

Efecto tóxico de la acrilamida en ratas Wistar hembra

Gaona Uribe Jessica Guadalupe, Chirino Galindo Gladys

Universidad Nacional Autónoma de México. Laboratorio del Metabolismo de la Diabetes Mellitus, Unidad de Morfología y Función. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Av. de los Barrios No. 1 Los Reyes Iztacala. Tlalnepantla. C.P. 54090. Estado de México, México.

*Autor para correspondencia: gchirinog@hotmail.com

Recibido:

17/mayo/2016

Aceptado:

31/agosto/2016

Palabras clave

Acrilamida, histología,
Rattus norvegicus

Keywords

Acrylamide, histology,
Rattus norvegicus

RESUMEN

La acrilamida se produce mediante la reacción de Maillard, la cual aporta sabor, color y aroma a los alimentos. Con el objetivo de evaluar su toxicidad se utilizaron 20 ratas Wistar hembra de 250 a 300 g de peso, las cuales fueron asignadas al azar a tres grupos que recibieron dosis de 1.4, 1.7 y 2 mg/kg al día, vía oral; más un grupo control sin acrilamida, por 21 días. Los resultados muestran una disminución en el peso corporal en los últimos días del tratamiento en los grupos con dosis de 1.7 y 2 mg/kg, y una baja producción de ovocitos en todos los tratamientos. Se reporta glomerulonefritis en el riñón, signos de cirrosis congestiva o hiperemia pasiva en el hígado, y en tejido cerebral se encontró inicio de neuropatía periférica. En base a los daños encontrados, se concluye que la acrilamida tiene alta toxicidad en ratas.

ABSTRACT

Acrylamide is produced across the Maillard reaction, which adds flavor, color and fragrance to foods. In order to evaluate acrylamide toxicity, 20 female Wistar rats, weighing 250 to 300 g were used. Females were randomly distributed in three groups, that received doses of 1.4, 1.7 and 2 mg/kg per day, orally; and a control group without acrylamide, for 21 days. The results shown a decrease in body weight in the last days of the treatment in the 1.7 and 2 mg/kg dose groups, and a low production of ovocytes in all treatments. In the tissues, of the organisms under treatment, glomerulonephritis in kidney was observed; the liver shown signs of congestive cirrhosis and passive hyperemia, and in brain beginning of peripheral neuropathy was found. With basis in the damages found in the tissues evaluated, the main conclusion is that acrylamide has high toxicity in rats.



Introducción

La alimentación tradicional a lo largo del tiempo, siempre ha sido integral y natural. La vida moderna ha degenerado nuestra alimentación a tal punto que, no sólo la ha privado de muchos de sus principios nutricionales, sino que, además, le ha agregado agentes extraños que perjudican la salud.

Es por ello que la incidencia de enfermedades crónicas no deja de aumentar. Los alimentos procesados y la llamada "comida basura" contienen sustancias altamente peligrosas como las nitrosaminas, el amoniaco, las aflatoxinas y las acrilamidas (Clínica Centro Granada, 2011).

La acrilamida es una sustancia que no se encuentra en forma natural en los alimentos, se produce durante la fritura de productos ricos en almidón, durante una serie de reacciones químicas denominadas Reacción de Maillard, la cual aporta sabor, color y aroma a los alimentos, deseables para la aceptación por parte del consumidor (García-López y Alfaro-Macedo, 2007).

La Food and Drugs Administration (FDA) encontró acrilamidas en más de 750 alimentos entre ellos las patatas fritas y aperitivos; los estudios de monitoreo indican que la acrilamida forma parte del 27.7% de los alimentos en la compra promedio norteamericana.

Debido a los recientes descubrimientos de la acrilamida en los alimentos y el alto consumo de alimentos fritos en la población mexicana, se puede esperar la aparición de efectos dañinos en personas expuestas a esta dieta (Infanzón, 2005).

Dentro de los alimentos que contienen acrilamidas, está el pan de caja, pastas, arroz, salsas, carnes, galletas, cereales, cerveza, pizza y productos a base de papas, maíz y harina. Casi la mitad de los mexicanos (49.3%) asocia la comida chatarra con las papas y frituras; este tipo de comida es consumido con mayor frecuencia entre hombres jóvenes de entre 18 y 29 años (Amrein et al., 2003; Gomar y Lauzurica, 2007).

Las acrilamidas también se forman cuando alimentos de origen vegetal, que contienen una gran cantidad de carbohidratos y pocas proteínas, se cocinan a altas temperaturas, superiores por lo general a 120°C (Valenzuela y Ronco, 2007).

Tras su ingesta, la acrilamida es absorbida rápidamente por el aparato digestivo y distribuida en los fluidos corporales. En 1985 la OMS estableció un valor de ingesta diaria tolerable (IDT) de 12 µg/kg de peso

corporal/día. La información disponible en la actualidad es insuficiente para hacer estimaciones sobre la ingesta total de acrilamida a través de la alimentación, algunos estudios indican que la ingesta podría ser hasta de 100 µg al día (Guibert 2011; Tareke et al., 2002).

En los seres humanos y en los animales, se sabe que la exposición a bajos niveles de acrilamida causa daño al sistema nervioso, también es considerada como un agente tóxico para las células somáticas y germinales, lo que le confiere propiedades mutagénicas y carcinogénicas. La neurotoxicidad es el riesgo más importante al ingerir acrilamida (Infanzón, 2005; Valenzuela y Ronco, 2007).

El uso de las ratas como modelos experimentales se debe, a que las ratas y ratones están entre los animales que responden más uniformemente a esos requerimientos, son de fácil manejo y poseen las características zootécnicas adecuadas (Osorio-Rosenkranz, 2006).

En 2005 un Comité Mixto de Expertos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), determinaron el NOAEL (Nivel sin efecto adverso observable) para la acrilamida en dosis de 2 mg/kg al día.

Benítez et al. (2004) encontraron que la acrilamida a dosis de 25 y 100 mg/kg de peso, produce severos cambios en los marcadores hepáticos enzimáticos en ratones adultos, que la acrilamida ejerce una acción tóxica sobre la estructura del parénquima hepático, y que la viabilidad se afecta dependiendo de la dosis.

Koyama et al. (2011) demostraron que había mayor rango de incidencia de acrilamida dependiendo de la edad (3 a 11 semanas), las ratas fueron tratadas durante un mes por vía oral, con dosis de 20, 40 y 80 ppm; los resultados no fueron significativos en tiroides y glándulas mamarias, sin embargo, a 80 ppm en hígado y testículo si se produjo daño, ya que se produjo un aumento de la actividad de GPT al doble, solo en ratas jóvenes de tres semanas.

Sánchez et al. (2009) determinaron el efecto de microalga en un modelo de neuropatía axonal en ratas inducida por acrilamida, la cual fue administrada vía subcutánea con dosis de 70 µg/kg, y se produjo hipotonía muscular, flacidez en la cola y arrastre en extremidades; en la fase recuperativa se administró a un grupo, una dosis de 400 mg/kg de acrilamida + spirulina, y la proporción de animales afectados se redujo en su totalidad.

Besaratinia y Pfeifer (2013) evaluó la genotoxicidad de la acrilamida y su metabolito la glicidamida, en células epiteliales humanas y fibroblastos de ratón tratadas con diferentes dosis de ambos (50 nM, 500 nM, 5 µM, 500 µM, 5 mM, y 10 mM) respectivamente, durante 4 horas, y encontró que la glicidamida es responsable de mutagénesis ya que produce aductos de DNA.

Los resultados de diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la exposición a acrilamida puede producir efectos cancerígenos y alteraciones en el sistema reproductivo, nervioso y genético, sin embargo, no se dispone de los suficientes estudios epidemiológicos y toxicológicos que permitan establecer una relación entre la presencia de acrilamida en los alimentos con el desarrollo de alguna enfermedad. Ya que se han reportado en múltiples estudios los efectos tóxicos que la acrilamida provoca en el sistema nervioso, en células germinales y somáticas, se espera que a diferentes concentraciones provoque alteraciones en la estructura histológica de diversos órganos de ratas hembra.

Metodología

Reactivos

Todos los reactivos empleados en este trabajo fueron de las marcas Sigma Chemical Co, Merck o J.T. Baker, y se obtuvieron por el Módulo de Metodología Científica de la FES Iztacala.

Material Biológico

Se obtuvieron 20 ratas hembra (*Rattus norvegicus*) con un rango de peso de 250 a 300 g en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, y se asignaron al azar en cuatro grupos de 5 individuos. Los organismos se mantuvieron a temperatura de 22-23 °C, con 50-60% de humedad ambiental relativa, ciclos luz: oscuridad de 12:12 iniciando a las 8:00 AM, con agua y alimentación (Harlan 2018s) ad libitum.

Tres grupos fueron sometidos a administración de acrilamida (Merck) de 1.4, 1.7 y 2 mg/kg por día, durante 3 semanas, por vía oral, ya que se ha reportado que a dosis de 2.0 mg/Kg se inducen tumores en distintos órganos de roedores (Guibert, 2011). El volumen que se les administró a los organismos fue de 100 µL; mientras que al control se le administró solamente agua (el vehículo donde se disolvió la acrilamida).

Procesamiento de Material Biológico

Al término de las tres semanas, se sacrificaron las ratas con sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/Kg de peso), se realizó una laparotomía y se extrajeron los ovarios, los riñones y el hígado. El cráneo se abrió y se extrajo el cerebro.

Los ovarios se colocaron en solución salina en frío para el conteo de ovocitos bajo el microscopio estereoscópico Leica MZ6.

El resto de los órganos se separaron por tratamiento y se fijaron con alcohol al 70% en baño frío. Se utilizó la técnica histológica convencional de deshidratación, aclaramiento, inclusión, imbibición, inclusión, corte y tinción H y E (Barrera et al., 2010).

Se observaron las muestras con un microscopio óptico Leica DM500, acoplado a una cámara fotográfica Leica ES3. Y se tomaron diversas fotografías.

Resultados y discusión

Peso corporal

Este parámetro se mantuvo en constante cambio. El grupo control fue menos variable, los grupos con dosis 1.7 y 2 mg/kg tuvieron cambios más pronunciados, esto podría ser efecto de la acrilamida sobre los organismos, ya que, el peso final con respecto al peso inicial es mucho más bajo, por lo cual se puede decir que los miembros de estos tratamientos sufrieron una baja de peso del día 1 al día 21. Mientras que el peso final en el control y el tratamiento 1.4 mg/kg es mayor al peso inicial (Figura 1).

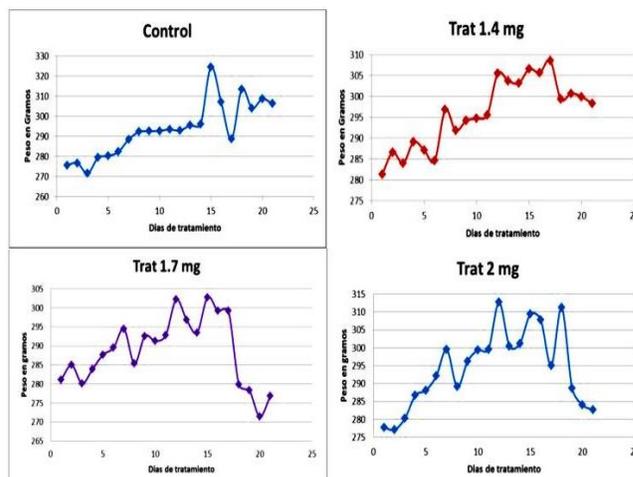


Figura 1. Peso de las ratas bajo tratamiento con acrilamida durante el experimento.

Nuestros datos no coinciden con Sánchez et al. (2009) quienes reportan que no hubo diferencias significativas en el peso corporal entre los diferentes grupos a lo largo de su investigación, esto podría estar relacionado con los inhibidores del metabolismo energético y la anaerobiosis los cuales hacen que aumente el peso de los tejidos por el incremento de agua intracelular (Contreras, 1989), lo cual puede verse en que los hígados de nuestros tratamientos mostraron un aumento de peso con respecto al grupo control, esto con base a que algunas sustancias químicas como la acrilamida pueden convertirse en metabolitos tóxicos reactivos que pueden provocar lesión en la membrana y en el citosol por enlace covalente directo con las proteínas y lípidos de membrana, lo que provoca la formación de radicales libres y por consiguiente la peroxidación lipídica (Contran et al., 1999).

Esto coincide con lo reportado por Gay et al. (1994) quienes marcan que una mayor pérdida de peso corporal, está relacionada con el inicio de neuropatía causada por consumo de acrilamida según lo encontrado por Braojos y Lampurlanés (1998).

Ovocitos

Los ovocitos de los tratamientos 1.7 y 2 mg/kg, fueron menos en comparación con el control. Esto coincide con lo reportado por Koyama et al. (2011) que marcan un daño en los testículos de ratas. La disminución en la producción de ovocitos se puede ver afectada por la incidencia de insuficiencia renal y hepática, así como enfermedades mentales y tóxicos químicos como es el caso de la acrilamida, ya que se daña el funcionamiento del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas (De la Parra et al., 2013). En la figura 2 se observa el número de ovocitos recuperados por tratamiento.

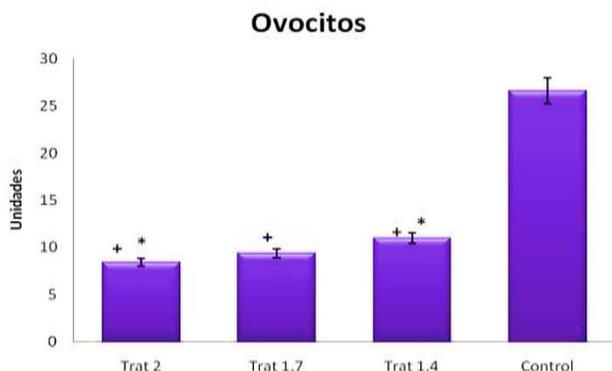


Figura 2. Conteo de ovocitos por efecto de tratamiento con acrilamida [Promedio ± desviación estandar de 5 determinaciones. +P < 0.05 con respecto al control, *P < 0.05 entre los distintos grupos].

Hígado

En los hígados se presentó una congestión (hiperemia pasiva), esto se debe a la disminución del flujo venoso sanguíneo desde una área, se caracteriza por dilatación de venas y capilares, los tejidos presentan color rosa o rojo, fenómeno conocido como eritema, las lecciones hepáticas varían según la intensidad y la duración de la congestión en este caso es un hígado cardiaco fase uno, ya que la superficie fue lisa, de color café rojizo microscópicamente las venas centro lobulillales y los capilares sinusoidales vecinos están muy dilatados y llenos de sangre, con atrofia de los hepatocitos centro lobulillares (Contran et al., 1999).

Con respecto al tratamiento de 2 mg/kg de acrilamida se observa un carcinoma fibrolaminar, que suele formar un único tumor grande y duro, con bandas fibrosas que lo atraviesan. histológicamente, está formado por células poligonales bien diferenciadas que crecen formando nidos o cordones, separados por láminas paralelas de haces densos de colágeno (Contran et al., 1999), resultados que coinciden con los de Benitez et al. (2004) quienes reportan un serio daño en el hígado en la administración más alta de acrilamida.

Las características en los cortes histológicos de hígado del grupo 1.7 y 2 mg/kg muestran signos de cirrosis congestiva (Figura 3) que es producida por una congestión pasiva, prolongada grande o intermitente.

Las cirrosis tienen como patrón tener una cicatrización difusa, lesiones necróticas de manera inconstante, entre otras características (Contreras, 1989) con base a lo reportado por Zafar et al. (2009) quienes microscópicamente, en el hígado encontraron congestiones en las venas porta y los sinusoides con una degeneración de los hepatocitos centrolobulillares en el estudio de la alteración de la morfología del hígado en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina.

Riñón

Los riñones de los grupos a los que se les administró acrilamida presentaron glomerulonefritis, que es caracterizada por la inflamación de los glomérulos por la filtración de proteínas provenientes del torrente sanguíneo y por la proliferación de células glomerulares, como lo describen Argote et al. (2004).

En la muestra de riñón de 1.7 y 2 mg/kg se muestra una glomerulonefritis con semilunas (Figura 4). Una semiluna epitelial es una proliferación de las células epiteliales que revisten la cápsula de Bowman; al aumentar el tamaño de las semilunas, estas comprimen

el penacho glomerular que se encoge y se vuelve afuncional.

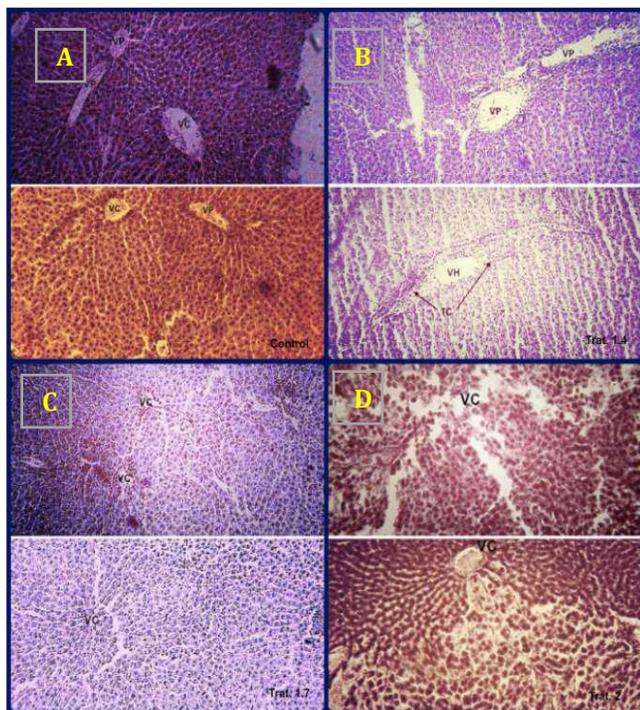


Figura 3. Cortes histológicos de hígado de cada tratamiento 10 X tinción H y E. A: control; B: tejido de ratas sometidas a acrilamida 1.4 mg/Kg; C: hígado de ratas sometidas a 1.7 mg/Kg; D: hígado de ratas tratadas con 2.0 mg/Kg.

En el estudio de la glomerulonefritis proliferativa, la presencia de gran número de glomérulos con semilunas indica rápida progresión a insuficiencia renal (Stevens and Lowe, 2001) mismos que coinciden con Mohammad et al. (2009) quienes reportan una suave congestión en los glomérulos, congestión focal y vacuolar, así como la degeneración de células tubulares ocasionados por la exposición a formaldehído.

Cerebro

Durante el sacrificio, el grupo control mostró mayor resistencia ante el pentobarbital sódico, y en cuanto a movimiento post mortem se observaron mayor cantidad de reflejos que en los otros grupos con tratamiento de 1.4, 1.7 y 2 mg/kg, lo que indica un daño a nivel de sistema nervioso ya que los xenobióticos o sus metabolitos, son responsables de este efecto adverso como resultado de la interacción directa con el SNC (Regidor y Solans, 1998) por otra parte, la sintomatología observada fue variada dependiendo de si la exposición a estos es aguda o crónica, en la extracción del cerebro se observaron variaciones en el grueso del cráneo.

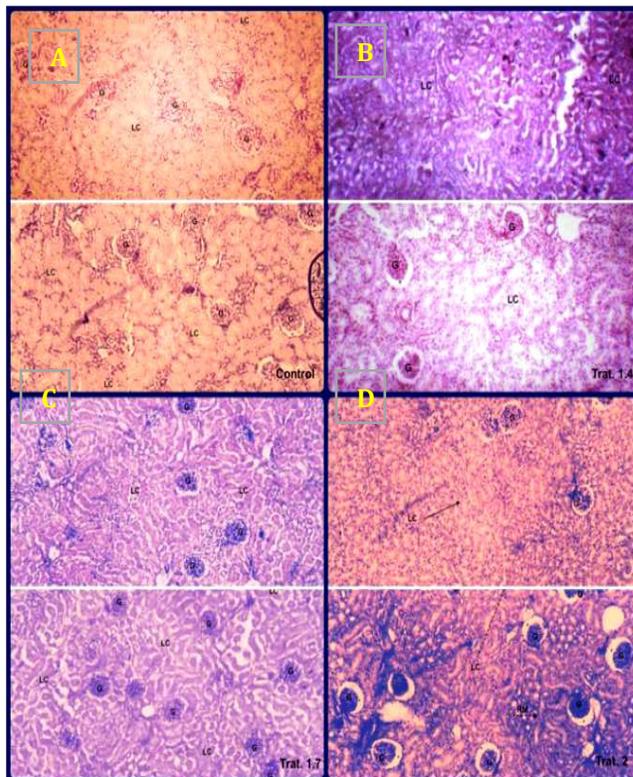


Figura 4. Cortes histológicos de riñones de rata hembra sometidas a tratamiento con acrilamida. A: control; B: tejido de ratas sometidas a acrilamida 1.4 mg/Kg; C: riñón de ratas sometidas a 1.7 mg/Kg; D: riñón de ratas tratadas con 2.0 mg/Kg.

En los tratamientos la estructura del cráneo era un tanto frágil y en el grupo control el cráneo era más resistente, al igual que los músculos maxilofaciales, en el grupo control, eran más fibrosos en comparación con los tratamientos. Los resultados muestran lo que podría llamarse el inicio de una neuropatía periférica, ya que las neuropatías periféricas pueden aparecer tras la exposición a productos químicos industriales, o ambientales, a toxinas biológicas o a fármacos, mismas que se caracterizan con placas amarillentas que corresponden a zonas de necrosis y mineralización de sustancia blanca (Contran, 1999). Datos similares a los que mencionan Gay et al. (1994) que relacionan el principio de una neuropatía, con la pérdida de peso corporal y la disminución de tejido muscular.

A nivel histológico, los cerebros de ratas con tratamiento 2 mg/kg presentaron alargamiento de células piramidales, hinchazón de capilares y en el tratamiento 1.7 mg/kg se muestra una ausencia de tejido y células piramidales en menor cantidad, lo cual coincide con Nascimento et al. (2012) y Said (2007) quienes caracterizaron por presentar una distribución

multifocal, con alargamiento de nervios (ulnar y fibular) como una neuropatía axonal y sensorial ya que los nervios, presentaron células mononucleares inflamadas, vasículas epineurales alrededor, indicando microvasculitis, así como pérdida de nervios fibrosos y degeneración axonal (Figura 5).

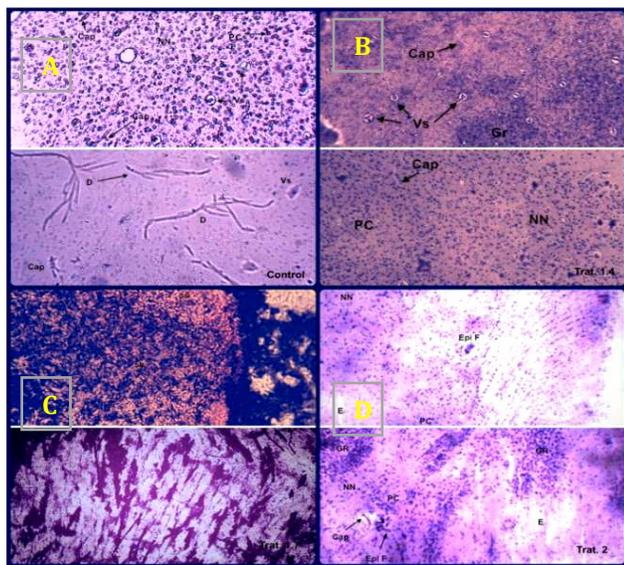


Figura 5. Cortes histológicos de cerebro de cada tratamiento 10X tinción H y E. A: control; B: tejido de ratas sometidas a acrilamida 1.4 mg/Kg; C: cerebro de ratas sometidas a 1.7 mg/Kg; D: cerebro de ratas tratadas con 2.0 mg/Kg.

Conclusiones

La acrilamida es un tóxico en ratas hembra a dosis de 1.4, 1.7 y 2mg/kg al día, siendo el rango de 1.7 a 2mg/kg al día los más dañinos para el organismo.

El consumo de acrilamida en dosis de 2, 1.7 y 1.4 mg/kg por día, provoca una marcada disminución en la producción de ovocitos.

La acrilamida daña significativamente el hígado de una forma severa en tratamientos con 2 mg/kg y 1.7 mg/kg por día.

En el cerebro la acrilamida provoca una disminución en las células piramidales y la neuroglia en dosis de 1.7 y 2mg/kg.

El riñón experimenta glomerulonefritis en dosis de 1.7 y 2mg/kg al día de acrilamida.

Se sugiere repetir la investigación, aumentando el tiempo de exposición a la acrilamida.

También se sugiere utilizar algún componente químico para revertir los daños en los órganos afectados.

Se propone para estudios posteriores evaluar la viabilidad de los ovocitos o el efecto teratogénico de la acrilamida.

Agradecimientos

Al Dr. Martín Palomar, por permitirnos el uso del micrótopo y los microscopios óptico y estereoscópico, así como por la revisión crítica del presente reporte.

Al M. en C. Fernando Barrón Moreno, del Bioterio de la FES-I por las facilidades prestadas en la obtención y manipulación de los organismos.

Al personal del T.E.L.E de la FES-I, en especial al Biól. José Martínez Aguilar (R.I.P.) por su colaboración para la obtención del material.

A Laura Ramos, Andrea Colis, Gloria Lona y Alfonso Tovar por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Referencias

Argote E., Castro A.L., y Otero L.M. (2004). Glomerulonefritis. *Colombia Médica*, 35(1): 38-45.

Amrein T.M., Bachmann S., Noti A., Biedermann M., Ferraz M., Biedermann B.S., Grob K., Keiser A., Escher P.F. y Amadó R. (2003). Potential of Acrylamide Formation, Sugars, and Free Asparagine in Potatoes: A Comparison of Cultivars and Farming Systems. *J. Agric. Food Chem* 51: 5556-5560.

Barrera M., Canales M.M., Camarena G., Castillo I., Fregoso M.L., García A.M., González D., Hernández C.T., Martínez J., Muñoz A., Palomar M., Segura B., Vilches A.A. (2010). Métodos de Laboratorio. 1^{era} Ed. Fes Iztacala UNAM. p. 37-52.

Benites C., Lucas A., Aispurú G., Alvarez M., Llanos I., Quintana R., Miño C., Aguirre M., Brandan N. (2004). Efectos de un potencial hepatotóxico: la Acrilamida Monomérica, en un modelo murino. Facultad de Medicina U.N.N.E. Argentina

Besaratinia A., Pfeifer G.P. (2004). Genotoxicity of acrylamide and glycidamide. *J. Nat. Cancer Inst.* 96 (13): 1023-1029.

Braojos L.R., Lampurlanés X.S. (1998). NTP 487: Neurotoxicidad: agentes neurotóxicos. Ministerio de trabajo y asuntos sociales de España.

Contreras R. (1989). Anatomía Patológica General. 1^{era} Ed. interamericana. pp. 63-69, 93, 264, 273.

Contran R.S., Kumar V., Collins T. (1999). Patología Estructural y Funcional. 1^{era} Ed. Mc GrawHill. p. 7-16, 887- 929, 991-1010, 1349-1380.



- Clínica Centro Granada (2011). Alimentación actual y enfermedad crónica. Recuperado el 8 de agosto del 2013 de <http://clinicacentrogranada.blogspot.mx/2013/03/alimentacion-actual-y-enfermedadcronica.html>
- De la Parra I., Oizerovich S., De Fernandez M. Alteraciones del eje reproductivo por enfermedades crónicas o sistémicas, sustancias tóxicas y drogas ilícitas. (s.f.) Recuperado el 27 de noviembre del 2011 de <http://gineadol.com.ar/Documentos/Alteraciones%20del%20eje%20reproductivo.pdf>
- FAO-OMS (2002). Las concentraciones de acrilamida en los alimentos y sus posibles efectos en la salud pública. Ginebra. Recuperado el 13 de agosto 2011 de <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2005/n06/en/>
- García-López A., Alfaro-Macedo M.P. (2007). Acrilamida en alimentos para consumo humano. *Rev. Sanid. Milit. Mex.* 61(6): 384-388.
- Gay J., Porrata C., Hernández M., Clúa A., Arguelles J. (1994). Factores dietéticos de la neuropatía epidémica en la Isla de la Juventud, Cuba. *Bol. Of. San. Panam. (OSP)*; 117(5): 389-399.
- Guibert R.J. (2011). Acrilamida. Memorias del curso de Toxicología y Química forense de la Universidad de Belgrano. Argentina. Recuperado el 10 de agosto de 2013 de http://www.ub.edu.ar/revistas_digitales/Ciencias/Vol12Numero2/Articulo_acrilamida.pdf.
- Infanzón R.M. (2005). Toxicidad en los alimentos: la acrilamida. *La ciencia y el hombre*, No. 2, p. 47-52.
- Koyama N., Yasui M., Kimura A., Takami S., Suzuki T., Masumura K. (2011). Acrylamide genotoxicity in young versus adult GPT delta male rats. *Mutagenesis* 26 (4): 545-549.
- Lauzurica Z.L., Gomar J. (2007). Acrilamida en patatas fritas y productos de aperitivo elaborados en la Comunidad Valenciana. *Gac. Sanit.* 21(4): 334-337.
- Mohammad J., Azarhoush R., Ghafari S., Davaria A., Amirhossein, S. (2009). Can formaldehyde exposure induce histopathologic and morphometric changes on rat kidney? *Int. J. Morphol.* 27(4): 1195-1200.
- Nascimento O., de Freitas M., Escada T., Marques W., Cardoso F., Pupe C., Duraes S. (2012). Leprosy late onset neurophaty: an uncommon presentation of leprosy. *Arq. Neuropsiquiat.* 70(6): 404-406.
- Osorio M., Rosenkranz A. (2006). Guía para el uso de animales de laboratorio I. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. p. 325-331
- Regidor L., Solans X. (1998). Neuro toxicidad: agententes neurotóxicos. España. Recuperado el 12 de agosto 2011 de http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/401a500/ntp_487.pdf
- Said G. (2007). Focal and multifocal diabetic neuropathies. *Arq. Neuropsiquiatr.* 65 (4-B): 1272-1278.
- Sánchez N., Wong M., Pérez-Saad H., León N., García J.D. (2009). Efecto de Spirulina platensis en la neuropatía axonal inducida por acrilamida en ratones. *Rev. Cub. Plant Med.* 34(1) 1-8.
- Stevens A., Lowe J. (2001). Anatomía patológica. 2 ed. Harcourt. p. 359-368.
- Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson P., Törnqvist M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4998-5006.
- supercapacitor electrodes. *J. Mater Chem.*, 22: 23439-23446.
- Xu L., Cheng L. (2013). Graphite Oxide under High Pressure: A Raman Spectroscopic Study. *Journal of Nanomaterials.* 47: 508-516.
- Zhu Y., Murali S., Stoller M. D., Velamakanni A., Piner R. D., Ruoff R. S. (2010). Microwave assisted exfoliation and reduction of graphite oxide for ultracapacitors. *Carbon.* 48: 2106-2122.
- Valenzuela, B. R. y Ronco, A-M. (2007). Acrilamida en los alimentos. *Rev. Chil. Nutr.* 34 (1): 8-16.
- Zafar M., Naeem-Ul-Hassan Naqvi S., Ahmed M., Kaimkhani Z. (2009). Altered liver morphology and enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. *Int. J. Morphol.*, 27 (3): 719-725.