

Título: Efectos sobre la integridad del endotelio vascular asociados a la exposición crónica a plaguicidas.

Autor: Lic. Thayde Trujillo Tirado*

Dr. Ineldo Ruiz Arcia**

*Licenciada en Ciencias Farmacéuticas, Máster en Ciencias “Toxicología Experimental”

Categoría docente: Profesor Auxiliar Adjunto Universidad Ciego de Ávila (UNICA)

Centro de Trabajo: Centro para la Salud y el Desarrollo (CENSAD).

Dirección del centro: Politécnico Ramón Paz Borroto, 4^{to} piso, Venezuela, Ciego de Ávila.

Teléfono: 9-1572 y 9-1575.

e-mail: informacion@toxiv.cav.sld.cu

Dirección particular: Carretera El Centro #7, Gaspar, Ciego de Ávila.

**Doctor en Medicina, Aspirante a Doctor en Ciencias.

Centro de trabajo: Centro para la Salud y el Desarrollo (CENSAD).

Dirección particular: Edificio 14, Apartamento 15, Micro Venezuela, Ciego de Ávila.

Efectos de la exposición a plaguicidas

RESUMEN

La exposición crónica a plaguicidas afecta no solo la salud de los trabajadores agrícolas, sino también la de los habitantes de poblaciones rurales, localizadas en áreas inmediatas a la diseminación del plaguicida. Por eso nos trazamos el objetivo de evaluar el efecto de la exposición crónica a plaguicidas sobre el endotelio vascular de individuos ambiental y ocupacionalmente expuestos.

Se determinaron colesterol, glicemia, óxido nítrico, malonildialdehído y se realizó conteo de células endoteliales circulantes en sangre a 20 individuos ocupacionalmente expuestos a plaguicidas, 20 individuos ambientalmente expuestos, 40 controles del municipio Venezuela y 40 controles de un área urbana, todos de la provincia Ciego de Ávila.

Se observaron niveles significativamente más elevados de malonildialdehído, óxido nítrico y de las células endoteliales en los individuos expuestos con respecto al grupo control del área urbana. Estos resultados indican que la exposición crónica ambiental y ocupacional a plaguicidas indujo peroxidación lipídica y daño vascular.

Palabras claves: plaguicidas, exposición crónica, endotelio vascular, peroxidación lipídica, óxido nítrico, malonildialdehído, células endoteliales.

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas a pesar de ser útiles para el desarrollo y bienestar de los pueblos, son potenciales negativos para la salud humana y ambiental (1). Se ha demostrado que la exposición crónica a ellos no solo afecta al aplicador, sino también produce un impacto adverso sobre la salud de las personas que habitan en poblados rurales, localizados en áreas inmediatas a la diseminación del plaguicida.(2) Se han observado, entre otros efectos, peroxidación lipídica (POL) y citotoxicidad. (3,4,5)

El endotelio vascular presenta un proceso continuo de renovación del endotelio sano, siendo mayor esta renovación en áreas expuestas a un gran estrés hemodinámico y en áreas donde ha sido dañado el endotelio. La cuantificación de las carcasa nucleares de las células endoteliales (CE) circulantes en sangre se ha considerado un indicador del estado del endotelio vascular. (6,7,8,9)

Por todo lo planteado es que el objetivo de este trabajo es evaluar algunos efectos que sobre la integridad del endotelio vascular produce la exposición crónica a plaguicidas en individuos ambiental y ocupacionalmente expuestos, residentes en el municipio Venezuela, provincia Ciego de Ávila; mediante la evaluación de la incidencia de la peroxidación lipídica (POL) sobre el daño vascular y la determinación del daño al endotelio vascular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Universo de trabajo: Estuvo constituido por 120 individuos, 80 del municipio Venezuela y 40 de un área urbana del municipio Ciego de Ávila, provincia Ciego de Ávila. Se conformaron para el estudio 5 grupos; el grupo 1 está compuesto por 20 trabajadores agrícolas aplicadores de plaguicidas (ocupacionalmente expuesto); el grupo 2 por 20 personas que habitan en un área altamente contaminada por plaguicidas, aledaña a un almacén de estos productos (ambientalmente expuestos), los grupos 3 y 4 son grupos controles, formados cada uno por 20 habitantes del municipio Venezuela y pareados con los grupos 1 y 2, respectivamente. El grupo 5 (control) está compuesto por 40 personas habitantes del área urbana donde no debe haber contaminación con plaguicidas y se encuentran pareados con los individuos de los grupos 1 y 2.

Para cada uno de los grupos expuestos se conformó un grupo control, constituido por individuos supuestamente sanos y que no habitan en el área altamente contaminada, los que fueron seleccionados pareados con cada uno de los individuos expuestos con igual sexo, igual o similar edad \pm 3 años, ausencia de antecedentes de exposición ocupacional a plaguicidas y hábito de fumar. Se excluyeron los individuos con Diabetes Mellitus e hiperlipidemias y los que estaban recibiendo tratamiento inmunosupresor y/o antioxidante.

Ambiente: No se utilizan los medios de protección en la preparación ni en la aplicación de los plaguicidas. Los plaguicidas más utilizados pertenecen a los grupos Organofosforados (OF), Piretroides, Bipiridilos, Carbamatos, Derivados de las Triazinas, Derivados del ácido fenoxiacético, Organoclorados (OC) y Fungicidas. El almacén está ubicado en una Pista de Aviación Agrícola, alrededor de la cual existen diversas casas de familia y una fuente de abasto de agua. Se percibe el olor a ellos, aproximadamente, desde 300m a la redonda.

Para esta investigación se obtuvo el consentimiento escrito de los participantes, convocados de forma voluntaria e informados oportunamente de los resultados.

Estudios realizados: A todos los grupos estudiados se les realizaron las siguientes evaluaciones:

Evaluaciones complementarias para el estudio: Se realizaron determinaciones de colesterol y glicemia, ya que la hiperlipidemia y la Diabetes Mellitus fueron tomadas como patologías excluyentes por su íntima relación con la evaluación del endotelio vascular. El colesterol se determinó por el método de Pearson, utilizando reactivos distribuidos por la Industria médico Farmacéutica (IMEFA). La glicemia mediante un glucómetro comercializado por la firma Bayer.

Determinación de indicadores bioquímicos relacionados con el daño vascular: Se determinaron malonildialdehído (MDA) y óxido nítrico (NO). El NO se determinó en el Laboratorio de Farmacología del Centro de Química Farmacéutica (CQF). Se empleó la reacción de Griess y se realizaron determinaciones espectrofotométricas en lector de microplacas SUMA (10). El MDA se determinó en el CENATOX, por el método colorimétrico, utilizando un espectrofotómetro. (11)

Evaluación del endotelio vascular: Se realizó mediante el conteo de las carcasas nucleares de las células endoteliales decamadas circulantes en sangre (CE), obtenidas por centrifugación diferencial, utilizando el método descrito por Hladovec y Rossman en 1973. Se realizó el conteo en cámara de Fuchs Rosenthal, bajo microscopio óptico Olympus, con lente de 40X. Los resultados fueron expresados como el promedio de dos conteos en 1 mL de plasma rico en plaquetas (PRP). Estas determinaciones se realizaron en la Facultad de Ciencias Médicas de Ciego de Ávila.(12)

Análisis estadístico: Cuando los datos presentaron distribución normal y homogeneidad de varianzas, se empleó la prueba estadística “t” de Student, si no cumplían estas condiciones, se utilizaron las pruebas no paramétricas Kruskal Wallis y la Comparación Múltiple de Dunn’s. Se realizó la prueba de correlación de Spearman para las variables correlacionadas.

RESULTADOS

Los 20 individuos del grupo 1 pertenecen al sexo masculino. De las personas del grupo 2, 15 pertenecen al femenino y 5 al masculino. El 65% del grupo 1 fuma y del 2 sólo el 15%. El 50% del grupo 1 se encuentra entre los 0 y 5 años de exposición, el 25% entre 6 y 10, el 10% entre 16 y 20 y más de 20 y el 5% entre 11 y 15 años. El 30% del grupo 2 se encuentra entre los 6 y 10 años y más de 20 años de exposición, el 20% entre 11 y 15 y el 10% entre los 0 y 5 y los 16 y 20 años.

Evaluaciones complementarias: Los resultados de colesterol y glicemia se observan en la tabla # 1. En ambos, las medias de todos los grupos se encuentran entre los valores normales (3.9-6.5mmol/L y 3.9-5.7mmol/L, respectivamente). La comparación estadística no arrojó diferencias significativas en ninguna de las dos pruebas.

Determinación de indicadores relacionados con el daño vascular: En la tabla # 2 serán observados los resultados de NO, MDA y del conteo de las CE/mL de PRP.

Óxido Nítrico (NO): La comparación estadística de los valores de NO del grupo 5 con los de los grupos 1, 3 y 4 arrojó diferencias significativas con $p < 0.001$, para todos los casos. Teniendo en cuenta un estudio anterior con pacientes sanos y sépticos (valores normales hasta 50 $\mu\text{g/L}$) las medias de los grupos 1, 2, 3 y 4 se encuentran muy por encima de los valores normales, la del grupo 5 sólo ligeramente por encima.

Malondialdehído (MDA): cuando comparamos estadísticamente los valores de MDA del grupo 5 con los restantes se obtuvieron diferencias significativas con una $p < 0.01$ al comparar con el grupo 1 y $p < 0.001$ con los grupos 2, 3 y 4. Las medias de los grupos 1, 2, 3 y 4 se encuentran por encima de los valores normales (hasta 2.70 $\mu\text{mol/L}$).

Células Endoteliales (CE): La comparación estadística entre las medias del conteo de las CE de los grupos expuestos y todos los grupos controles fue significativa; entre los grupos 1 y 3 $p < 0.01$, entre 2 y 4 $p < 0.05$, entre 1 y 5 $p < 0.001$ y entre 2 y 5 $p < 0.001$. Al comparar ambos grupos controles de la zona rural (3 y 4), con el grupo control del área urbana (5), se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.001$) para ambos casos. Las medias de los grupos 1, 2, 3 y 4 se encuentran por encima de los valores normales (400 cél/mL), la del grupo 5 se encuentra solo ligeramente por encima. No se encontró correlación lineal entre ninguna de las variables relacionadas.

DISCUSIÓN

Se considera que el evento inicial de la aterogénesis es el daño a la pared vascular, después ocurre la ruptura de la placa, la trombosis y por último el infarto del tejido. Existe una relación de causa entre estos eventos y el estrés oxidativo en la pared vascular.(13)

Nosotros encontramos daño vascular asociado a la exposición a plaguicidas, en personas ambiental y ocupacionalmente expuestas, incluso en individuos que no habitan en el área inmediata a la diseminación del plaguicida, además obtuvimos valores significativamente elevados de MDA y NO de estos individuos con respecto al grupo control, los valores elevados de MDA indican POL y el NO está muy relacionado con la función de las CE, lo que sugiere que estos factores pudieron contribuir al daño endotelial observado.

Se ha reportado que metabolitos formados a partir de plaguicidas de los grupos OF, OC y Bupiridilos inducen POL (aumento en los niveles de MDA) y citotoxicidad, por lo que el proceso de POL puede participar en el efecto citotóxico de estos xenobióticos.(3,4,5) Varios plaguicidas a los que están expuestos los individuos estudiados, pertenecen a los grupos antes mencionados, que pueden haber inducido POL y provocado el aumento en los niveles de MDA, encontrados en el estudio.

Se reporta que el exceso de NO ejerce efecto citotóxico por reacción con superóxido, para producir el peroxinitrito, anión altamente tóxico que oxida varias proteínas intracelulares.^{14,15} Se plantea que cuando el NO es producido por acción de la Óxido nítrico sintetasa inducible (ONSi) causa daño celular (citotoxicidad y/o apoptosis)^{10,16}. Drummond y cols plantean que las especies reactivas de oxígeno (EROs) podrían modular la expresión de la Óxido nítrico sintetasa endotelial (ONSe), por lo que las EROs producidas a partir de la exposición a plaguicidas pueden haber modulado la expresión de esta enzima, aumentando la producción de NO.(17)

La población estudiada, tanto ambiental como ocupacional, está expuesta a una atmósfera heterogénea de plaguicidas, entre ellos bupiridilos, OF y OC, cuyos metabolitos son potencialmente generadores de radicales libres (RL). El posible mecanismo de daño a nivel del endotelio pudiera estar vinculado a la generación de estos RL que producen POL a nivel de las membranas de las CE, generando daño endotelial y a su vez las EROs podrían haber modulado la expresión de la ONSi, aumentando la producción de NO, el que puede reaccionar con el superóxido generado por los metabolitos de algunos plaguicidas para producir el radical peroxinitrito, altamente citotóxico, por tanto la activación de la ONSi puede estar involucrada en la muerte oxidativa de las CE, produciéndose una denudación endotelial, que puede estimular la actividad de la ONSi de la pared vascular, ocurriendo de esta manera un ciclo continuo de daño tóxico celular.

Consideramos que el hábito de fumar pudo incidir en la respuesta endotelial pero en nuestro estudio el por ciento de fumadores es igual en los grupos controles y en los expuestos.

Estos resultados nos hacen suponer que el endotelio responde de manera rápida y sensible a la toxicidad de los plaguicidas, siendo fácilmente identificable la lesión por la técnica utilizada. La detección en sangre periférica de las CE decamadas de los vasos debe ser un buen marcador de la lesión decamativa. De una simple muestra de sangre es ahora posible aislar y cuantificar las CE circulantes presentes en varias patologías asociadas con el daño vascular. (18)

Debido a la importancia biológica del endotelio vascular se hace necesario detectar tempranamente el daño a ese nivel, con el objetivo de poder actuar sobre él, provocando la reversibilidad del mismo, evitando así las lesiones posteriores que se pueden producir tanto en este como en otros órganos, pues se ha demostrado que al detectar tempranamente la

lesión, esta puede ser reversible con un tratamiento adecuado, como es el caso de los antioxidantes. (19,20,21)

CONCLUSIONES

La exposición crónica a plaguicidas en individuos ambiental y ocupacionalmente expuestos, residentes en el municipio Venezuela, provincia Ciego de Ávila no provocó alteraciones significativas en los biomarcadores metabólicos colesterol y glucosa, pero sí se evidenció el daño sobre la integridad del endotelio vascular y peroxidación lipídica, la que pudiera estar relacionada al daño vascular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Eirin, A. F., Moya, R. B. Los plaguicidas en el mundo a finales del presente siglo y algunas consideraciones sobre los riesgos en su uso. ZENECA SENACHEM MINAZ.
2. Mairing, J. Evaluación del Riesgo por Exposición a Plaguicidas. OPS. OMS. México.1997.
3. Jones GM, Vale JA. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of diquat poisoning: a review. Clin Toxicol 2000; 38 (2): 123-8.
4. Suzuki T, Komatsu M, Isono H. Cytotoxicity of organochlorine pesticides and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. Biol Pharm Bull 1997; 20 (3): 271-4.
5. Poovals VS, Huang H, Salahudeen AK. Role of reactive oxygen metabolites in organophosphate–bidrin-induced renal tubular cytotoxicity. J Am Soc Nephrol 1999; 10(8): 1746-52.
6. Friman, M.B. Effect of CNIC-4 (Lobenzarit) on Circulating Endothelial Cells of rats. Proc-6th In. Dresden. Lipid. Symp. Lipoprotein and Atherosclerosis Res. Diag. Treat. 1998.
7. Cassaco, A. Interference of Levamisole with Forssman Shock. Thromb. Res. 1990; 59:629-638.
8. Hladovec, J. Antithrombotic Activity of an Unsaturated Fatty Acid Preparation. Thromb. Res. 1990; 58:505-510.
9. Noa, M. Effect of Policosanol on Circulating Endothelial cell in Experimental Model in Sprague-Dawley Rats and Rabbits. J. Pharm. Pharmacol. 1997; 49: 999-1002.
10. Delgado Hernández R. Contribución al conocimiento del mecanismo protector de la Clorpromacina frente al choque endotóxico. [Tesis Doctoral]. 1995. Centro de Química Farmacéutica. La Habana.

11. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonadehyde and 4-hidroxy-nonenal. *Meth Enzymol* 1990; 186: 407-21.
12. Hladovec J. Circulating endothelial cell isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats. *Thrombo Res* 1973; 3: 665.
13. Ruef J, Peter K, Nord TK, Runge MS, Kubler W, Bode C. Oxidative stress and atherosclerosis: its relationship to growth factors, thrombus formation and therapeutic approaches. *Thromb Haemost* 1999; 82 (Suppl 1): 32-7.
14. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacología*. 4ta ed. España: Harcourt SA; 2000.
15. Repetto M. *Toxicología Fundamental*. 3^{ra} ed. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 1997. p.129-61.
16. Vytiska-Binstorfer E, Kurz C, eninger W, Mildner M, Waselmayr B, Bursh W, et al. The role of nitric oxide in reproduction. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 1998; 38(1): 44-6.
17. Drummond GR, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res* 2000; 86(3): 347-54.
18. Sampol J, George F. Measurement of biological parameters of endothelial origin: value in human pathology. *Ann Biol Clin Paris* 1995; 53(6): 329-38.
19. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000; 18(6): 655-73.
20. Martin A, Wu D, Baur W, Meydani SN, Blumberg JB, Meydani M. Effect of vitamin E on human aortic endothelial cell responses to oxidative injury. *Free Radic Biol Med* 1996; 21(4): 505-11.

21. Siow RC, Sato H, Leake DS, Ishii T, Bannai S, Mann GE. Induction of antioxidant stress proteins in vascular endothelial and smooth muscle cells: protective action of vitamin C against atherogenic lipoproteins. *Free Radic Res* 1999; 31(4): 309-18.

ANEXOS

Tabla # 1: Exámenes complementarios para el estudio.

VARIABLE	GRUPO 1 MEDIA ± DS	GRUPO 2 MEDIA ± DS	GRUPO 3 MEDIA ± DS	GRUPO 4 MEDIA ± DS	GRUPO 5 MEDIA ± DS
Colesterol (m mol/L)	5.5 ± 1.20	4.5 ± 1.33	5.6 ± 1.08	5.2 ± 1.03	5.1 ± 1.15
Glicemia (m mol/L)	5.6 ± 0.88	5.4 ± 0.44	5.3 ± 0.55	5.4 ± 0.79	5.03 ± 0.62

DS: Desviación Estandard

Tabla # 2: Comportamiento de los indicadores relacionados con el daño vascular.

	GRUPO 1 MEDIA ± DS	GRUPO 2 MEDIA ± DS	GRUPO 3 MEDIA ± DS	GRUPO 4 MEDIA ± DS	GRUPO 5 MEDIA ± DS
NO (μ g/mL)	149.96 ± 42.91 e	111.30 ± 96.12	146.97 ± 82.83 e	150.98 ± 83.23 e	53.30 ± 38.17 a c d
MDA (μ mol/L)	3.70 ± 3.35 e	7.37 ± 7.61 e	4.88 ± 1.72 e	7.14 ± 5.47 e	0.70 ± 0.79 a b c d
CE (cél/mL)	2929.05 ± 785.55 c e	2740.70 ± 828.70 d e	1426.30 ± 451.82 a e	1453.40 ± 498.44 b e	409.4 ± 194.13 a b c d

a, b, c, d, e: Diferencias estadísticamente significativas con los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente.