXPERIMENTAL**

NELSON DAVID SUAREZ URIBE

PORTO ALEGRE RS

BRASIL

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE POSGRADO: CIENCIAS EN

GASTROENTEROLOGÍA Y HEPATOLOGÍA



**TOXICIDAD HEPÁTICA DEL ETILENEBISDHTIOCARBAMATO EN UN
MODELO EXPERIMENTAL**

Disertación presentada al Programa de
Posgrado en Ciencias en
Gastroenterología y Hepatología como
requisito para la obtención de la
Maestría.

NELSON DAVID SUAREZ URIBE

Asesor: Prof. Dr. Dvora Joveleviths

Porto Alegre \ RS

2021

INSTITUCIONES:

Laboratorio de Hepatología y Gastroenterología Experimental – (HCPA)

Laboratorio Experimental de Ciencias Neumológicas e Inflamación (HCPA)

Unidad de Patología Experimental (UPE)

Laboratorio de Genética Toxicológica – (ULBRA)

Laboratorio Analítico Central de Análisis Clínicos (UFCSPA)

FUENTES DE FINANCIAMIENTO:

Fundación Instituto de Investigaciones Económicas- (FIPE)

Coordinación para el Perfeccionamiento del Personal de Educación Superior -

Sistema de Control de Becas CAPES - SCBA

CIP - Catalogação na Publicação

Suarez Uribe, Nelson David
Toxicidad de los Etilenobistitiocarbamatos en un
modelo experimental. / Nelson David Suarez Uribe. --
2021.
66 f.
Orientadora: Dvora Joveleviths.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Etilenobisditiocarbamatos. 2. Mancozebe. 3.
Pesticida. 4. Hepatotoxicidade. 5. Estresse oxidativo.
I. Joveleviths, Dvora, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATORIA

Este trabajo está íntegramente dedicado a mi familia:

A mis Padres, Oliva Uribe y Alfonso Suárez, por su incansable trabajo, ellos, a pesar de la distancia, estuvieron siempre presentes con sus oraciones y apoyo incondicional en este camino.

A mis hermanos Carlos y Jorge, a mis cuñadas por escucharme siempre y llenarme de pensamientos positivos a pesar de las dificultades del día a día.

A mis sobrinos por alegrar cada uno de mis días con sus sonrisas.

Para mis amigos e todas aquellas personas que de una u otra forma estuvieron relacionadas con este tiempo de formación y enriquecimiento para mi vida profesional.

Finalmente a todas aquellas personas que siempre estuvieron motivadas por la investigación y por alguna razón aún no han alcanzado sus objetivos, sepan que con esfuerzo y dedicación lo lograrán.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios, por permitirme alcanzar este nuevo escalón en mi vida profesional, por haberme puesto en el lugar perfecto al lado de personas que contribuyeron en este camino. Gracias señor por darme fuerzas, vida y salud para lograr mis objetivos a pesar de las grandes dificultades del día a día.

*Agradezco inmensamente a mis padres **Alfonso** y **Olivia**, a mis hermanos **Carlos** y **Jorge**, sus esposas, Gracias por siempre escucharme y llenarme de fortaleza cuando estuve a miles de kilómetros de distancia que hoy puedo llamar de distancia física, porque sin lugar a duda, estuvieron presentes en cada uno de mis días para brindarme su apoyo y todo el soporte necesario para enfrentar los grandes desafíos que la vida me trajo, a través de sus oraciones y consejos.*

Gracias a todos mis familiares y amigos que me apoyaron en este sueño de la investigación, me tuvieron paciencia cuando no estaba presente o cuando no pude asumir un compromiso por cumplir con mis responsabilidades, hoy puedo decir valió la pena y mucho.

*De manera especial y con mucho orgullo quiero darle las gracias a la Profesora **Dvora Joveleviths**, que hoy puedo llamar de Orientadora, médica, amiga y hasta mama adoptiva, principalmente en momentos de dificultad, fueron más de 2 años que compartimos juntos, celebrando victorias, compartimos agonías y algunos momentos de ansiedad superados, que inclusive dejaron lágrimas en medio del camino, pero hoy no es más que el secreto de la victoria. Gracias.*

***Marina Ferri Pezzini** mi eterna colega de pós graduación, no tengo palabras para agradecer todo lo que hiciste por mí en este tiempo, construimos una amistad que sin lugar a duda será para el resto de la vida.*

*A mi equipo de investigación **Juliana Dall Agnol**, **Sandyelle Benitez**, **Danieli Benedett**, **Sarah Werner**; Profesores **Juliana Da Silva**, **Eliane Dallegrave**, **Sandra Macedo**, **Fernanda Fvisioli**, **Carlos Thadeu Cerski**, **Eduardo Chiela**, **Mario Reis** y todos los que participaron de forma indirecta, muchísimas gracias por toda la ayuda y enseñanzas transmitidas por medio de este trabajo.*

*Dra. **Larisse Longo** y Mestre **Gabriel Guerreiro**, gracias por el apoyo logístico en uno de los momentos más importantes de este trabajo, sepan que cuentan conmigo siempre.*

*Excelentísima Dra. **Norma Marroni**, que me acogió como su alumno en momentos críticos y oportunos, aportando sus grandes conocimientos a este trabajo, que Dios le retribuya ese don de orientar, que sin duda lo hace de manera impecable.*

*Finalmente quiero agradecer a todas las instituciones **HCPA**, **UPE**, **ULBRA**, **UFCSPA** e fuentes financiadoras **FIPE** e **CAPES**, por contribuir de diferentes formas para el desarrollo de cada una de las actividades.*

No fueron momentos fáciles, de hecho nadie me dijo que lo sería, pero siempre visualizaba los objetivos que quería alcanzar, hoy tengo la inmensa satisfacción de decir que el deber fue cumplido.

Nelson David

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1.1 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL HÍGADO.....	23
2.1.2 FUNCIONES DEL HÍGADO	25
2.1.2.1 DETOXIFICACIÓN DEL HÍGADO	27
2.2 TOXICIDAD HEPÁTICA	28
2.2.1 MECANISMOS DE HEPATOTOXICIDAD	29
2.2.1.1 MECANISMO DIRECTO	30
2.2.1.2 MECANISMO IDIOSINCRÁSICO.....	31
2.2.1.3 MECANISMO INDIRECTO	31
2.2.2 FACTORES PREDISPONETES A LA HEPATOTOXICIDAD	32
2.2.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LA HEPATOTOXICIDAD	35
3. PLAGUICIDAS.....	36
3.1 CLASIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS	37
3.2 ETILENEBISDITIOCARBAMATOS	38
3.3 MARCADORES DE EXPOSICIÓN	39
3.4 EPIDEMIOLOGÍA DE PLAGUICIDAS	40
4. ESTRÉS OXIDATIVO	41
5. GENOTOXICIDAD	44
5.1 PRUEBAS DE EVALUACIÓN DE GENOTOXICIDAD.....	45
5.1.1 MICRONUCLEOS	45
5.1.2 ENSAYO COMETA.....	45

6. BIOQUÍMICA EN HEPATOTOXICIDAD	46
7. HISTOLOGÍA EN HEPATOTOXICIDAD	47
8. JUSTIFICACIÓN	50
9. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	50
10. HIPÓTESIS	50
11. OBJETIVOS.....	51
11.1 OBJETIVO PRIMARIO.....	51
11.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	51
12. ARTÍCULO ORIGINAL.....	52
13. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	52
14. CONSIDERACIONES FINALES.....	53
15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	54
16. ADJUNTOS.....	67

LISTA DE FIGURAS

Imagen 1: Anatomía del hígado, Fuente: Atlas de anatomía humana Frank H. Netter. 5ª ed. Río de Janeiro, Elsevier, 2011.

Imagen 2: Anatomía del hígado, cara visceral Fuente: Frank H. Netter Atlas De Anatomía Humana. 5ª ed. Río de Janeiro, Elsevier, 2011.

Imagen 3: Histología hepática, Fuente: Scheuer PJ, Leftkowitz, JH; Interpretación de la biopsia hepática. Saunders, 2000. www.hepcentro.com.br/histologia.htm

Imagen 4: Fórmula estructural Mancozebe. Fuente: Quim. Nuevo, vol. 34, no. 9, 1639-1642, 2011.

Imagen 5: Formación de ERO. Fuente: Imlay et al 2003.

Imagen 6: Interacción entre enzimas antioxidantes y radicales libres. Fuente: Bonn 2010.

Imagen 7: Micronúcleos en sangre periférica. Fuente: Rivero 2007.

Figura 8: Ensayo del cometa. Fuente: Matumoto et al. 2006.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Características de los diferentes mecanismos de hepatotoxicidad. Fuente: Hoofnagle JH, Björnsson ES. Lesión hepática inducida por fármacos: tipos y fenotipos. N Engl J Med.2019.

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
BT	Bilirrubina Total
BD	Bilirrubina direta
BI	Bilirrubina indireta
μL	Microlitro
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CAT´	Comunicação de Acidente de Trabalho
cm	Centímetro
CS2	Dissulfeto de carbono
DILI	Drug-induced liver injury
Dtc	Ditiocabamatos
EBDCs	Etilenobisditiocarbamatos
EO	Estresse oxidativo
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ETU	Etilenotiureia
FA	Fosfatase alcalina
G	Gramas
GC	Grupo controle
GPx	Glutationa peroxidase

H2O	Agua
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina e Eosina
HILI	Herbal and dietary supplements-induced liver injury
IHAG	Insuficiencia hepática aguda grave
Kg	Quilograma
LHID	Lesión hepática inducida por drogas
mL	Mililitros
MN	Micronucleos
Mn	Manganess
MZ1	Grupo intervención 1 (250mg\kg)
MZ2	Grupo intervención 2 (500mg\kg)
NaCl	Cloreto de Sódio
NAFLD	Enfermedad del hígado graso no alcohólica
NASH	Esteatohepatitis No alcohólica
NO	Óxido nítrico
NH3	Amonia
OH	Radical hidroxil
OIT	Organización Internacional del Trabajo
OLDs	Enfermdades ocupacionales del Hígado
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPAS	Organización Panamericana de salud
RL	Radical livre
SINTOX	Sistema Nacional de informaciones Tóxico-

	Farmacológicas
SIH	Sistema de informaciones Hospitalares
SINAN	Sistema de información de Agravos de Notificación
SOD	Superóxido dismutase
TAFLD	Toxicant Associated Fatty Liver Disease
TASH	Toxicant Associated Steato Hepatitis
TARV	Terapia antirretroviral
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF	Fator de necrose tumoral
T4	Tiroxina
T3	Triiodotironina
UEA	Unidade de Experimentação Animal
ZN	Zinco

RESUMEN

Introducción: En los últimos 40 años, la agricultura Brasileña se ha desarrollado de tal manera que el país será uno de los grandes proveedores de alimentos del futuro. Este sector ha venido jugando un papel importante en la economía Brasileña, debido a la gran producción de granos, que está representada por todas las macrorregiones. De hecho, para mantener dicha producción, el sector agrícola utiliza intensivamente insumos químicos como fertilizantes y pesticidas, lo que confirma que Brasil es uno de los mayores consumidores de pesticidas del mundo. Los Etilenbisditiocarbamatos (EBDC) son un grupo de fungicidas que se han utilizado ampliamente en el mundo, siendo el Manganeso Etilenbis (Mancozebe) uno de sus principales representantes. La gran preocupación está relacionada principalmente con la exposición crónica, a concentraciones bajas o altas de Mancozebe. Por esta razón, es importante evaluar el potencial efecto hepatotóxico del Mancozebe en un modelo experimental; **Materiales y métodos:** La propuesta fue un estudio experimental con 27 ratones Wistar machos, divididos en 3 grupos de 9 cada uno. El grupo de control (CG) recibió solución salina al 0,9% grupo intervención I (MZ1) recibió 250 mg/kg una vez a la semana y grupo intervención II (MZ2) recibió 500 mg/kg una vez a la semana; ambos diluidos en 2ml/kg de solución salina, El tratamiento se llevó a cabo durante 12 semanas, administrado por sonda orogastrica hasta el día de la eutanasia. Se tomaron algunas medidas antropométricas, como peso, altura y circunferencia abdominal; medidos algunos marcadores de exposición como la Etilenotiourea (ETU) en la orina; otros análisis fueron bioquímica, evaluación de genotoxicidad mediante recuento de micronúcleos y ensayo cometa, marcadores de estrés oxidativo y evaluación

histológica del hígado. **Resultados:** El efecto hepatotóxico de la exposición crónica a Mancozebe se confirmó a través de diferentes análisis; medidas antropométricas, cambios hematológicos, bioquímica sanguínea, genotoxicidad y estrés oxidativo, se encontró significancia estadística al comparar los grupos expuestos con el grupo control, estos resultados se apoyaron con la evaluación microscópica del hígado, que registró cambios histológicos como infiltrado inflamatorio y balonamiento en los hepatocitos de los grupos tratados. **Conclusión:** Se encontró significancia estadística en diversas variables al comparar los grupos expuestos con el grupo control, estos resultados se apoyaron con la evaluación microscópica del hígado, donde se registraron alteraciones histológicas como infiltrado inflamatorio y balonamiento en los grupos tratados. Concluyendo que la exposición crónica a Mancozebe puede tener un efecto deletéreo debido a sus repercusiones en el hígado.

Palabras clave: Etilenbisditiocarbamatos, Mancozebe, Plaguicidas, Hepatotoxicidad, Estrés oxidativo. Genotoxicidad.

RESUMO

Introdução: Nos últimos 40 anos a agricultura brasileira se desenvolveu de tal forma que o país será um dos grandes fornecedores de alimentos do futuro. Esse setor vem desempenhando um importante papel na economia do Brasil, devido à grande produção de grãos, que é representada por todas as macrorregiões. De fato, para manter tal produção, o setor agrícola utiliza intensivamente insumos químicos como fertilizantes e agrotóxicos, corroborando para que o Brasil seja um dos maiores consumidores de pesticidas do mundo. Os Etilenobisditiocarbamatos (EBDCs), são um grupo de fungicidas que tem sido amplamente utilizado no mundo, sendo o Manganese Ethylenebis (Mancozebe), um dos seus principais representantes. A grande preocupação se refere principalmente à exposição crônica, a baixas ou altas concentrações de Mancozeb. Por esse motivo é importante avaliar o potencial efeito hepatotóxico do Mancozebe em um modelo experimental; **Materiais e Metodos:** a proposta foi um estudo experimental com 27 ratos machos wistar, divididos em 3 grupos de 9 ratos. Grupo Controle (GC) recebeu Solução salina 0,9%, Grupo Intervenção I (MZ1) recebeu 250mg/kg uma vez por semana e Grupo intervenção II (MZ2) recebeu 500 mg/kg também uma vez por semana; ambos diluídos em solução salina 2ml/kg. O tratamento foi realizado por 12 semanas, administrado por gavagem até o dia da eutanásia. Foram aferidas algumas medidas antropométricas como peso, comprimento e circunferência abdominal; dosados alguns marcadores de exposição como Etilenotioreia (ETU) em urina; bioquímica, avaliação de genotoxicidade por meio de contagem de micronúcleos e ensaio cometa, marcadores de estresse oxidativo e finalmente avaliação histológica do fígado. **Resultados:** Foi confirmado o efeito hepatotóxico

da exposição crônica ao Mancozebe através de diferentes análises; medidas antropométricas, alterações hematológicas, bioquímica sanguínea, genotoxicidade e stresse oxidativo, foi encontrada significância estatística quando comparados grupos expostos com o grupo controle, esses resultados foram apoiados com a avaliação microscópica do fígado onde foi registrada alterações histológicas como infiltrado inflamatório e balonização nos grupos tratados. **Conclusão:** Conclui-se que a exposição crônica ao Mancozebe pode trazer um efeito deletério pelas suas repercussões no fígado. Este trabalho é um estudo experimental pioneiro na linha de pesquisa sobre hepatotoxicidade dos agrotóxicos no Brasil, e terá continuidade a um modelo em humanos.

Palavras-chave: Etilenobisditiocarbamatos, Mancozebe, Pesticida, Hepatotoxicidade, estresse oxidativo. Genotoxicidade.

ABSTRACT:

Introduction: In the last 40 years, Brazilian agriculture has developed to such an extent that the country will be one of the great food suppliers of the future. This sector has played a major role in the Brazilian economy, because of the high grain production in all macroregions. In order to keep up this production, the agricultural sector makes intensive use of chemical inputs such as fertilizers and pesticides, thus corroborating the fact that Brazil is one of the greatest pesticide consumers in the world. Ethylenebis dithiocarbamates (EBDCs) are a group of fungicides that have been widely utilized worldwide, and Manganese Ethylenebis (Mancozeb) is one of their main representatives. The great concern is especially chronic exposure to low or high concentrations of Mancozeb. Therefore, it is important to assess the potential hepatotoxic effect of Mancozeb in an experimental model. **Materials and Methods:** an experimental study was performed with 27 male Wistar rats, divided into 3 groups of 9 rats. The Control Group (CG) received saline solution 0.9%, Intervention Group I (MZ1) received 250mg/kg once a week and Intervention Group II (MZ2) received 500 mg/kg also once a week, both diluted in saline solution 2ml/kg. The treatment was performed for 12 weeks, administered by gavage until the day they were euthanized. Anthropometric measures, such as weight, length and abdominal circumference were taken. The biological exposure marker was also dosed, Ethyleneurea (ETU) in urine, and biochemical tests were performed, genotoxicity was evaluated by counting micronuclei and Comet assay, oxidative stress markers and histological evaluation of the liver. **Results:** The hepatological effect of chronic exposure to Mancozeb was confirmed by different tests: anthropometric measures, hematological alterations, blood biochemistry,

genotoxicity and oxidative stress. Statistical significance was found when groups exposed were compared to the control group. These results were supported by the microscopic evaluation of liver tissue, where histological alterations, such as inflammatory infiltrate and ballooning of the treated groups were recorded. .

Conclusion: It is concluded that chronic exposure to Mancozeb can have a deleterious effect due to its repercussions on the liver. This work is a pioneering experimental study in the line of research on hepatotoxicity of agricultural pesticides in Brazil and it will continue with a model of humans.

Key words: Ethylenebis dithiocarbamate, Manconzeb; oxidative stress;
Genotoxicity- Liver.

1. INTRODUCCIÓN:

En los últimos 40 años, la agricultura Brasileña se ha desarrollado de tal manera que el país será uno de los grandes proveedores de alimentos del futuro. Este sector ha venido jugando un papel muy importante en la economía Brasileña, debido a la gran producción de granos, que está representada por todas las macrorregiones ⁽¹⁾. De hecho, para mantener dicha producción, el sector agrícola utiliza intensivamente insumos químicos como fertilizantes y pesticidas, lo que confirma que Brasil es uno de los mayores consumidores de plaguicidas del mundo. Debido al uso generalizado y los eventos adversos conocidos en la literatura, el uso de plaguicidas ha surgido con gran impacto social y es considerado un desafío de salud pública mundial. ⁽²⁾

Los plaguicidas se desarrollaron con el objetivo de prevenir la invasión de plagas en los cultivos y proteger la salud pública del consumidor ⁽³⁾. Entre las clases de plaguicidas más utilizadas, se destaca el uso de fungicidas, los cuales son adecuados para prevenir o erradicar las infecciones fúngicas de plantas o semillas. Los Etilenbisditiocarbamatos (EBDC) son un grupo de fungicidas que se han utilizado ampliamente en todo el mundo desde la década de 1940^(4,5). Dentro del grupo EBDC, se encuentran: Mancozebe, Manebe, Zinebe y Metiram ⁽⁶⁾. El Manganese Ethylenebis (Mancozebe), según la literatura, está clasificado como de baja toxicidad, sin embargo, se ha demostrado que tiene efectos adversos en humanos ⁽⁷⁾. Su toxicidad se induce mediante la formación de radicales libres y una disminución de los antioxidantes. ⁽⁸⁾

La evidencia experimental y epidemiológica de los principales efectos adversos de estos productos ha sido demostrada por diferentes autores, Innes et al (1969),

demonstraron que la exposición crónica (18 meses) aumenta la incidencia de adenoma y carcinoma hepático en ratones machos y hembras ⁽⁹⁾. Ahmed et al (2017) mostraron diferentes alteraciones en los parámetros bioquímicos, que incluyen anemia, leucopenia y aumento de las transaminasas hepáticas AST y ALT, FA y acetilcolinesterasa.⁽¹⁰⁾ Otros autores, Yahia et al (2015) encontraron resultados similares principalmente relacionados a las transaminasas ⁽¹¹⁾.

La toxicidad de los fungicidas se reporta frecuentemente con la formación y aumento de especies reactivas de oxígeno (EROs), resultando en productos de daño oxidativo y/o alteraciones en los niveles de antioxidantes y sistemas enzimáticos de eliminación de EROS ^(12,13). La exposición a plaguicidas se ha asociado con la inducción de estrés oxidativo en múltiples sistemas ⁽¹⁴⁾. Algunos autores, como Atamaniuk et al (2014), centraron su investigación en la evaluación del estrés oxidativo a través de la evaluación de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) ⁽¹⁵⁾. Además de los efectos del estrés oxidativo secundarios a la exposición a Mancozeb, la evaluación de la genotoxicidad de los plaguicidas desencadena efectos nocivos crónicos en los seres humanos. Estos efectos comienzan con el daño celular y potencialmente causan el desarrollo de teratogénesis y cáncer, ^(16,17) siendo el potencial genotóxico un factor de riesgo principal de efectos a largo plazo. ⁽¹⁷⁾. Entre los métodos para detectar daño en el ADN, se encuentra la prueba de micronúcleos (MN) mediante la cual es posible detectar fragmentos de cromosomas acéntricos o cromosomas que no están incluidos en los núcleos formados durante la mitosis ⁽¹⁸⁾. La toxicidad por Mancozebe ha sido reportada por varios estudios experimentales, los cuales evidenciaron la sospecha de carcinogenicidad en ratones ⁽¹⁹⁾ e inducción de daño

al ADN en células expuestas in vitro a través de mecanismos oxidativos. ^(20,21) Los estudios clínicos destinados a evaluar la genotoxicidad de los EBDC son escasos en la literatura. La evaluación histológica del hígado es raramente descrita en la literatura, el trabajo de Pirozzi et al (2016), es uno de los pocos estudios de referencia, donde evalúa los grados de esteatosis hepática asociados a la exposición a Mancozebe, concluyendo que el fungicida aumentó la cantidad de gotículas lipídicas intracelulares. ⁽²²⁾.

Debido al posible daño causado por el Mancozebe secundario a la exposición prolongada por contacto con el contaminante y también por los residuos en los alimentos ⁽²³⁾, se decidió estudiar en detalle sus efectos hepatotóxicos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO:

2.1.1 ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL HÍGADO:

El hígado se encuentra ubicado en el cuadrante superior derecho del abdomen, se clasifica como uno de los órganos más grandes del cuerpo. Está protegido por la caja torácica entre la 7ª y la 11ª costillas del lado derecho. El peso aproximado es de 1500 g. ⁽²⁴⁾.

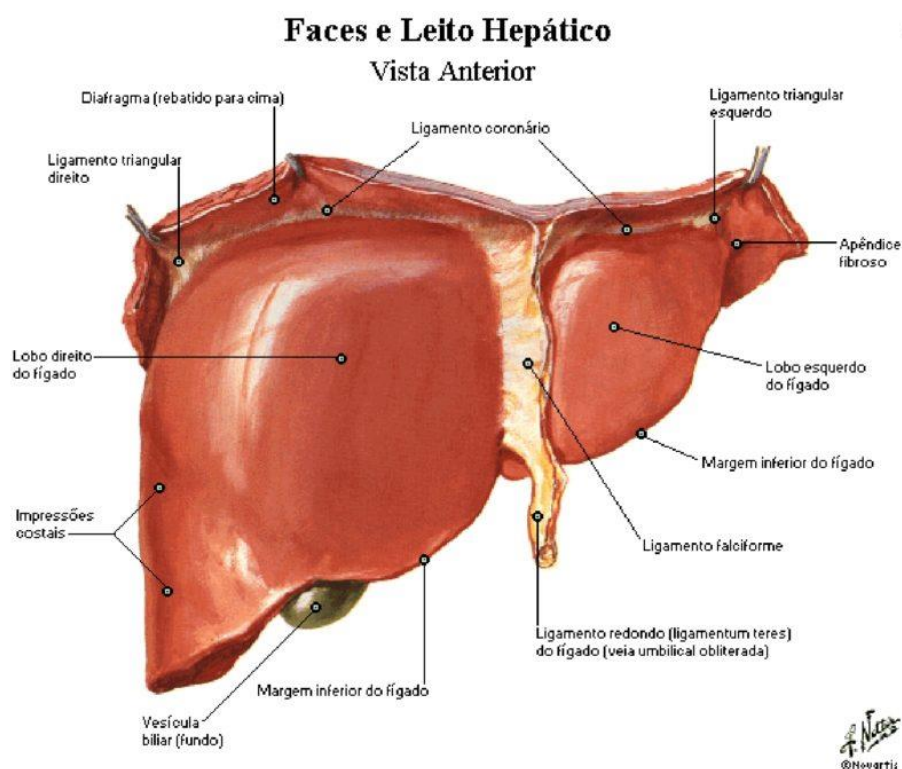


Imagem 1: Anatomía del hígado, vista anterior. NETTER: Frank H. Netter Atlas de Anatomía Humana. 5ª ed. Río de Janeiro, Elsevier, 2011.

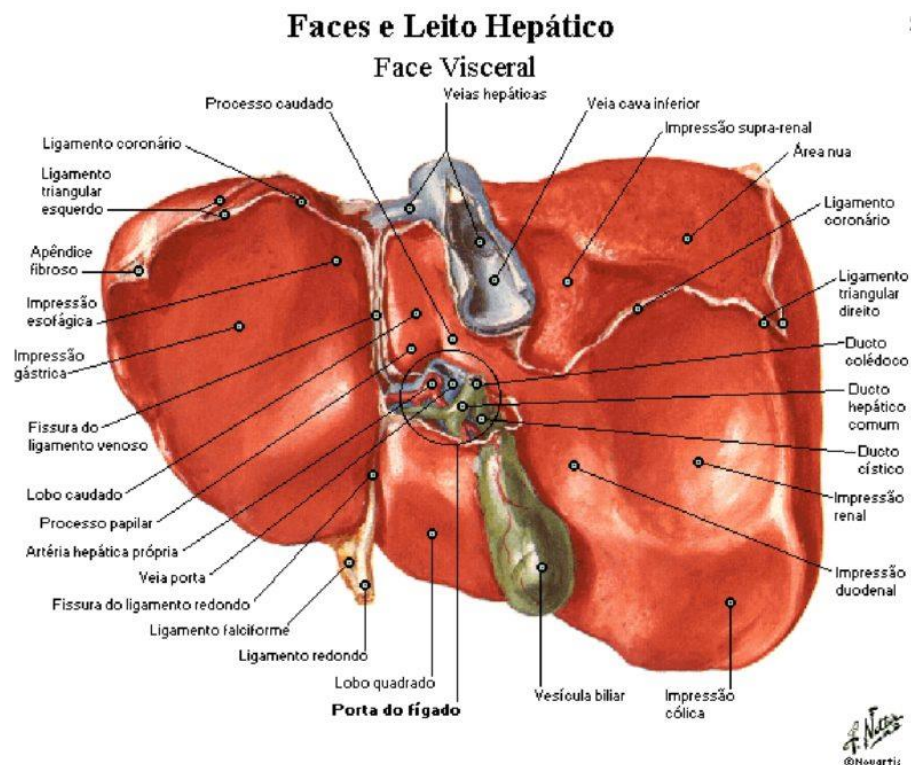


Imagem 2 Anatomía del hígado, cara visceral, NETTER: Frank H. Netter Atlas de anatomía humana. 5ª ed. Río de Janeiro, Elsevier, 2011.

Microscópicamente, la estructura del hígado está formada por unidades llamadas lóbulos hepáticos. En la región central de cada lóbulo se encuentra la vena centrolobulillar, tributaria de la vena hepática, mientras que en la periferia está el tracto portal, compuesto por el conducto biliar, ramas de la arteria hepática y la vena porta. (25)

La superficie sinusoidal está cubierta por un endotelio fenestrado que recubre el espacio de Disse, permitiendo el paso de moléculas de mayor tamaño, incluidas las lipoproteínas, y entre ellas encontramos células fagocíticas (kupffer), lipocitos y células Ito. (24,25)

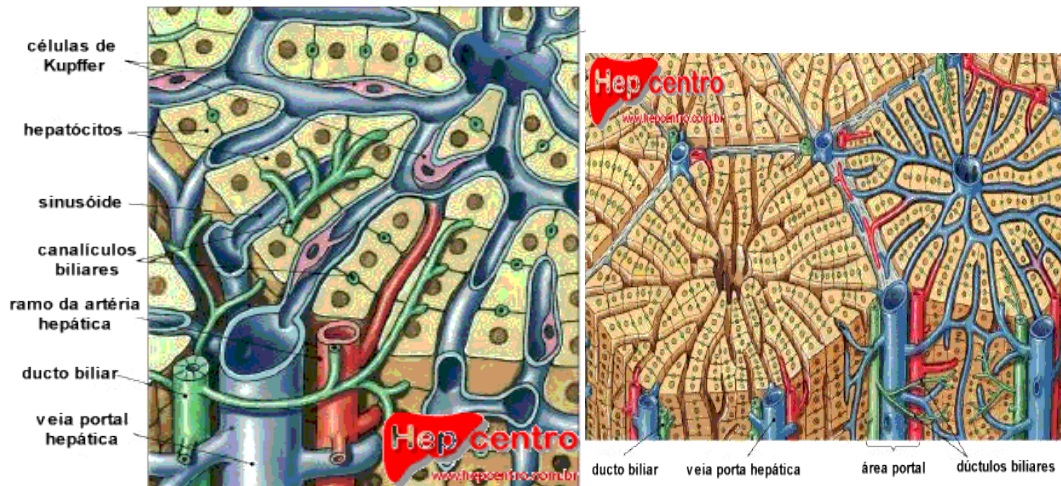


Imagen 3: Histología hepática. Scheuer PJ, Leftkowitz, JH; Interpretación de la biopsia hepática. Saunders, 2000. www.hepcentro.com.br/histologia.htm

2.1.2 Funciones del hígado:

El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano y el más complejo metabólicamente. Algunas de las funciones de los hepatocitos son ^(26,27,28):

- **Metabolismo, conjugación y excreción de varios compuestos:** El metabolismo de diferentes compuestos endógenos como sales biliares, bilirrubina, hormonas y exógenos como fármacos y toxinas. Estas moléculas pasan por 3 pasos fundamentales: captura, procesamiento y secreción.
- **Síntesis de proteínas:** El hígado sintetiza casi todas las proteínas plasmáticas más importantes, entre las que se encuentran: albúmina, transportadores de hormonas, factores de coagulación y fibrinolíticos, fibrinógeno, diversos factores de crecimiento, globulinas, lipoproteínas, entre otros. Incluso sintetiza aminoácidos no esenciales y otros péptidos como el glutatión.
- **Regulación del metabolismo de los nutrientes:** el hígado proporciona energía a otros tejidos a través de la glucosa y los cuerpos cetónicos.

- **Metabolismo de lípidos y proteínas:** Los lípidos absorbidos salen del intestino a través del sistema linfático en forma de quilomicrones, que sufren la acción de la lipoproteína lipasa sobre la superficie de las células endoteliales, liberando glicerol y ácidos grasos. Estos son capturados por los adipocitos y, en el caso de las proteínas, al degradarse liberan aminoácidos que no se pueden almacenar, se utilizan inmediatamente o se catabolizan para formar amoniaco (NH_3). Esta sustancia no es metabolizada por la mayoría de los tejidos, volviéndose extremadamente tóxica, siendo degradada principalmente en el hígado a través de su conversión en urea.
- **Almacenamiento de sustancias:** como las vitaminas A, D, E, K, vitamina B12, hierro, ácido fólico y otras.
- **Función endocrina:** convierte algunas hormonas y vitaminas en una forma más activa. Como hidroxilación de vitamina d, desyodinización de tiroxina (t4) a triyodotironina (t3) y síntesis de IGF-1 en respuesta a la hormona del crecimiento.
- **Función inmune:** funciona como un mecanismo de filtro para la circulación sistémica eliminando partículas exógenas como bacterias, endotoxinas incluyendo partículas endógenas como eritrocitos senescentes.
- **Formación y secreción de bilis:** una de las funciones más importantes; el hígado absorbe sustancia del plasma a través de su membrana y luego la secreta en forma modificada a la bilis, que en términos generales se convierte en la única vía de excreción de varios solutos que no son excretados por los riñones y la secreción de varias sustancias que son esenciales para digestión y absorción de lípidos.

2.1.2.1 Desintoxicación del hígado:

El hígado, además de las diferentes funciones anteriores, tiene una importante capacidad de regeneración. La desintoxicación es el proceso biológico de eliminación de sustancias tóxicas o biológicamente activas de los fluidos corporales, mediante la interacción con el medio ambiente, y realizado principalmente por el hígado y el intestino a través de complejos enzimáticos como el citocromo P450 y la glutatión transferasa. ⁽²⁹⁾.

Los xenobióticos deben ser desintoxicados o eliminados por el cuerpo, una función que desempeña el hígado de manera importante.

El proceso de desintoxicación del hígado se divide en varias fases:

La primera fase es la **biotransformación y activación de toxinas y carcinógenos**, que transforman sustancias no polares y solubles en grasa en componentes polares y más solubles en agua. En esta etapa inicial, el citocromo P450 y otras enzimas como la quinona reductasa y la xantina oxidasa convierten los componentes hidrófobos en compuestos más solubles en agua, de una manera más sencilla. En este paso, la sustancia original se convierte en un metabolito más polar o menos insoluble mediante oxidación, reducción o hidrólisis. ^(30,31). La segunda fase son las **reacciones de conjugación** para convertir el metabolito activo en productos no tóxicos y más hidrófilos, uniéndolos a glutatión, glucoronato o sulfato reducidos. En este punto, es importante enfatizar que algunas sustancias se pueden conjugar en su forma original sin pasar por reacciones de Fase I. ⁽³¹⁾

Según otras fuentes bibliográficas, ⁽³²⁾ algunos nutrientes pueden interferir en la eliminación de carcinógenos y toxinas, modificando el riesgo de desarrollo de

cáncer y otras enfermedades crónicas no transmisibles relacionadas con alteraciones en el metabolismo de los nutrientes.

2.2 TOXICIDAD HEPÁTICA:

La toxicidad hepática o hepatotoxicidad es el daño causado al hígado por sustancias químicas, medicamentos, suplementos, tés de plantas, entre otros.

En la literatura, los términos que se utilizan con frecuencia: **DILI** (Drug induced Liver Disease): lesión hepática inducida por fármacos, **HILI** (Herbal and dietary supplements-induced liver injury): Daño hepático inducido por suplementos dietéticos y a base de hierbas, ⁽³³⁾ **TAFLD** (Toxicant Associated Fatty Liver Disease): Enfermedad hepática no grasa asociada a sustancias tóxicas ⁽³⁴⁾ **TASH** (Toxicant Associated Steato Hepatitis) Esteato hepatitis asociada a tóxicos. ⁽³⁴⁾

Hasta el momento, no hay descripción en la literatura de un término específico para el mecanismo de hepatotoxicidad desarrollado por plaguicidas. Se cree que según este trabajo experimental, la fisiopatología del daño hepático provocado por plaguicidas podría ser similar a la descrita por muchos autores con el término: **TASH o TAFLD.**

2.2.1 MECANISMOS DE HEPATOTOXICIDAD:

Existen diferentes tipos de mecanismos de hepatotoxicidad que pueden ser causados por agentes exógenos al organismo; se pueden dividir en tres grandes categorías toxicidad intrínseca o directa, idiosincrásica e indirecta; **Toxicidad intrínseca, directa o dependiente de la dosis**, en el que los hepatocitos se lesionan por un efecto fisicoquímico directo, esta categoría también puede ser indirecta a través de cambios en las vías metabólicas, que puede ser una reacción citotóxica, por ejemplo, la causada por alcohol, o colestática, causada por MDA (metilendianilina), este mecanismo no es muy común, ya que la mayoría de los medicamentos con esta característica no son comercializados. ⁽³⁵⁾ La segunda categoría es la **idiosincrásica**, causando daños impredecibles y raramente daño hepático, que no depende de la dosis administrada. Incluye mecanismos de hipersensibilidad (alérgicos) y formas no relacionadas con la hipersensibilidad (no alérgicas). Es la principal causa del desarrollo de hepatotoxicidad farmacológica. ^(35,36)

Finalmente, un tercer mecanismo, todavía poco utilizado en la literatura, es el **indirecto**, provocado por la acción del fármaco y no por sus propiedades tóxicas o idiosincrásicas. El daño indirecto puede ser la inducción de una nueva enfermedad o la exacerbación de una preexistente. ⁽³⁷⁾

Existen diferentes factores que contribuyen a la toxicidad hepática, entre los que se encuentran la exposición a altas concentraciones de fármaco, una enorme actividad metabólica y la presencia de diferentes enzimas responsables de la generación de metabolitos reactivos, especialmente EROS. ⁽³⁸⁾

Algunos autores, como Cullen et al (2005), describen 3 tipos principales de lesión hepática: lesión hepatocelular, lesión colestásica y mixta.⁽³⁹⁾

2.2.1.1 MECANISMO DIRECTO:

La hepatotoxicidad directa es el subtipo más común causado por agentes que son intrínsecamente tóxicos para el hígado, lo que la convierte en una lesión predecible dependiente de la dosis que puede reproducirse en modelos experimentales. En este mecanismo, el período de toxicidad se caracteriza por ser corto, aproximadamente de 1 a 5 días después de la exposición.⁽⁴⁰⁾

El patrón típico de este mecanismo es el aumento de las enzimas AST y ALT, en ausencia de ictericia por no haber un aumento de bilirrubinas, generalmente es un cuadro asintomático, y con resolución del aumento de transaminasas en cuanto se suspende el agente causal, aunque se puede resolverse espontáneamente, fenómeno conocido como adaptación.⁽³⁷⁾

La necrosis hepática aguda es la forma más común de hepatotoxicidad en este mecanismo, ocurre rápidamente poco después de la exposición, incluso con la primera dosis; en la mayoría de los casos hay un aumento de enzimas contrarias a la fosfatasa alcalina que se mantienen en niveles normales o mínimamente elevados.⁽³⁷⁾

Este mecanismo es típico en altas dosis de acetaminofén, aspirina, amiodarona, antineoplásicos, etc.⁽²⁷⁾

2.2.1.2 MECANISMO IDIOSINCRÁSICO:

Es causada por agentes con poca o ninguna toxicidad intrínseca que causan daño hepático con menos frecuencia. ⁽⁴¹⁾

Esta lesión es impredecible y no depende de la dosis. El período de latencia varía de 5 a 90 días con síntomas similares a la hepatitis viral aguda.

El daño hepático idiosincrásico se clasifica como hepatocelular, colestásico o ambos (mixto). Algunos fármacos implicados en estos mecanismos son: isoniazida, nitrofurantoína, diclofenaco, amoxicilina-clavulánico, macrólidos, entre otros. ⁽⁴²⁾

2.2.1.3 MECANISMO INDIRECTO:

La lesión indirecta es una nueva categoría que aún no ha sido bien definida, y algunos autores aún mantienen solo las dos categorías anteriores. Esta nueva categoría se consideró en función de las características clínicas diferenciadas que se muestran en la tabla 2 ⁽³⁷⁾.

El mecanismo indirecto es provocado por la acción del fármaco y no por sus propiedades tóxicas o idiosincrásicas, que pueden generar una nueva enfermedad hepática o la exacerbación de una preexistente. ⁽³⁷⁾ La mayoría de los casos son asintomáticos, sin embargo, si no se realiza la intervención adecuada, pueden agravarse y tornarse muy graves y poner en riesgo la vida. ⁽⁴³⁾

Algunos ejemplos son la nitrofurantoína y la atorvastatina. ⁽³⁷⁾

En la siguiente tabla se encuentran resumidos los diferentes mecanismos de hepatotoxicidad y sus características principales. (Tabla 1)

Tabla 1. Lesión hepática inducida por fármacos según el tipo. *			
Variable	Hepatotoxicidad directa	Hepatotoxicidad idiosincrásica	Hepatotoxicidad Indirecta
Frecuencia	Comum	Raro	Intermediario
Relacionado con la dosis	Si	No	No
Predecible	Si	No	Parcialmente
Reproducible en modelo animal.	Si	No	Usualmente No.
Latencia (Tiempo de aparición)	Normalmente rápido (días).	Variable (días a años).	Retrasado (meses)
Fenotipo	Necrosis hepática aguda, elevación de enzimas, obstrucción sinusoidal , hígado graso agudo, regeneración nodular.	Hepatitis hepatocelular aguda, hepatitis mixta o colestásica, colestasis blanda, crónica hepatitis.	Hepatitis aguda, inmunomediada hepatitis, hígado graso, hepatitis Crónica.
Agentes mas comunmente implicados	Altas dosis de acetaminofén, niacina, aspirina, cocaína, amiodarona IV, metotrexato intravenoso, quimioterapia.	Amoxicilina-clavulanato, cefalosporinas, isoniazida, nitrofurantoína, minociclina, fluoroquinolonas, antibióticos macrólidos.	Agentes antineoplásicos, glucocorticoides, anticuerpos monoclonales, inhibidores de la proteína quinasa
Causa	Hepatotoxicidad intrínseca cuando agente administrado en dosis altas	Reacción metabólica o inmunológica idiosincrásica	Acción indirecta del agente sobre el hígado o sistema inmune
* IV = intravenoso.			

Tabla 1: Características de los diferentes mecanismos de hepatotoxicidad. Adaptado de Hoofnagle, 2019.

2.2.2 FACTORES PREDISONENTES A LA HEPATOTOXICIDAD:

En la literatura se han estudiado algunos factores de riesgo para el desarrollo de hepatotoxicidad por diferentes etiologías:

Edad y género: la sensibilidad a los xenobióticos varía con la edad, por lo que la constituye en un factor de riesgo; la edad avanzada aumenta la sensibilidad ⁽⁴⁴⁾. Por otro lado, el sexo femenino tiene más probabilidades de desarrollar hepatotoxicidad debido a la mayor cantidad de tejido adiposo, ya que los productos lipofílicos pueden aumentar el grado de daño hepático. ⁽⁴⁵⁾

La edad, según el "Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas" (CIOMS) en el "Método de avaliação de causalidade Roussel Uclaf Causality

Assessment Method" (RUCAM) puntúa a los pacientes mayores de 55 años como factor de riesgo. ⁽⁴⁶⁾

Variación genética:

Algunos polimorfismos genéticos en genes que codifican enzimas involucradas en El metabolismo xenobiótico (oxidación y desintoxicación) puede aumentar la susceptibilidad a la hepatotoxicidad inducida por fármacos, aunque el conocimiento de la variabilidad genética todavía no parece ser útil para discriminar poblaciones de alto riesgo. ^(47,48)

Algunos genes ya se han asociado con DILI, como el sistema HLA (DR6 y DR2, A11, DRB1 1501 y DRB10602). También se detallaron algunos polimorfismos enzimáticos (CYP206, CYP2C19, NAT2). ⁽⁴⁹⁾

Alcohol: Uno de los factores de riesgo de enfermedad hepática más estudiados; el consumo de alcohol puede empeorar o aumentar la toxicidad asociada con la exposición ocupacional. El alcohol, a través de su efecto inductor sobre el sistema P450, conduce a la generación de radicales libres tóxicos que aumentan la probabilidad de daño hepático severo. ⁽⁵⁰⁾

El alcohol y el embarazo se incluyeron en la lista de factores de riesgo de CIOMS \ RUCAM. El alcohol también es un inductor de CYP2E1 que juega un papel muy importante en la formación de N-acetil-pbenzoquinoneimina (NAPQI), un metabolito reactivo responsable de la hepatotoxicidad del acetaminofén; esta información fue corroborada por algunos autores que mostraron al alcohol como un predictor negativo de DILI. ⁽⁵¹⁾

También hay una mayor incidencia de DILI grave cuando el alcohol se ha asociado con esteroides anabólicos. ⁽⁴⁹⁾.

Enfermedades hepáticas preexistentes: Las comorbilidades previas pueden aumentar el riesgo de DILI, un ejemplo son los pacientes con Enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD) en los que hay un aumento en el desarrollo de esteatohepatitis asociada a tóxicos (TASH), hay evidencia de que los pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico preexistente (NAFLD) aumenta el riesgo de lesión hepática aguda inducida por fármacos. ⁽⁵²⁾. Otras enfermedades como la hepatitis viral en la que se puede haber desarrollado algún grado de daño hepático, como la fibrosis o la esteatosis, pueden empeorar el pronóstico debido a la exposición a sustancias químicas o fármacos. ⁽⁵³⁾

Un gran porcentaje de pacientes con comorbilidades previas y que necesitan utilizar diferentes medicamentos para su control, se observó que la exposición a fármacos puede influir en la susceptibilidad a la hepatotoxicidad, ya que muchos fármacos actúan de forma sinérgica con otros factores de riesgo, aumentando la patogenia y progresión de la enfermedad hepática. ⁽⁴⁹⁾. Otros estudios informaron una alta tasa de enfermedad hepática en pacientes con síndrome metabólico, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), HAS y VIH; este último está relacionado con medicamentos de terapia antirretroviral (ART). ^(54,55)

Uso de otros medicamentos: la interacción medicamentosa; Las isoenzimas del citocromo P450 son responsables del metabolismo oxidativo de la mayoría de los fármacos y xenobióticos relacionados con el lugar de trabajo.⁽⁴⁴⁾. Algunos

medicamentos, como los antiepilépticos de primera generación, conocidos por su capacidad inductora de enzimas, pueden provocar la formación de metabolitos químicamente reactivos de otras sustancias químicas, lo que aumenta el riesgo de toxicidad hepática.⁽⁵⁶⁾ Algunos disolventes orgánicos pueden inducir un efecto sinérgico para el desarrollo de hepatitis aguda grave.⁽⁵⁷⁾

2.2.3 EPIDEMIOLOGÍA DE LA HEPATOTOXICIDAD:

La hepatotoxicidad corresponde al 2-5% de los casos de ictericia en pacientes hospitalizados, al 10% de los casos de hepatitis en adultos (más del 40% en mayores de 50 años) y al 25% de hepatitis fulminante; 96% de las hepatitis idiopáticas graves en España, siendo la principal causa de insuficiencia hepática aguda grave en EE.UU. y Europa.^(58, 59)

Algunos datos epidemiológicos afirman que la hepatotoxicidad provocada por una gran proporción de medicamentos se produce de forma impredecible, mecanismo en el que el fármaco se utilizó según las indicaciones, pero provoca efectos adversos, lo que define un evento idiosincrásico.^(49,41)

Con base en la literatura, se puede inferir que la mayoría de los datos publicados sobre la epidemiología de las lesiones hepáticas inducidas por fármacos (LHID) son retrospectivos y se refieren particularmente a la frecuencia de casos más graves de hepatitis aguda con evolución sintomática.⁽⁶⁰⁾

Otros datos epidemiológicos describen un gran número de sustancias farmacéuticas con potencial para causar fenómenos de hepatotoxicidad, la gran mayoría de los cuales son de naturaleza idiosincrásica. ⁽⁶¹⁾

Numerosos compuestos químicos además de fármacos ya han sido estudiados por diferentes autores, con el objetivo de evaluar su efecto tóxico; sin embargo existen algunas limitaciones en los estudios publicados hasta el momento, muy pocos de estos estudios han evaluado sus efectos en humanos a través de investigación completa incluyendo la histología hepática tras la exposición crónica a diferentes sustancias.

3. PLAGUICIDAS:

Son sustancias químicas, naturales o sintéticas, que se utilizan para controlar plagas y plantas invasoras de diferentes cultivos. ⁽⁶²⁾

Estos productos también se pueden utilizar en el combate a los transmisores de enfermedades como el dengue, la malaria, la fiebre amarilla, entre otras, pero si no se usan correctamente pueden traer efectos tóxicos a la salud.

3.1 CLASIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS:

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), los plaguicidas se clasifican de diferentes formas, siendo la principal según su función: insecticidas, fungicidas, herbicidas y otros. ⁽⁶³⁾

- Los **insecticidas** pertenecen al grupo químico de los organoclorados (BHC®, DDT® o Neocid®, Methoxychlor® o Marlato®), organofosforados (Paration®, Palation®, Diclorvos®), carbamatos (Carbaril®, Baygon®, Carbofuran®) y los piretroides (Aletrina®, Cypermethrina®, Permethrin®) tienen acción contra insectos, larvas y hormigas principalmente. ⁽⁶³⁾

- **Herbicidas:** Tiene su efecto contra plantas invasoras, entre ellas encontramos: Bipiridilos: (Paraquat®, Diquat®); glifosato - aminoácido de glicina (Roundap® o Glyfosate®); triazinas (Atrazine®, Simazine®, Metribuzin®); fenoxiácidos (derivados del ácido fenoxiacético y dinitrofenoles) ⁽⁶³⁾

- **Fungicidas:** destinados principalmente al control de hongos. Entre ellos encontramos: pentaclorofenol; **ditiocarbamatos** (Mancozeb® o Manzate®, Maneb® o Dithane®, Thiram® o Arasan®, Zineb®, Ziram® o Zimate®); organoestaño (acetato de trifenilestaño (Brestan®) y otros ⁽⁶³⁾.

Los plaguicidas también pueden clasificarse según su toxicidad expresada por su tasa de letalidad:

Antes de presentar esta clasificación, es necesario aclarar el concepto de la denominada dosis letal 50 - LD50: es la cantidad de una sustancia química que cuando se administra en una sola dosis por vía oral, se expresa en masa de la

sustancia por masa de animal, ocasionando la muerte del 50% de los animales expuestos en un período de observación de 14 días. ⁽⁶⁴⁾

Toxicidad aguda - DL50 oral para ratas (mg / kg):

Clase 1 A:Extremadamente tóxico. DL50 <5 mg / kg.

Clase 1 B:Altamente toxico. LD50 5-50 mg / kg.

Clase 2: Moderadamente tóxico. LD50 50-500 mg / kg.

Clase 3: Baja toxicidad. LD50 500-5000 mg / kg.

Clase 4: Muy poco tóxico. LD50> 5000 mg / kg.

3.2 Etilenbisditiocarbamatos:

Los Etilenbisditiocarbamatos (EBDc) son el subgrupo más importante de ditiocabamatos (Dtc) y se utilizan intensamente como fungicidas para el control de hongos. Se consideran de baja toxicidad, lo que justifica su mayor uso en agricultura. Todos los EBDc tienen un esqueleto orgánico común (C₄H₆N₂S₄), que se diferencia solo en su ion metálico, siendo Manebe y Mancozebe (nombres comerciales) los más utilizados.⁽⁶⁵⁾

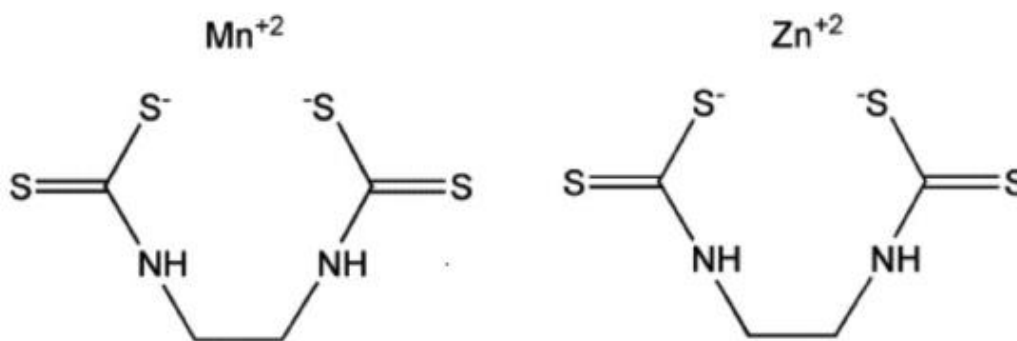


Imagen 4: Fórmula estructural de Mancozebe. Chem, vol. 34, no. 9 de octubre de 1963 a 1642 de 2011

3.3 Marcadores de exposición:

El monitoreo biológico se está convirtiendo cada vez más en un desafío para la salud pública debido al interés en las actividades de prevención sanitaria con la intención de prevenir el desarrollo de cualquier enfermedad relacionada con la exposición a un plaguicida específico. ⁽⁶⁶⁾

El monitoreo biológico se define como la medición y cuantificación de sustancias químicas, o sus metabolitos, en tejidos, fluidos, secreciones, excreciones, aire exhalado o en cualquier combinación, para evaluar la exposición y el riesgo para la salud. ⁽⁶⁷⁾

Esta actividad contribuye directamente a la vigilancia de la salud laboral y ambiental, en la evaluación de los diferentes perfiles epidemiológicos y situaciones de salud en las que se encuentra involucrado el trabajador. ⁽⁶⁸⁾

La descomposición metabólica de los EBDC da como resultado la formación de disulfuro de carbono (CS_2), etilenotiourea (ETU), manganeso (Mn) y zinc (Zn), y se

ha demostrado que el seguimiento biológico es una herramienta poderosa en la evaluación de la exposición a estos plaguicidas. ⁽⁶⁹⁾.

3.4 EPIDEMIOLOGÍA DE PLAGUICIDAS:

En Brasil, el consumo de plaguicidas ha aumentado significativamente en las últimas décadas, convirtiendo al país en uno de los mayores consumidores de plaguicidas del mundo. Diferentes fuentes oficiales de registro de intoxicaciones por plaguicidas intentan medir el número de casos registrados, aunque existe una gran falta de información y datos sobre el número real de intoxicaciones por estos productos, debido a la subnotificación.

Algunos sistemas de registro de intoxicaciones por plaguicidas como el Sistema Nacional de Información Toxicológica y Farmacológica (SINITOX), el Sistema de Información Hospitalaria - Morbilidad Hospitalaria del SUS (SIH\SUS), la Comunicación de Accidentes Laborales (CAT´) y el Sistema de Información sobre Enfermedades Notificables (SINAN), son las principales bases de datos sobre este tipo de intoxicaciones.

Rio Grande do Sul, estado Brasileño, donde se llevó a cabo esta investigación, ocupa el tercer lugar en el ranking de estados que producen más granos, lo que corresponde a alrededor de 35,9 millones de toneladas en 2019 ⁽¹⁾.

Según datos del Banco Mundial, cada año 355.000 personas mueren por intoxicación involuntaria por plaguicidas ⁽⁷⁰⁾. Según la Organización Internacional del Trabajo (OIT) / Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 70 mil trabajadores de países subdesarrollados mueren por intoxicación aguda y crónica por plaguicidas y otros 7 millones desarrollan alguna enfermedad no fatal ⁽⁷¹⁾. A pesar de que la intoxicación por plaguicidas es un evento de notificación

obligatoria, las estimaciones indican que solo el 20% de los casos, de hecho, están registrados en el Sistema Nacional de Notificación de Salud (SINAN) de acuerdo con la ordenanza MS 1271\2014. ⁽⁷²⁾

4. ESTRÉS OXIDATIVO:

El estrés oxidativo se caracteriza por un aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (EROS) por encima de sus niveles fisiológicos; y la disminución de enzimas antioxidantes. ⁽⁷³⁾

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la generación de compuestos oxidantes y la acción de los sistemas de defensa antioxidantes. Los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno son el resultado del metabolismo del oxígeno. La función principal del sistema de defensa antioxidante es reducir e incluso inhibir el daño causado por la acción de los radicales libres y/o especies reactivas no radicales ⁽⁷⁴⁾.

Como resultado de este desequilibrio se generan numerosas especies reactivas: radicales libres que tienen un electrón desapareado en su última capa de electrones y especies reactivas no radicales, que favorecen diferentes daños oxidativos ⁽⁷⁵⁾.

La producción de EROS surge de la reducción molecular de O_2 a H_2O en las mitocondrias. ⁽⁷⁶⁾ Durante este proceso de reducción hay un pequeño porcentaje en el que se produce una reducción monovalente, provocando la formación de intermedios reactivos. ⁽⁷⁷⁾ En esta reducción, los intermedios monovalentes de O_2 son H_2O_2 (peróxido de hidrógeno), $O_2 \cdot^-$ (anión radical superóxido) y $OH\cdot$ (radical

hidroxilo), que se denominan EROS, los dos últimos se denominan radicales libres⁽⁷⁸⁾.

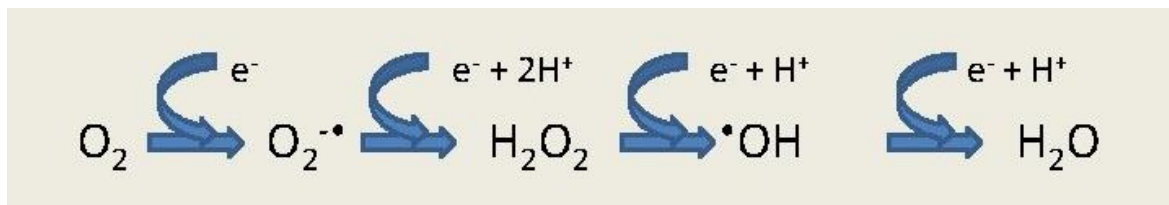


Imagen 5: Formación de ERO. Imlay et al 2003.

El radical $\text{O}_2 \bullet -$ se elimina mediante la reacción de dismutación secundaria a la reacción de dos aniones superóxido catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). H_2O_2 es un producto de la dismutación de $\text{O}_2 \bullet -$ por la enzima SOD. Otras enzimas que participan en estos procesos son la Catalasa (CAT) y la Glutatión peroxidasa (GPx) que son enzimas oxidativas capaces de formar o degradar H_2O_2 . Según el autor Dröge. ⁽⁷⁸⁾ los radicales libres Ejercen algunas funciones con efectos beneficiosos (señalización celular, fagocitosis y regulación del crecimiento celular) o nocivos (lipoperoxidación, oxidación de proteínas y daño del ADN) en el organismo. El radical hidroxilo ($\text{OH}\bullet$) Es el radical libre más dañino, y más reactivo, inestable que reacciona con una gran cantidad de compuestos orgánicos. Tiene una vida extremadamente corta. ⁽⁷⁹⁾ Los radicales libres reaccionan principalmente con los lípidos de la membrana provocando el fenómeno de lipoperoxidación, con liberación del contenido de orgánulos, como enzimas hidrolíticas de los lisosomas y formación de productos citotóxicos, que provocan la muerte celular. Aunque algunos procesos de lipoperoxidación no son dañinos, son importantes para la formación de prostaglandinas que participan en la respuesta inflamatoria. ⁽⁸⁰⁾

4.1 Enzimas antioxidantes:

Las enzimas antioxidantes son un mecanismo de defensa de nuestro organismo, que puede actuar para prevenir, interceptar sustancias oxidantes o reparar el daño causado por estas sustancias. Los antioxidantes funcionan para mantener bajos niveles de EROS en las células con la intención de prevenir el desarrollo de estrés oxidativo. ⁽⁸¹⁾

El sistema descrito anteriormente se divide en enzimático: (SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa y GPx: glutatión peroxidasa) y no enzimático (compuesto por una amplia variedad de sustancias antioxidantes de la dieta u otras fuentes exógenas) como vitaminas, minerales y compuestos fenólicos. ⁽⁷⁴⁾. Estas enzimas actúan como mecanismos de prevención, controlando la formación de radicales libres y especies no radicales, que participan en las diferentes reacciones que desencadenan el daño oxidativo. ⁽⁷⁴⁾

Otras enzimas actúan indirectamente en la eliminación de especies reactivas como es el caso de la glutatión reducida (GSH) junto con GPx. Con el objetivo de continuar el ciclo metabólico del glutatión en su forma no reducida ⁽⁷⁴⁾.

Interacción enzimática de antioxidantes y radicales libres:

La SOD participa en la dismutación de $O_2 \bullet -$ en H_2O_2 y O_2 , siendo el primero menos reactivo y por lo tanto degradado fácilmente por otras enzimas, H_2O_2 a pesar de no

ser un radical, reacciona con otras moléculas generando $\text{OH} \bullet$; la eliminación de peróxidos se realiza mediante las enzimas CAT y GPx.

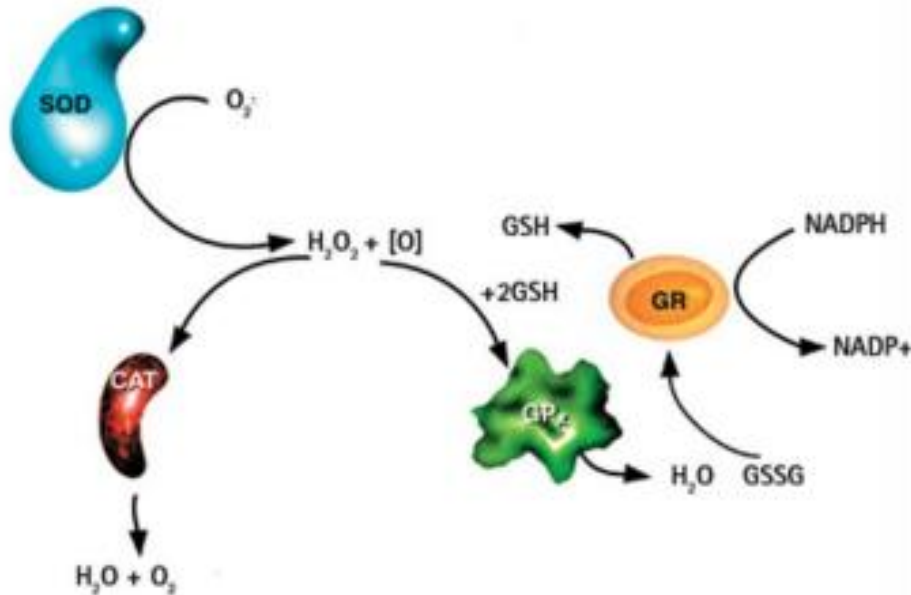


Imagen 6: Interacción entre enzimas antioxidantes y radicales libres. Bonn 2010.

5. GENOTOXICIDAD:

La definición de genotoxicidad se da a través de agentes o sustancias que tienen la capacidad de dañar el ADN y los cromosomas de la célula después de su interacción; tal alteración puede ser en su estructura o función, una vez fijadas, se vuelven capaces de ser transmitidas entre un gen y otro, denominándose mutaciones. Las mutaciones son la principal fuente de variabilidad genética en una población. Son el mecanismo a través del cual surgen enfermedades en los individuos y sus descendientes ⁽⁸²⁾. El potencial mutagénico de un producto puede verse alterado por factores exógenos, algunos ejemplos son los aditivos químicos y plaguicidas; también existen algunos factores endógenos, como vitaminas, compuestos fenólicos, algunos alcaloides y pesticidas naturales ⁽⁸³⁾

5.1 PRUEBAS PARA LA EVALUACIÓN DE GENOTOXICIDAD:

5.1.1 MICRONUCLEOS:

La prueba de micronúcleos se usa ampliamente para evaluar la capacidad de una sustancia para romper cromosomas conocido como clastogenicidad o afectar la formación de placa en metafase y/o huso mitótico, capaz de conducir a una distribución desigual de los cromosomas durante la división celular ⁽⁸⁴⁾

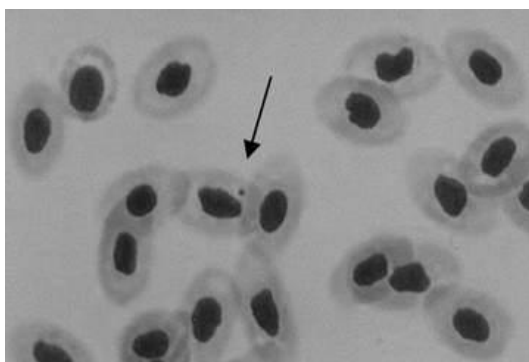


Imagen 7: Micronúcleos en sangre periférica. Rivero 2007.

5.1.2 PRUEBA DE ENSAYO COMETA:

El ensayo cometa es un método utilizado en la investigación para evaluar las posibles lesiones genómicas que evolucionan hacia mutaciones. Este método tiene una alta sensibilidad para detectar daños en el ADN. ⁽⁸⁵⁾ El ensayo del cometa es una herramienta de investigación fundamental en estudios de reparación del ADN, biomonitorio ambiental y pruebas de genotoxicidad. ⁽⁸⁶⁾ La técnica del cometa se basa en la detección de fragmentos de ADN que, tras la inducción por electroforesis, migran alejándose del centro nuclear a una velocidad mayor que la del ADN intacto, formando una estructura con apariencia de cola de cometa ⁽⁸⁷⁾

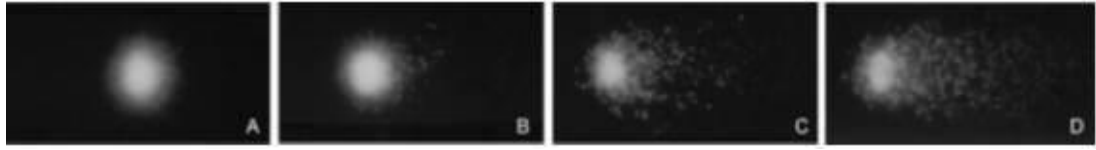


Figura 8: Ensayo del cometa. A. Clase 0 (celda sin daños); B. Class1 (celda de daño pequeño); C. Clase 2 (daño medio) y D. Clase 3 (daño grave) Matumoto y col. 2006.

6. ANÁLISIS BIOQUÍMICO EN LA HEPATOTOXICIDAD:

El análisis de marcadores bioquímicos se ha convertido en un punto clave entre los estudios que evalúan la hepatotoxicidad. El daño hepático en personas expuestas a plaguicidas o cualquier otro químico se puede evaluar usando enzimas AST y ALT, incluida la función hepática usando fosfatasa alcalina, bilirrubina y fracciones. Cabe señalar que estos biomarcadores no son específicos de ninguna forma de enfermedad hepática tóxica. ⁽⁵³⁾ Debido a las características clínicas e histopatológicas similares de la lesión hepática en pacientes con hepatotoxicidad asociada con la exposición a sustancias químicas y la exposición a diferentes fármacos químicos, se han utilizado los mismos criterios bioquímicos para la lesión hepática aguda o crónica en DILI. El daño hepatocelular se denomina hepatocelular cuando el cociente ALT y FA ≥ 5 y colestásico cuando el cociente entre ALT y FA ≤ 2 y mixto cuando el cociente es > 2 y < 5 . ⁽⁸⁸⁾

7. HISTOLOGÍA HEPÁTICA EN HEPATOTOXICIDAD:

Además del análisis bioquímico, el daño hepático puede ser establecido directamente mediante la evaluación de la histología del hígado. Hasta el momento, existen pocos estudios en la literatura sobre histología después de la exposición a sustancias tóxicas como plaguicidas.

La exposición tóxica a fármacos o sustancias químicas puede imitar prácticamente todo el espectro de enfermedades hepáticas, lo que es especialmente cierto en las enfermedades hepáticas ocupacionales (OLD) que a menudo pueden presentarse de manera insidiosa con fenotipos atípicos de lesión hepática tóxica, que incluyen esteatosis, TASH, fibrosis, cirrosis, vascular, enfermedades del hígado y hasta cáncer de hígado. ⁽⁸⁹⁾

Existen diferentes métodos de tinción o impregnación utilizados para el estudio histopatológico del hígado, constituyendo paneles que varían según lo que se va a evaluar; ⁽¹¹⁴⁾ en este trabajo las tinciones fueron: Hematoxilina & Eosina para la evaluación de Esteatosis y Red Picrosirius para la evaluación de fibrosis.

7.1 Esteatosis hepática

Se ha relacionado con la exposición a disolventes orgánicos y otros productos químicos; en estas situaciones es la primera manifestación histológica de la enfermedad del hígado graso, sin embargo su progresión también se reporta en la literatura como un infiltrado inflamatorio, aumento de hepatocitos y en algunos casos fibrosis y cirrosis; estos hallazgos son indistinguibles de hígado graso. ^(90, 91)

7.2 Fibrosis:

Puede aparecer después de la exposición crónica a diferentes tóxicos a través del desarrollo de hepatitis crónica, necrosis subaguda o lesión por esteatohepatitis. ⁽⁹²⁾.

Algunos trastornos vasculares también se describen en la literatura, que incluyen: síndrome de obstrucción sinusoidal, peliosis (definida por grandes cavidades llenas de sangre no revestidas por células endoteliales que dañifican las células sinusoidales ⁽⁹³⁾). Otras alteraciones vasculares son enfermedad porto-sinusoidal, neoplasia hepática maligna, angiosarcoma y carcinoma hepatocelular; este último con muy poca frecuencia. ⁽⁹⁴⁾

7.3 HALLAZGOS HISTOLÓGICOS SEGÚN EL TIPO DE MECANISMO DE HEPATOTOXICIDAD:

7.3.1 Mecanismo directo:

Los principales hallazgos descritos en la literatura cuando se trata de hepatotoxicidad causada por un mecanismo directo, son la necrosis centrolobulillar o panlobulillar con poca inflamación, patrón similar a la hepatitis isquémica. ⁽³¹⁾ algunos estudios histológicos del hígado muestran dilatación de sinusoides con necrosis de hepatocitos en áreas centrales (zona 3). Otros patrones histológicos fueron evaluados en DILI según el tipo de medicamento encontrado, como esteatosis microvesicular con mínima inflamación, necrosis y hasta Hiperplasia Nodular Regenerativa. ⁽³⁷⁾.

7.3.2 Mecanismo idiosincrásico:

La histología hepática muestra alteraciones sugestivas de hepatitis viral aguda y lesión de la vía biliar y colestasis en pequeños canalículos biliares, otros hallazgos fueron colestasis leve con poca inflamación y necrosis hepatocelular.⁽³⁷⁾

No se encontró literatura sobre la evaluación histológica del mecanismo indirecto, ya que es un mecanismo recientemente reconocido que aún está en estudio.

8. JUSTIFICACIÓN

Debido al importante uso de fungicidas en nuestro medio, con el fin de mantener diferentes cultivos para la producción de granos y frutas, Brasil se ha convertido en uno de los mayores consumidores de pesticidas del mundo, generando indeterminado número de efectos tóxicos sobre la salud. Por lo anterior es fundamental conocer los efectos Hepatotóxicos de estos productos y especialmente los derivados del grupo EBDC, que son ampliamente utilizados; este estudio se realiza inicialmente a través de un modelo experimental, en el cual la relación causa-efecto se puede comprobar de forma directa sin factores externos que interrumpan el curso de la investigación como es el caso de los humanos, donde existen otras variables externas que interfieren en esta evaluación, estudio que ya se encuentra en progreso, a partir de esta línea de investigación y conclusiones será fácil elaborar intervenciones precoces y así evitar los efectos nocivos de los EBDC.

9. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

La exposición crónica a fungicidas de tipo Etilenbisditiocarbamatos como Mancozebe causa efectos hepatotóxicos o de otro tipo en animales ratas Wistar expuestos?

10. HIPÓTESIS

Los fungicidas EBDC, especialmente el Manganese Ethylenebis (Mancozebe), pueden causar hepatotoxicidad en animales expuestos.

11. Objetivos:

11.1 Objetivo primario:

Evaluar la hepatotoxicidad del plaguicida Manganese Ethylenebis (Mancozebe), del grupo de Etilenbisditiocarbamatos en ratas Wistar expuestos y no expuestos a Mancozebe.

11.2 Objetivos secundarios:

1. Evaluar el efecto de diferentes dosis de Manganese Ethylenebis (Mancozebe)
2. Evaluar las alteraciones hepáticas mediante pruebas de laboratorio.
3. Medir los indicadores biológicos de exposición.
4. Evaluar el daño hepático por medio de estrés oxidativo.
5. Evaluar la Genotoxicidad en sangre y el tejido hepático.
6. Evaluar los hallazgos histológicos del hígado.

12. ARTIGO ORIGINAL...

13.LIMITACIONES DEL ESTUDIO:

Este estudio se desarrolló durante el escenario de la pandemia COVID-19, en el momento en el que no existían vacunas disponibles ni ninguna otra medida aun disponible para el control efectivo de la enfermedad.

Algunos procedimientos de laboratorio incumplidos en el momento, por la logística necesaria para el desarrollo de las diferentes técnicas.

Otra limitación de este estudio fue el tamaño de la muestra, siendo considerado pequeño para los diferentes análisis estadísticos, sin embargo el número total de animales y procedimientos siempre se realizó respetando la legislación vigente para el manejo de animales en los diferentes experimentos y trabajos de investigación.

14. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVA DE FUTURO:

Este estudio logró todos los objetivos propuestos y se convirtió en piloto de un modelo en humanos que ya está en progreso, además motivó aún más el estudio de los efectos de plaguicidas sobre el organismo.

Una de las grandes ventajas de este trabajo fue el haber logrado desarrollar una técnica sin variables de confusión que acompañan la mayoría de los estudios clínicos.

Este trabajo es pionero en Brasil dentro de estudios que evalúan la toxicidad hepática asociada con la exposición a plaguicidas en el grupo de EBDC, con la análisis de diferentes muestras incluso histología hepática.

Algunas estructuras como cerebro, intestino, corazón y pulmones de los animales tratados en este trabajo se encuentran almacenados en perfectas condiciones para ejecutar otros modelos de toxicidad por Mancozebe, como es el caso de Microbiota intestinal que ya se encuentra en desarrollo.

15. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BRAZIL. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Available at: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/agropecuaria-brasileira-em-numeros>. Consulted: 12/09/2021
2. Pignati WA et al. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for health surveillance. *Science, collective health*; 2017, 22 (10): 3281-3293. DOI: 10.1590 / 1413-812320172210.17742017
3. Ding, F., XN Li, JX Diao, Y. Sun, L. Zhang, and Y. Sun. (2012). Chiral recognition of metalaxyl enantiomers by human serum albumin: evidence from molecular models and photophysical approach. *Chirality*. 24: 471–480.
- Four. Pawan K. Gupta. Fungicide Toxicity, Chapter 45, *Veterinary Toxicology*; 2018, 569-580 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00045-3>
5. E Yahia, MA Aiche, AChouabbia and MS Boulakoud. Subchronic mancozeb treatment induced liver toxicity through oxidative stress in poorly Wistar rats. *Comm. Apl. Biol. Sci*; 2014, 79 (3): 553-9.
6. RULES RR; BARRETTO HC; KUSSUMI A; COLACIOPPO S. Evaluation of dithiocarbamates and ethylene thiourea (ETU) residues in papaya and its implications for public health. *Rev Inst Adolfo Lutz*; 2005, 64 (1): 50-7.
7. Paro, R., GM Tiboni, R. Buccione, G. Rossi, V. Cellini, and R. Canipari. (2012). the fungicide mancozeb induces toxic effects on the granulosa cells of mammals. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 260: 155-161

8. Rašković A, Pavlović N, Kvirgić M, Jan S, Gorana M, Ivan Č, Momir M (2015) Effects of pharmaceutical formulations containing thyme on injury Carbon tetrachloride-induced liver disease in rats. *BMC Complement Alternate Med* 15: 442
9. Innes J, Ulland B, Valerio M, Petrucelli L, Fishbein L. et al. Bioassay of pesticides and industrial chemicals for tumorigenicity in mice: a preliminary note. *J.Natl. Cancer Inst*; 1969, 42 (6): 1101-1114.
10. Ahmed, A.Gh. Farag. Gamila, AM Kotb. Hematographic biochemical responses under stress of the fungicide mancozeb (75% WP) in male albino rats. *Int. J. Adv. Res. Biol. Science* (2017). 4 (10): 116-127
- eleven. Yahia E, Aiche M, Chouabbia A, BoulakoudM. Biochemical and hematological changes after prolonged exposure to mancozeb. *Adv. Biores*; 2015, 6 (2): 83-86
12. Li ZH, Velisek J, Zlabek V, Grabic R, Machova J, Kolarova J, Randak T. 2010a. Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. *ChemBiol Interact* 183: 98–104
13. Lushchak VI. 2011. Oxidative stress induced by the environment in aquatic animals. *AquatToxicol* 101: 13-30
14. Meco G, Bonifati V, Vanacore N, Fabrizio E. 1994. Parkinsonism after chronic exposure to the fungicide Maneb (manganese ethylene bis-dithiocarbamate). *Scand J Work Environ Health* 20: 301–305.
- fifteen. Atamaniuk T, Kubrak O, Husak V, Storey K, Lushchak V. The carbamate fungal tattoo containing mancozeb induces mild oxidative stress in the

brain, liver and kidney of goldfish. *Environmental toxicology*; 2014, 29 (11): 1227-1235. DOI 10.1002 / tox.

16. Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P., Marcos, R. (2011) Exposure to micronuclei and pesticides. *Mutagenesis* 26, 19-26.

17. During, M. et al. From DNA damage to chromosomal aberrations: joining the break. *Mutat Res* 756, 5-13 (2013).

18. Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, AT, Surralles, J., Crott, JW, Parry, J., Norppa, H., Eastmond, DA, Tucker, JD, Thomas, P. (2011) Molecular mechanisms of micronucleus formation, nucleoplasmic bridges, and nuclear buds in human and mammalian cells. *Mutagenesis* 26, 125-32.

19. Belpoggi, F., Soffritti, M., Guarino, M., Lambertini, L., Cevolani, D .., Maltoni, C. (2002) Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene bisdithiocarbamate (Mancozeb) in rats. *Ann. NY Acad. Sci.* 982, 123-136
twenty. Calviello, G., Piccioni, E., Boninsegna, A., Tedesco, B., Maggiano, N., Serini, S., Wolf, FI, Palozza, P. (2006) DNA damage and induction of apoptosis by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 87-96.

twenty-one. Srivastava, AK, Ali, W., Singh, R., Bhui, K., Tyagi, S., Al-Khedhairy, AA, Srivastava, PK, Musarrat, J., Shukla, Y. (2012) Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. *Life Sci.* 90, 815-824.

22. Pirozzi AV, Stellavato A, La Gatta A, Lambert M, Schiraldi C. Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human HepG2 cell model. *Toxicology letters*; 2016, 13 (249): 1-4
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.03.004>

23. Jardim ANO, Mello DC, Brito AP, Voetb HV, Boonc PE, Caldas ED, Probabilistic evaluation of the dietary risk of triazole and dithiocarbamate fungicides for the Brazilian population. *Food and chemical toxicology*; 2018 118: 317–327. IT HURTS: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.002>
24. Moore, KL, Dalley, AF and Agur, AMR (2014). *Clinically Oriented Anatomy* (7th ed.). Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins
25. DUCK, Richard L .; VOGL, A. Wayne; MITCHEL, Adam WM: *Gray's Clinical Anatomy for Students*. 3rd ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
26. Daniel S. Pratt and Marshall M. Kaplan. Jaundice. In: Kasper DL, Braunwald, Fauci AS, Jameson JL, Hauser SL, Long DL, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16th ed., McGraw-Hill, 2005; Chapter 38: 238-243.
27. Larson AM, Polson J, Fontana RJ et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a prospective multicenter study from the United States. *Hepatology* 2005; 42: 1364-72 Anderson
28. Liver physiology. Support text. Dr. Pedro Pimentel Nunes, Prof. Dr. Adenilo Leite Moreira. Faculty of Medicine, University of Porto. Physiology Service. 2006.
29. Liska D, Quinn S, Lukaczer D, Jones DS, Lerman RH. *Clinical Nutrition. The functional approach*. Chapter 09 Environment and toxicity. 2nd Ed. Washington, 2004. p.237-61
30. Pascoal V, Barcos A, Fonseca ABBL. Detoxification and Hepatic Biotransformation. In: Pascoal V, Buques A, Fonseca ABBL. *Functional nutrition: from principles to clinical practice*. Clinical functional nutrition: from principles to clinical practice. São Paulo: Metha, 2007. 170-208.

31. Iyanagi, Takashi. (2007). Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification. *International cytology review*. 260. 35-112. DOI: 10.1016 / S0074-7696 (06) 60002-8
32. Lampe JW. Diet, Genetic Polymorphisms, Detoxification, and Health Risks. *Ther Health Med*. 2007; 13 (2): S108-11.
33. De Boer, YS and Sherker, AH (2017). Herbal and Dietary Supplement-Induced Liver Injury. *Liver Disease Clinics*, 21 (1), 135-149. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.1010>
3. 4. Wahlang, B., Beier, JI, Clair, HB, Bellis-Jones, HJ, Falkner, KC, McClain, CJ and Cave, MC (2013). Steatohepatitis associated with toxic substances. *Toxicological Pathology*, 41 (2), 343-360. <https://doi.org/10.1177/0192623312468517>
35. Brauner, Cristiano. 2019. Metabolic syndrome and hepatotoxicity associated with solvent exposure. Master's Thesis (Sciences in Gastroenterology and Hepatology), UFRGS.
36. Corsini A, Bortolini M. Drug-induced liver injury: the role of drug metabolism and transport. *J. Clin. Pharmacol*. May 2013; 53 (5): 463–74.
37. Hoofnagle JH, Björnsson ES. Drug-induced liver injury: types and phenotypes. *N Engl J Med*. 2019 Jul 18; 381 (3): 264-273. Doi: 10.1056 / NEJMra1816149. PMID: 31314970.
38. N. Borlak J. 2007 Mechanisms of hepatotoxicity. Mechanisms of toxic liver damage. Section 4: 191 - 286
39. Cullen JM, 2005. Mechanistic classification of liver injury. *Toxicol Pathol* 33: 6-8.

40. Zimmerman HJ. Hepatotoxicity: the adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999.
41. Björnsson ES, Bergmann OM, Björnsson HK, Kvaran RB, Olafsson S. Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland. *Gastroenterology* 2013; 144: 1419-25.
42. Chalasani N, Bonkovsky HL, Fontana R, et al. Characteristics and outcomes of 889 patients with drug-induced liver injury: the prospective DILIN study. *Gastroenterology* 2015; 148 (7): 1340-52.e7.
43. Huffman BM, Kottschade LA, Kamath PS, Markovic SN. Hepatotoxicity after immune checkpoint inhibitor therapy in melanoma: natural progression and management. *Am J Clin Oncol* 2018; 41: 760-5
44. Brautbar N, Williams J. Industrial solvents and liver toxicity: evaluation of risks, risk factors and mechanisms. *Int J Hyg Environ Health*. 2002; 205: 479-491
- Four. Five. Robles-Diaz M, Lucena MI, Kaplowitz N, Stephens C, Medina-Caliz I, González-Jimenez A, et al. Use of Hy's law and a new compound algorithm to predict acute liver failure in patients with drug-induced liver injury. *Gastroenterology* 2014; 147: 109-118
46. Danan G, Benichou C. Assessment of the causality of adverse drug reactions - I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injury. *J Clin Epidemiol* 1993; 46: 1323-1330.
47. Hsieh H.-I, Chen P.-C, Wong R.-H, Wang J.-D, Yang P.-M, Cheng T.-J. Effect of CYP2E1 genotype on vinyl chloride monomer-induced liver fibrosis among polyvinyl chloride workers. *Toxicology*. 2007; 239: 34-44

48. European Association for the Study of the Liver. Email address: easloffice@easloffice.eu ; Clinical practice guidelines panel: Chair: panel members; EASL Governing Board Representative: EASL Clinical Practice Guidelines: Drug-Induced Liver Injury. J Hepatol. June 2019; 70 (6): 1222-1261. Doi: 10.1016 / j.jhep.2019.02.014. Electronic publication March 27, 2019. PMID: 30926241.
49. European Association for the Study of the Liver. Email address: easloffice@easloffice.eu ; Clinical Practice Guidelines Panel: Chairperson: Panel Members: EASL Board of Directors Representative: EASL Clinical Practice Guidelines: Occupational Liver Diseases. J Hepatol. November 2019; 71 (5): 1022-1037. Doi: 10.1016 / j.jhep.2019.08.008. Epub 17 Sep 2019 PMID: 31540728.
- fifty. Zimmerman HJ Effects of alcohol on other hepatotoxins. Alcohol Clin Exp Res. 1986; 10: 3-15
51. Chalasani N, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB, Davern T, Serrano J, et al. Causes, clinical characteristics and results of a prospective study of the Drug-induced liver injury in the United States. Gastroenterology 2008; 135 (1924-1934) e4.
52. Anders LC Lang AL Anwar-Mohamed A. Douglas AN Bushau AM Falkner KC et al. Vinyl chloride metabolites potentiate inflammatory liver injury caused by LPS in mice. Toxicol Sci. 2016; 151: 312-323
53. Senior JR Alanine Aminotransferase: A Clinical and Regulatory Tool to Detect Past, Present, and Future Liver Lesions. Clin Pharmacol Ther. 2012; 92: 332-339
54. Núñez M. Hepatotoxicity of antiretrovirals: incidence, mechanisms and management. J Hepatol 2006; 44: S132-S139

55. Dawwas MF, Aithal GP. End-stage liver disease related to methotrexate is rare and is associated with features of the metabolic syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 40: 938-948
56. Kaufman KR Carbamazepine, hepatotoxicity, organic solvents and paints. *Embargo*. 1999; 8: 250-252
57. Kubo S. Matsuzaki K. Seki T. Ohsawa M. Kumagai S. Endo G. Severe hepatitis in a printing press worker: an acute case study. *J Occup Health*. 2015; 57: 87-90
58. Almdal TP et al. Incidence of parenchymal liver diseases in Denmark, 1981 to 1985: Analysis of hospitalization registry data. *Hepatology* 1991; 13: 650-655.
59. Ibanez L et al: Prospective surveillance of severe acute liver disease not related to infectious, obstructive or metabolic drugs: epidemiological and clinical characteristics, and drug exposure. *J Hepatol* 2002; 37 (5): 592-600.
60. Tajiri K, Shimizu Y. Practical guidelines for the early diagnosis and treatment of drug-induced liver injury. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6774-6785.
61. Bitterncourt PL, Epidemiology of drug hepatotoxicity, *GED gastroenterol. endosc.dig*. 2011; 30 (Supplement 1): 06-47
62. Oliveira-Silva, JJ; Alves, SR; Meyer, A; Perez, F .; Sarcinelli, P. de N; Mattos, R. de CO de C .; Moreira, JC "Influence of socioeconomic factors on pesticide contamination, Brazil". *Journal of Public Health*, 2001, v. 35, no. 2, São Paulo Available at: <www.saudeetrabalho.com.br>.
63. PAN - American Health Organization (PAHO). Sanitary surveillance manual for populations exposed to pesticides. Brasilia, 1997.

64. Swanson, MB; Davis, GA; Kincaid, LE et al. Environmental Chemistry and Toxicology 16, 2, 372-383; 1997
65. Pires AC, Costa RC, Perez D. Methodology for the conservation of the fungicide Mancozeb in soil samples. Chem. Nova, Vol. 34, No. 9, 1639-1642, 2011.
66. Pivetta F; Huet JM; Araujo CU; MF branches; Apostoli Pietto. Biological surveillance: concepts and applications in public health. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 17 (3): 545-554, May-June 2001
67. BERLIN, A .; YODAIKEN, RE & HENMAN, BA, 1984. Evaluation of toxic agents in the workplace. Roles of environmental and biological monitoring. Boston: Haya Nijhoft.
68. Machado, JMH, 1997. Worker health surveillance process. Cuadernos de Salud Pública, 13 (Sup.2): 33-46.
69. Fustinoni S, Campo L, Liesivuori J, Pennanen S, Vergieva T, et al. Biological monitoring and questionnaire to assess exposure to ethylenebisdithiocarbamates in a multicenter European field study. Human and Experimental Toxicology, 2008; 27: 681-691 DOI: 10.1177 / 0960327108100003.
70. Elkhansa Y, Mohamed A, AmelC, Mohamed S B. Biochemical and hematological changes after prolonged exposure to mancozeb. Adv. Biores., Vol 6 [2] March 2015: 83-86. DOI: 10.15515 / Apr.0976-4585.6.2.8386.
71. Faria NMX, Fassa AG, Facchini LA. Pesticide poisoning in Brazil: official information systems and challenges for conducting epidemiological studies. Science of collective health. 2007 Mar; 12 (1): 25-38

72. Mello CM, Silva LF. Factors associated with pesticide poisoning: a cross-sectional study with coffee plantation workers in southern Minas Gerais. *Epidemiol. Health Service*. 2013; 22 (4): 609-620.
73. Marroni NP Llesuy SF Oxidative and Antioxidant Stress. 2002. Ch2. 28-31
74. Ferreira KD, Brunoro NM, Gonçalves RD, Oliveira S, Rodrigues VP, Bressa J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev. Nutrition* Vol.23 NO.4 Campinas July / August. 2010 doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013.
75. Halliwell, B; Whiteman, M. Measurement of reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should it be done and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.*, V. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.
76. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Effects and general properties of hyperbaric oxygen. *Biochem J*. 1973 July; 134 (3): 707-16. doi: 10.1042 / bj1340707. PMID: 4749271; PMCID: PMC1177867.
77. Halliwell, B. and Gutteridge, JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*. 4th edition, Oxford University Press, New York.
78. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002 Jan; 82 (1): 47-95. doi: 10.1152 / physrev.00018.2001. PMID: 11773609.
79. Marroni NP, Morgan-Martins, MI Poawski, M. *Free radicals in the health-disease process: from the bank to the clinic*. Curitiba; Editorial CRV; 2012
80. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*. 1990; 9 (1) -32.
81. SIES, Helmut. Antioxidant defense strategies. *European journal of biochemistry*, v. 215, no. 2, p. 213-219, 1993.

82. Saks, M. Upreti, S., Rajendra, SV, and Dang R. (2017). Genotoxicity: Mechanisms, Test Guidelines, and Glob J PharmaceuSci Methods 1 (5): GJPPS.MS.ID.555575 (2017)
<https://juniperpublishers.com/gjpps/pdf/GJPPS.MS.ID.555575.pdf>
83. Franke SIR, Boeira JM, Erdtmann B, Henriques JAP, Genotoxicity of synthetic and natural agents, Toxicological Genetics, 2003, Editora Alcance. PP 307-321
84. Flores M, Yamaguchi A. Micronucleus test: an evaluation for genotoxic screening. Journal of Health Research. 2008; 1: 337-40.
85. Gontijo, Ammc, Tice, R; 2003. Comet test for the detection and repair of DNA damage in individualized cells. In: Ribeiro, IR; Salvadori, DMF, Marques, EK (Org.). Environmental mutagenesis. Canoas: Ulbrap. 173-200
86. Ross, GM, McMillan, TJ; Wilcox, P; Collins, AR, 1995. Single cell gel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Cancer Research Institute. Mutation Research, 337: 57-60
87. Tice, RR, Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, JC, Sasaki, YF, 2000. Single Cell / Comet Gel Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35: 206-22
88. Robles-Diaz M. Lucena MI Kaplowitz N. Stephens C. Medina-Caliz I. González-Jimenez A. et al. Use of Hy's law and a new compound algorithm to predict acute liver failure in patients with drug-induced liver injury. Gastroenterology 2014; 147: 109-118

89. Wahlang B. Beier JI Clair HB Bellis-Jones HJ Falkner KC McClain CJ et al. Steatohepatitis associated with toxic substances. *Toxicol Pathol.* 2013; 41: 343-360
90. Lundqvist G. Flodin U. Axelson O. A case-control study of fatty liver disease and organic solvent exposure. *Am J Ind Med.* 1999; 35: 132-136
91. Younes R. Bugianesi E. NASH in thin people. *Semin Liver Dis.* 2019; 39: 86-95
92. Mastrangelo G. Fedeli U. Fadda E. Valentini F. Agnesi R. Magarotto G. et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis in vinyl chloride workers: synergistic effect of occupational exposure with alcohol intake. *Environmental health perspective.* 2004; 112: 1188-1192
93. Paliard P. Valette PJ Berger F. Contassot JC Partensky C. Late-onset hepatic peliosis in a patient exposed to vinyl chloride and treated for hepatic angiosarcoma. *Gastroenterol Clin Biol.* 1991; 15: 445-448
94. Guido M. Sarcognato S. Pelletti G. Fassan M. Murer B. Snenghi R. Sequential development of hepatocellular carcinoma and hepatic angiosarcoma in a worker exposed to vinyl chloride. *Hum Pathol.* 2016; 57: 193-196

