

Toxicidad de la yuca (Manihot esculenta Crantz)

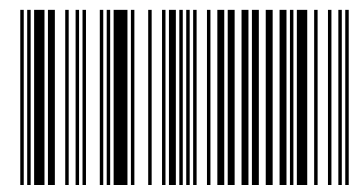
La yuca (Manihot esculenta Crantz) es un alimento básico para personas de escasos recursos económicos, sin embargo, posee compuestos cianogénicos como linamarina y lotaustralina. A la fecha se han estudiado los efectos de linamarina a nivel de Sistema Nervioso Central, pero no se han estudiado las alteraciones conductuales, renales y hepáticas que pudiera provocar. Los parámetros que evalúan la función renal se encuentran elevados en ratas tratadas con linamarina 20mM, respecto al vehículo. En este mismo grupo se encontraron incrementados los valores de las pruebas de funcionamiento hepático, al contrario las proteínas totales y la albúmina se encontraron disminuidas. La administración intraperitoneal de linamarina promovió alteraciones motoras caracterizadas la conducta de giro en la prueba de nado. Así, la administración intraperitoneal subcrónica de linamarina en un tratamiento de 24, 5 y 1 hora antes de realizar las pruebas conductuales y la toma de la muestra, provoca incoordinación motora en nado, así como daño renal y hepático en la rata macho Wistar, lo que señala que este principio activo, contenido en la yuca, podría contribuir a los efectos tóxicos asociados a su consumo



Eduardo Rivadeneyra Domínguez · Juan F. Rodríguez ·
Montserrat Mtez Luna

Toxicidad de la yuca (Manihot esculenta Crantz)

Estudio con linamarina



978-3-639-72214-7

editorial académica española

**Eduardo Rivadeneyra Domínguez
Juan F. Rodríguez
Montserrat Mtez Luna**

Toxicidad de la yuca (Manihot esculenta Crantz)

**Eduardo Rivadeneyra Domínguez
Juan F. Rodríguez
Montserrat Mtez Luna**

**Toxicidad de la yuca (Manihot
esculenta Crantz)**

Estudio con linamarina

Editorial Académica Española

Impressum / Aviso legal

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Información bibliográfica de la Deutsche Nationalbibliothek: La Deutsche Nationalbibliothek clasifica esta publicación en la Deutsche Nationalbibliografie; los datos bibliográficos detallados están disponibles en internet en <http://dnb.d-nb.de>.

Todos los nombres de marcas y nombres de productos mencionados en este libro están sujetos a la protección de marca comercial, marca registrada o patentes y son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de sus respectivos propietarios. La reproducción en esta obra de nombres de marcas, nombres de productos, nombres comunes, nombres comerciales, descripciones de productos, etc., incluso sin una indicación particular, de ninguna manera debe interpretarse como que estos nombres pueden ser considerados sin limitaciones en materia de marcas y legislación de protección de marcas y, por lo tanto, ser utilizados por cualquier persona.

Coverbild / Imagen de portada: www.ingimage.com

Verlag / Editorial:

Editorial Académica Española

ist ein Imprint der / es una marca de

OmniScriptum GmbH & Co. KG

Bahnhofstraße 28, 66111 Saarbrücken, Deutschland / Alemania

Email / Correo Electrónico: info@omniscryptum.com

Herstellung: siehe letzte Seite /

Publicado en: consulte la última página

ISBN: 978-3-639-72214-7

Copyright / Propiedad literaria & cop Eduardo Rivadeneyra Domínguez, Juan F. Rodríguez, Monserrat Mtez Luna

Copyright / Propiedad literaria © 2017 OmniScriptum GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Todos los derechos reservados. Saarbrücken 2017

Toxicidad de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz):
estudio con linamarina

Eduardo Rivadeneyra-Domínguez^{1*}, ***Montserrat Martínez-Luna***¹, ***Juan F. Rodríguez-Landa***^{1,2}

1 Laboratorio de Farmacotoxicología, Facultad de Química Farmacéutica
Biológica, Universidad Veracruzana, Xalapa, México

2 Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto de Neuroetología, Universidad
Veracruzana, Xalapa, México.

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: edrivadenevra@uv.mx, rivadenevra2002@hotmail.com
(E. Rivadeneyra-Domínguez).

Tabla de contenidos

1. Capítulo 1. Introducción	5
2. Capítulo 2. Generalidades de la yuca	7
2.1. Descripción.....	8
2.1.1. El tallo.....	9
2.1.2. Las hojas.....	9
2.1.3. Las raíces.....	9
2.1.4. El fruto.....	10
2.1.5. La semilla.....	10
2.2. Usos comunes de la yuca.....	10
3. Capítulo 3. Toxicidad de los componentes químicos de la yuca	11
3.1. Linamarina.....	12
3.1.1. Ruta biosintética de la linamarina.....	14
3.1.2. Toxicidad de linamarina en humanos.....	16
3.1.3. Acetonacianohidrina.....	17
3.1.3.1. Toxicidad de acetonacianohidrina en humanos.....	19
3.1.3.1.1. La letalidad aguda.....	19
3.2. Ruta biosintética de la acetonacianohidrina.....	19
3.3. La toxicidad no letal.....	20
4. Capítulo 4. Neuropatías relacionadas con el consumo de la yuca	21
4.1. Neuropatía Atáxica Tropical (NAT).....	21
4.2. Paraparesis espástica epidémica (Konzo).....	22
4.2.1. Características clínicas y diagnóstico diferencial de Konzo...	23
5. Capítulo 5. Hepatotoxicidad inducida por linamarina: estudios preclínicos	24
5.1. Hígado de rata.....	24
5.1.1. Anatomía del hígado.....	24
5.1.2. Localización del hígado.....	25
5.1.3. Características anatómicas.....	25

5.1.4.	Histología del hígado.....	27
5.1.5.	Funciones del hígado.....	27
5.1.6.	Hepatotoxicidad.....	28
6.	Capítulo 6. Nefrotoxicidad inducida por linamarina: estudios preclínicos.....	30
6.1.	Riñón de rata.....	30
6.1.1.	Anatomía del riñón.....	30
6.1.2.	Localización del riñón.....	31
6.1.3.	Características anatómicas.....	32
6.1.4.	Histología del riñón.....	32
6.1.5.	Funciones del riñón.....	33
6.1.6.	Nefrotoxicidad.....	34
7.	Capítulo 7. Métodos de estudio de la hepatotoxicidad y nefrotoxicidad inducida por derivados de yuca.....	36
7.1.	Pruebas de funcionamiento hepático.....	36
7.1.1.	Transaminasas.....	36
7.1.2.	Fosfatasa alcalina (ALP).....	37
7.1.3.	Bilirrubina total y bilirrubina directa.....	37
7.1.4.	Albúmina y proteínas totales.....	38
7.1.5.	Pruebas de función renal.....	38
7.1.6.	Urea.....	39
7.1.7.	Creatinina.....	40
7.1.8.	Nitrógeno ureico en sangre.....	40
7.1.9.	Ácido úrico.....	41
7.2.	Determinación de glucosa en sangre.....	41
8.	Capítulo 8. Modelos experimentales para evaluar toxicidad.....	42
8.1.	Modelos animales.....	42
8.1.1.	Modelos y características.....	43
8.1.2.	Normativas y razones para el uso de modelos animales.....	43
8.1.3.	El uso de los animales en pruebas de toxicidad.....	44

9. Capítulo 9. Aportación al estudio toxicológico de la linamarina a nivel preclínico	46
9.1. Diseño experimental.....	47
9.2. Esquema de dosificación y administración.....	47
9.3. Pruebas conductuales.....	48
9.4. Obtención de muestras sanguíneas.....	50
Resultados	52
Campo abierto.....	52
Rota-Rod.....	53
Prueba de nado.....	53
Estudio serológico.....	53
Discusión	56
Referencias bibliográficas	62

CAPITULO I

Introducción

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es una planta perteneciente a la familia de las Euforbiáceas originaria de América Latina y del Caribe, en la actualidad es cultivada también en África y Asia debido a su amplio uso en la industria alimentaria, versatilidad de mercado y su fácil adaptación al clima. Esta planta recibe distintos nombres dependiendo de la región en la cual se cultiva y del idioma (Rivadeneira *et al.*, 2012). La yuca es el cuarto producto de cosecha en las zonas tropicales donde al menos unos 700 millones de personas la consumen (Vladimir, 2003) por su valor nutricional de sus raíces, debido a su alto contenido de almidón; aunque las hojas con un 7 % de proteína con base al peso fresco y 25 % con base en el peso seco, también se usan como hortaliza para hacer salsas y sopas en África. Además de servir como alimento para el humano, la yuca se emplea en la alimentación animal (raíces secas y follaje) y en la industria de almidones, alcoholes y harina. En Brasil, los principales derivados de las raíces de yuca son harinas de mesa (seca, de agua o mixta), fécula (polvillo dulce), polvillo ácido, beiju, tapioca, carimã o masa puba, hojas o harinas de hojas y tucupi (Mattos *et al.*, 2002).

No obstante, que la yuca es consumida a nivel mundial por su alto contenido calórico o energético, contiene en su raíz y en sus tejidos, compuestos cianogénicos, linamarina, (97%) y lotaustralina (3%), pertenecientes a la familia de los glucósidos cianogénicos, los cuales al hidrolizarse por acción de la enzima linamarasa, originan por un lado glucosa y acetonacianohidrina, donde esta última se descompone en acetona y ácido cianhídrico, el cual se dice que puede ser el causante de la toxicidad (Ceballos y De la Cruz , 2002).

La acetonacianohidrina o 2-metil-lactonitrilo, es un compuesto orgánico incoloro con sabor amargo y olor a almendras debido a la presencia de ácido

cianhídrico (HCN). Es capaz de desprenderse espontáneamente del ion cianuro dependiendo sólo del pH en que se encuentre; o de descomponerse espontáneamente en presencia de agua en acetona y HCN (Sunderman y Kincaid, 2008). Todas las acciones toxicológicas de cianuro, son resultado de la formación de enlaces reversibles con el citocromo c oxidasa, causando un cese del transporte de electrones a través de la membrana mitocondrial interna originando la destrucción y la hipoxia celular (McMahon *et al.*, 1995). La toxicidad de la yuca se atribuye a la presencia del glucósido linamarina, potencialmente hidrolizable liberando cianuro (CN⁻), lo que permite la clasificación de yuca en grupos mansa (<100 mg HCN por Kg) y brava (>100 mg HCN por Kg). Aunque este glucósido sea removido en su mayor parte durante el procesamiento de las raíces, debido al uso de condiciones inadecuadas de proceso, sobre todo de variedades bravas; puede estar presente en la forma intacta o hidrolizada (acetonacianohidrina y HCN), en los productos derivados de la planta en concentraciones inapropiadas para el consumo, poniendo en riesgo la salud del consumidor. El efecto tóxico del HCN libre o ligado (acetonacianohidrina) puede ser agudo o crónico, caracterizándose el primero por envenenamiento drástico y el segundo por daños en el SNC o por la ocurrencia de bocio (Cereda, 2003). Datos epidemiológicos asocian el consumo de yuca a 2 enfermedades neurológicas muy diferentes entre sí: la Neuropatía Atáxica Tropical (TAN), una polineuropatía periférica que cursa con sordera sensitivoneural y atrofia óptica, y el Konzo, una paraparesia espástica. La TAN y el Konzo se asocian a 2 patrones diferentes de consumo de yuca, generalmente la TAN es una enfermedad crónica, que se presenta en personas de más de 40 años en las que se da una dieta predominada por la yuca. El Konzo es una enfermedad que afecta principalmente a niños menores de tres años y mujeres en edad reproductiva y que aparece de forma abrupta en períodos de crisis alimentaria, en los que la yuca se mantiene prácticamente como el único alimento disponible (Llorens, 2004). Por lo anterior, es importante señalar

que un alto consumo de yuca, bajo ciertas condiciones, se ha relacionado con alteraciones neurológicas y neurodegenerativas. Alguno de esos datos de la literatura y de nuestra propia contribución serán discutidos en este libro para mostrar parte de la base neurobiológica que subyace a esas enfermedades.

CAPÍTULO 2

GENERALIDADES DE LA YUCA

La yuca, *Manihot esculenta* Crantz constituye una fuente importante de energía en la dieta de la mayoría de las poblaciones en países tropicales. Es un cultivo de fácil manejo y es una de las plantas alimenticias más importantes en las regiones húmedas tropicales (Vladimir-Zaninovic, 2003). La producción mundial de yuca en el 2006 se situó alrededor de 203 millones de toneladas de raíces frescas, en el 2014 se produjeron en México 18,135.34 toneladas de yuca, de las cuales 103.90 fueron cultivadas en el estado de Veracruz, cifras reportadas por Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).

Además de la riqueza en carbohidratos que poseen las raíces, particularmente almidón, la parte aérea es fuente de proteínas, vitaminas y minerales, destacándose como una nueva perspectiva para alimentación humana y animal, y como materia prima para muchos productos industriales (Da Silva, 2008). La forma de consumo de la yuca varía de un país a otro y de una región a otra. En África, es universalmente consumida como vegetal para hornear o cocinar en la forma de pastas o masas hechas con harina de yuca (Okiezie y Kosikwski 1981). En los países de África Tropical la yuca proporciona un promedio de 230 cal/persona/día. En América Latina es un alimento indispensable; se estima que cerca de 125 millones de personas de esos países obtienen de ella más de 200 cal/día (Cock, 1989).

Llorens (2004), describe dos variedades de yuca, que se diferencian principalmente en su toxicidad. Las variedades menos tóxicas, pueden consumirse una vez peladas y cocinadas y las variedades más tóxicas, reconocidas por su gusto amargo, que no pueden consumirse sin un procesado previo.

Las técnicas de procesamiento industrial para disminución del principio tóxico se basan en la disolución en agua o en la volatilización envolviendo procesos como la maceración, remojo en agua, calentamiento a ebullición, asado o fermentación de las raíces. A pesar de su elevada utilización como alimento, el consumo de yuca, sobre todo con elevado nivel de cianógenos, está relacionado con desórdenes neurológicos en humanos y animales (Da Silva, 2008).

2.1 Descripción

El género *Manihot* pertenece a la familia Euphorbiaceae constituida por cinco subfamilias (Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Crotonoideae y Euphorbioideae), 317 géneros y cerca de 8100 especies (Mabberley, 1998), que se caracterizan por su notable desarrollo de los vasos laticíferos, compuesta por células secretoras llamadas galactocitos que producen una secreción lechosa propia de las plantas de esta familia (Cartay, 2004).

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es conocida como cassava, mandioca o tapioca, nativa de América tropical donde se cultiva extensamente, al igual que en África y Asia tropicales. Tanto las hojas como las raíces se pueden consumir siempre y cuando se preparen adecuadamente para evitar la aparición de efectos neurotóxicos, ya que contienen cantidades considerables de glucósidos cianogénicos (Schaumburg *et al.*, 1983).

La planta de yuca se divide en dos partes principales, una parte aérea (tallo, hojas, flores y semillas) y la parte radicular o raíz (Montaldo, 1985). Es un arbusto de 2 a 3 m de altura, con tallo arborescente, nudoso, hueco, de color verde, de inflorescencias paniculadas y con hojas anchas y palmeadas que tienen de 3 a 7 lóbulos. Las raíces, la parte comestible de la planta (en algunas regiones se consumen también las hojas), irradian desde el tallo hasta la parte interna del suelo (Cartay, 2004).

2.1.1 El tallo

El color del tallo, a los 6-8 meses de desarrollo se manifiesta como: rojo claro, rojo oscuro, marrón, verde oscuro, verde claro o amarillo. Muestra una corteza y un cilindro central, donde la corteza se divide en: corteza externa y la corteza interna (Montaldo, 1985).

2.1.2 Las hojas

Las hojas son simples y están compuestas por la lámina foliar y el peciolo. La lámina foliar es palmeada y profundamente lobulada. El número de lóbulos en una hoja es variable y por lo general es impar, oscilan entre tres y nueve. Los lóbulos miden entre 4 y 20 cm de longitud y entre 1 a 6 cm de ancho; los centrales son de mayor tamaño que los laterales (Montaldo, 1985; Ceballos y Cruz 2002). El tamaño de la hoja se mide por el largo del lóbulo medio donde el color de la cara superior presenta tonalidades de verde (marrón o claro). Los pecíolos son largos y delgados de 20-40 cm (Montaldo, 1985).

2.1.3 Las raíces

Cuando la planta proviene de semilla sexual, se desarrolla una raíz primaria pivotante y varias de segundo orden. Aparentemente, la raíz primaria siempre evoluciona para convertirse en una raíz tuberosa y es la

primera en hacerlo. Si la planta proviene de estacas, las raíces son adventicias y se forman en la base inferior cicatrizada de la estaca, que se convierte en una callosidad y también a partir de las yemas de la estaca que están bajo tierra. Estas raíces al desarrollarse, inicialmente forman un sistema fibroso, pero después algunas de ellas inician su engrosamiento y se convierten en raíces tuberosas (Ceballos y Cruz 2002).

2.1.4 El fruto

Es una cápsula tricarpelar, provista de seis alas y se abre por seis valvas en la madurez, lo que por lo general, se produce a partir de los cinco meses (Pérez, 1987; Ceballos y Cruz, 2002).

2.1.5 La semilla

La semilla tiene forma elíptica de 1-1.5 cm. de longitud, 6 mm de ancho y 4 mm de espesor. La testa es lisa, de color café con moteado gris. En la parte externa, especialmente si se trata de semilla nueva, se encuentra la carúncula, estructura que se pierde una vez que la semilla ha caído al suelo. El extremo opuesto de la carúncula termina en una pequeña cavidad, posee una testa de color gris, algunas veces jaspeado con manchas oscuras (Pérez 1987, Ceballos y Cruz 2002).

2.2 Usos comunes de la yuca

La yuca se caracteriza por su gran diversidad de usos. Se hierva tradicionalmente de 10 a 40 minutos en la preparación de sopas y atoles. También se consume frita, puede consumirse como harinas, las que se clasifican como fermentadas o no fermentadas (Ospina y Ceballos, 2002). En México la yuca es cultivada y consumida en Chiapas, Guerrero, Jalisco, Oaxaca, Puebla, Sonora, Tabasco y Veracruz, principalmente, su consumo

varía desde la forma cruda hasta en productos terminados como harina, frituras o dulces (Rivadeneira *et al*, 2012).

Otra alternativa para el consumo humano de yuca son los *chips* de yuca frita, similares a las papas fritas pero con la ventaja adicional de que el producto absorbe menos aceite en el proceso de cocción, por lo que es más atractivo desde el punto de vista de la salud humana. Este producto está siendo producido de manera comercial en Colombia, Venezuela, Brasil y en otros países, e incluso es exportado a zonas de los Estados Unidos donde la población latina es predominante (Ospina y Ceballos, 2002).

El almidón de yuca tiene propiedades particulares que lo hacen especialmente apto para ciertos procesos industriales. Entre las propiedades que definen las características de almidón, se puede mencionar la proporción de amilosa y amilopectina, y el tamaño del granulo. Cock (1989) hace un interesante recuento del potencial de yuca para producir alcohol. Por otro lado, el mercado de almidón de yuca también tiene muchas posibilidades de crecimiento para uso industrial y humano, por su viscosidad y resistencia al congelamiento, o a la elaboración de alfombras, látex de caucho, fabricación de salsas, compostas, talcos, papel, cartón, industria cosmética, farmacéuticos y en la industria minera, entre otros (Marín, *et al*, 2008).

CAPÍTULO 3

TOXICIDAD DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS DE LA YUCA

Coloquialmente, se llama cianuro al ácido cianhídrico (HCN) o cianuro de hidrógeno y a sus sales, cianuro de sodio o de potasio. Se le encuentra en forma natural como componente orgánico en algunas plantas o semillas de frutas (glucósidos cianogénicos) y también es producido por ciertas bacterias, hongos y algas. Su acción biológica lo caracteriza como un inhibidor enzimático no específico que bloquea la producción de ATP e induce hipoxia celular mediante la inhibición de varias enzimas, entre ellas a

la succinildeshidrogenasa, superóxidodismutasa, anhidrasa carbónica y la citocromooxidasa, entre otras (Oliveira, 1986).

La toxicidad de la yuca es muy variable y depende de múltiples factores, incluyendo la cantidad de glucósidos presentes en una planta, puede variar con la especie, la etapa de planta y el desarrollo. Como todos los miembros de las euforbiáceas, la planta de yuca produce una sabia o jugo lechoso que contiene glucósidos cianogénicos: linamarina y lotaustralina. El hecho de hervir, procesar con vapor y hornear elimina la mayoría de linamarina, pero no siempre se realiza adecuadamente. Con la destrucción de las células que componen a la yuca se produce la liberación de la linamarina que estaba dentro de las células del vegetal. La producción de ácido cianhídrico (cianuro) depende de la biosíntesis de glucósidos cianogénicos y de la existencia o ausencia de las enzimas que los degradan (Vladimir-Zaninovic, 2003).

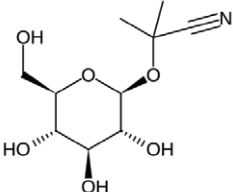
Los glucósidos linamarina y lotaustralina, contenidos en la yuca, al hidrolizarse por medio de la acción de la enzima linamarasa, dan origen a glucosa y cianhidrina, la cual se descompone en acetona y ácido cianhídrico libre gaseoso; ocasionando toxicidad en el organismo (Rivadeneira, 2012). La DL50 (dosis letal) aceptada por la OMS es de 10mg HCN/Kg de peso vivo. Para fines industriales, el mayor o menor nivel de HCN no tiene importancia pues en el procesamiento industrial promueve su volatilización (Oliveira, 1986).

3.1 Linamarina

La linamarina es un glucósido cianogénico (la estructura general de un glucósido cianogénico es un azúcar $D - \beta$ - glucosa, unido por un enlace $O - \beta$ - glucosídico a una aglicona) encontrado en las hojas y raíces de plantas como la yuca. Tras la exposición a las enzimas y flora intestinal en el ser humano, linamarina y lotaustralina pueden descomponerse en el

producto químico tóxico cianuro de hidrogeno; por lo tanto, los alimentos que contienen cantidades significativas de linamarina requieren una extensa preparación y desintoxicación (Banea *et al.*, 1997). Las propiedades fisicoquímicas de la linamarina se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de linamarina

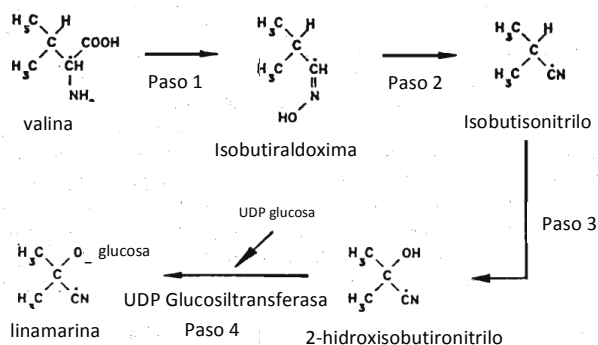
Nombre Común	Linamarina
Estructura	
Sinónimos	<ul style="list-style-type: none"> • 1-ciano-1-metiletil beta-D-glucósido • 2-(BD-Glucopiranosiloxi)-2 metilpropanonitrilo, 9CI • 2-(beta-D-Glucopiranosiloxi)-2-metil propanonitrilo • 2-(beta-D-Glucopiranosiloxi)-2 metilpropanonitrilo • alfa-Hydroxyisobutyronitrile-beta-D-glucosa • Linamarina • Manihotoxin • Phaseolunatin
Nombre IUPAC	2-metil-2-[[[(2S, 3R, 4S, 5S, 6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)Oxan-2-il]oxi} propanonitrilo.
Fórmula molecular	$C_{10}H_{17}NO_6$
Peso molecular	247.28
Color/Forma	Agujas

Sabor	Amargo
Punto de Fusión	142-143°C
Punto de Ebullición	473.3°C a 760mmHg (valor de referencia).
Solubilidades	Soluble en agua, alcohol, acetona; poco soluble en acetato de etilo, éter, benceno, cloroformo; prácticamente insoluble en éter de petróleo.

Fuente: PubChem, 2015.

3.1.1 Ruta biosintética de la linamarina

Los glucósidos cianogénicos linamarina y lotaustralina se sintetizan a partir de los aminoácidos valina e isoleucina, respectivamente. La ruta biosintética (Figura 1) es catalizada por dos membranas unidas al citocromo multifuncional P450 (Zhinong *et al*, 2006).



Tomada de Jansz y Uluwaduge, 1997.
Figura 1. Ruta biosintética de linamarina

La intoxicación aguda por cianuro inactiva el citocromo mitocondrial oxidasa aa_3 , bloqueando así la respiración celular (Nelson, 2006). Desafortunadamente, el procesamiento cuidadoso de los tubérculos de yuca para eliminar la generación de los componentes de cianuro resulta en la pérdida concomitante y significativa de proteínas, vitaminas y minerales por lo tanto reduce el valor nutricional de este importante cultivo (Maziya-Dixon *et al.*, 2009).

La producción de cianuro se lleva a cabo en 2 etapas (figura 2). En la primera, la linamarasa, una betaglucosidasa específica, separa la glucosa de la aglicona. En la planta intacta, la linamarina y la linamarasa se encuentran en compartimientos celulares diferentes. La rotura de la célula durante la masticación o el procesado de la planta ponen en contacto los 2 componentes y activa la cianogenia. Las cianohidrininas, acetona-cianohidrina de la linamarina y 2-hidroxi-2-metil-butironitrilo de la lotaustralina, son inestables a pH neutro o básico y se descomponen espontáneamente (Llorens, 2004).

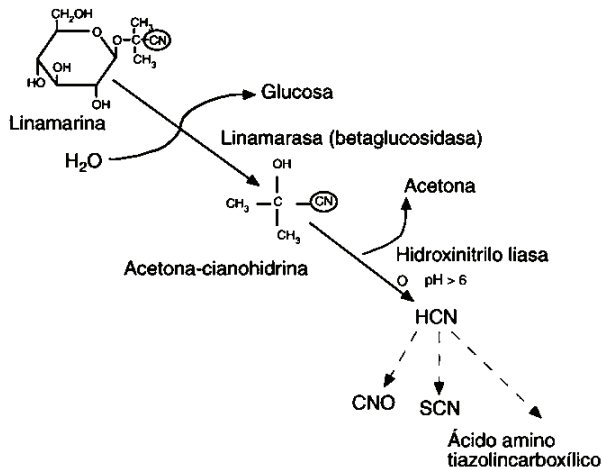


Figura 2. Cianogenia a partir de linamarina y del metabolismo del cianuro en mamíferos. Tomado de Llorens, 2004.

La linamarina es hidrolizada a glucosa y cianohidrininas en el tracto intestinal; las cianohidrininas sufren una reacción catalítica por la β -glucosidasa bacteriana, produciendo cianuro de hidrogeno que se absorbe rápidamente y pasa a la sangre (Sreeja *et al.*, 2003).

Una vez que se encuentra en el torrente sanguíneo, el cianuro forma un complejo estable de citocromo oxidasa, una enzima que promueve el traspaso de electrones a las mitocondrias de las células durante la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP). Si la citocromo oxidasa no funciona

correctamente las células no consiguen aprovechar el oxígeno del torrente sanguíneo, lo que causa hipoxia citotóxica o asfixia celular. La falta de oxígeno provoca que el metabolismo cambie de aerobio a anaerobio, lo que conlleva a la acumulación de lactato en la sangre. El efecto conjunto de la hipoxia y la acidosis láctica provoca una depresión en el Sistema Nervioso Central que puede originar paro respiratorio y resultar mortal (Okolie y Osagie, 1999). El principal método de desintoxicación del cianuro, su transformación en tiocianato por la enzima rodanasa, requiere el aporte de grupos sulfhidrilo provenientes de los aminoácidos cisteína y metionina. La disponibilidad de sulfhidrilo es el factor limitante de la destoxicación, dado que la rodanasa es una enzima ubicua, que se expresa en cantidades notables, principalmente en el hígado (Banea *et al.*, 1997).

Okolie y Osagie (1999) mencionan que la exposición crónica prolongada de cianuro está asociada a cambios enzimáticos y metabólicos en el hígado y riñón, lo cual investigaron en conejos blancos de Nueva Zelanda con un peso inicial de 1.52 kg, utilizando una combinación de colorimetría, espectrofotometría, procesos enzimáticos, gravimétricos e histológicos. En sus estudios notaron que el tratamiento con cianuro condujo a aumentos significativos de lactato deshidrogenasa en el suero y tejidos. Además, el porcentaje de actividad de rodanasa en hígado y riñón se elevó significativamente en el grupo que fue alimentado con cianuro y encontraron marcados cambios degenerativos en las secciones de hígado y riñón, por lo tanto sus resultados sugieren que la exposición crónica al cianuro puede ser perjudicial para las funciones del hígado y del riñón.

3.1.2 Toxicidad de linamarina en humanos

Los alimentos vegetales, con frecuencia, tienen compuestos tóxicos. En condiciones normales, el procesamiento de dichos alimentos, está adaptado para permitir su consumo seguro. Sin embargo, en determinadas circunstancias, estos tóxicos provocan la aparición de enfermedades, entre

las cuales destacan las de tipo neurológico. Tal es el caso de la yuca que contiene los glucósidos cianogénicos, linamarina y lotaustralina, cuya degradación genera cianuro. Datos epidemiológicos asocian el consumo de yuca a hipotiroidismo y a dos enfermedades neurológicas muy diferentes entre sí: la Neuropatía Atáxica Tropical (NAT), una polineuropatía periférica que cursa con sordera sensitivoneural y atrofia óptica, y el konzo, una paraparesia espástica (Llorens, 2004). Las personas que consumen pocas proteínas en sus dietas son particularmente susceptibles a la intoxicación por cianuro, ya que carecen de los aminoácidos adecuados necesarios para ayudar a la desintoxicación.

El efecto tóxico del HCN puede ser agudo o crónico, caracterizándose el primero por envenenamiento drástico y el segundo por disturbios causados en el Sistema Nervioso Central o por la ocurrencia de bocio (Cereda, 2003).

3.1.3 Acetonacianohidrina

La acetonacianohidrina, acetonacianohidrina, acetona cianohidrina o 2-metil-lactonitrilo, es un líquido de incoloro a amarillento con un sabor amargo y olor a almendras debido a la presencia de ácido cianhídrico (HCN). El uso importante de la acetonacianohidrina es en la producción de ésteres acrílicos, plásticos poliacrílicos y resinas sintéticas, así como en la fabricación de insecticidas, productos farmacéuticos, fragancias y perfumes. Acetonacianohidrina tiene una masa molecular de 85,11 g/mol, densidad de 0,9267 g/cm³ a 25 ° C y punto de fusión de -19°C. (Ver tabla 2). Es capaz de la liberación espontánea de cianuro dependiendo sólo del pH en que se encuentre. Esta sustancia, se descompone espontáneamente en presencia de agua en acetona y HCN (Sunderman y Kincaid 2008).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la acetnacionhidrina.
(Modificado de Sunderman y Kincaid 2008).

Fórmula molecular	$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OH})\text{CN}$
Peso molecular	85.1 g/mol
Estado físico	Líquido
Color	Incoloro a amarillento
Sinónimos	2-propanona cianohidrina; 2-ciano-2-propanol; 2-ciano-2-hidroxipropano; hidroxiisobutironitrilo; 2-metil- lactonitrilo; 2-hidroxi-2-metil propionitrilo; acetnacionhidrina.
Presión de vapor	1.07 hPa a 20°C; 0.8 mm Hg a 20°C; 1 mm Hg a 25°C; 1.6 hPa a 40°C; 12.5 hPa a 72°C
Densidad	0.932 g/cm ³ a 19°C; 0.9267 g/cm ³ a 25°C
Punto de fusión	-19°C a -20°C
Punto de ebullición	81°C a 30.7 hPa; 82°C a 23 mm Hg; 95°C a 1013 hPa (descomposición a acetona y HCN).
Solubilidad	Muy soluble en agua, alcohol y éter.
Olor	Característico a almendras amargas del HCN libre.

Las muertes e intoxicaciones ocupacionales potencialmente mortales se han descrito después de la inhalación accidental, contacto con la piel e ingestión. Los síntomas iniciales después de la exposición a la

acetonacianohidrina es aumento de la palpitación cardíaca, dolor de cabeza, debilidad, mareos, náuseas y vómitos, irritación en la nariz, ojos, garganta y de la piel. La acetonacianohidrina se comporta como su equivalente molar de cianuro tanto *in vitro* como *in vivo*. Todas las acciones farmacológicas y toxicológicas de cianuro resultan de la formación de enlaces reversibles de cianuro con el complejo férrico (+3), del citocromo c oxidasa también conocido como oxidorreductasa ferrocitocromo oxígeno c. El resultado es un cese del transporte de electrones a través de la membrana mitocondrial interna y en la inhibición de la utilización de oxígeno causando la destrucción y la hipoxia celular (McMahon *et al.*, 1995).

3.1.3.1 Toxicidad de acetonacianohidrina en humanos

3.1.3.1.1 La letalidad aguda

Aun cuando se han producido muertes por la exposición a acetonacianohidrina, las concentraciones específicas y los períodos de exposición no se han reportado. Las muertes y envenenamientos fatales con convulsiones tónico-clónicas en los trabajadores, se han descrito tras la inhalación y contacto con la piel así como después de la ingestión accidental (Sunderman y Kincaid 2008).

3.2 Ruta biosintética de la acetonacianohidrina

La enzima linamarasa interactúa sobre la linamarina (compuesto que equivale al 97% del total de glucósidos cianogénicos encontrados en la planta de yuca) cuando el tejido de la planta de yuca es destruido por rompimiento de las membranas celulares, en donde por la acción hidrolítica de las β -glucosidasas se obtiene acetonacianohidrina (metil-etil cetona cianhidrina a partir de lotaustralina) misma que por actividad enzimática de la hidroxinitrilo liasa se descompone en: acetona y HCN (Ver figura 3). La

cianhidrina (se descompone en medio alcalino y también exponiéndola a más de 60 °C) mientras que el HCN constituye la forma tóxica libre o "cianuro libre" (McMahon *et al.*, 1995).

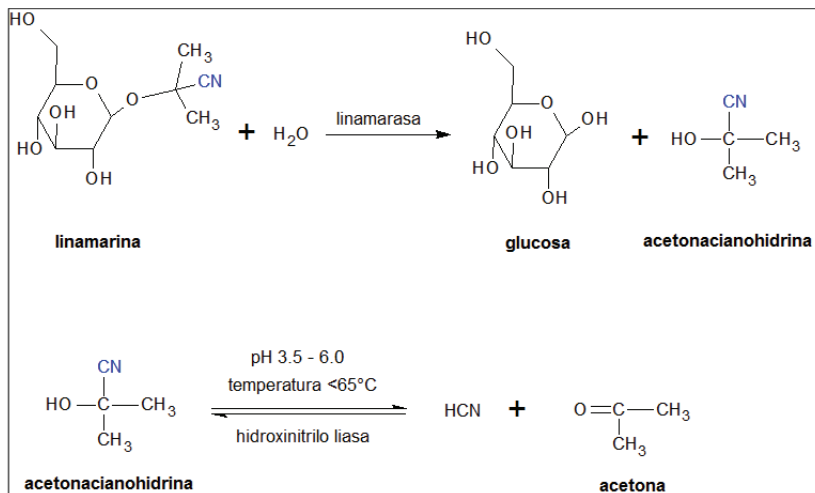


Figura 3. Biosíntesis de acetona cianhidrina a partir de la hidrólisis enzimática de Linamarina (Modificado Selmar *et al.*, 1989).

La acetona cianhidrina que es un metabolito de la linamarina, está presente en la harina de yuca. En experimentos con ratas tratadas por vía oral, ésta sustancia cianógena causa degeneración neuronal en diferentes áreas del cerebro, incluyendo las áreas no corticales (no funcionales) (Nzwalo y Cliff, 2011).

3.3 La toxicidad no letal

Se han reportado casos de intoxicación en los trabajadores después del contacto dérmico con acetona cianhidrina (Lang y Stintzy 2010). Sunderman y Kincaid (2008) describieron por lo menos tres casos de trabajadores que perdieron la conciencia durante la operación de llenado de

autobombas de acetonehidrina en una fábrica de plásticos. Los hombres se recuperaron después de haber sido reanimados y puestos en contacto con el aire fresco y la limpieza de sus manos. Cuando los empleados cubrían sus manos, los efectos de este compuesto, eran mínimos (Zeller *et al.*, 2009).

La exposición oral a acetonehidrina se puede producir como consecuencia de su liberación de la linamarina encontrada en la yuca y otros productos alimenticios de esta planta (Conn, 2009). La linamarina es el nombre común dado a una molécula compuesta de glucosa y acetonehidrina. La toxicidad de linamarina por inhalación por lo general se hace evidente cuando se supera el umbral sensorial de olor para esta sustancia, que va de 0,06 a 0,48 mg/L.

CAPÍTULO 4

NEUROPATÍAS RELACIONADAS CON EL CONSUMO DE LA YUCA

4.1 Neuropatía Atáxica Tropical (NAT)

La intoxicación crónica por cianuro es una de las principales causas de la NAT que se caracteriza por la combinación de mielopatía, atrofia óptica, sordera neurosensorial y polineuropatía periférica simétrica. Los pacientes tienen una marcha de “borracho” (Atáxica) y el síndrome progresa lentamente durante años. Afecta por igual a hombres y mujeres y la mayor incidencia se presenta entre los 50 y 60 años, preferentemente en personas de escasos recursos económicos. Al examen se encuentra arreflexia osteotendinosa en 80% de los casos e hiperreflexia en el 20% restante debido a una mielopatía asociada. Parece que además de la ingesta prolongada de yuca mal procesada y a la poca ingesta de proteínas hay otros factores alimenticios y/o metabólicos asociados con esta entidad que

sin duda existe y no se diagnostica o se confunde con otras entidades neurológicas parecidas (Vladimir-Zaninovic, 2003).

En el caso de la NAT, el papel de un déficit vitamínico o de aminoácidos esenciales se ha explorado mediante diversos intentos de intervención terapéutica. Sin embargo, ninguna de las suplementaciones evaluadas, entre las que se incluyen hidroxicobalamina, riboflavina y cisteína, no logró producir mejoría clínica, de tal manera que esta enfermedad es irreversible (Osuntokun, 1994).

4.2 Paraparesis espástica epidémica (Konzo)

El Konzo es una enfermedad que daña a las motoneuronas superiores, fue descrita en el Congo Belga (actualmente República Democrática del Congo) por Trolli (1938) en un reporte que resumió observaciones en el distrito de Kwango acerca de dos afecciones de origen desconocido; paraparesis espástica epidémica *Konzo de la gente en Kwango* y un síndrome con edema y lesiones cutáneas.

Estas enfermedades son un trastorno neurológico que provoca la parálisis espástica de ambas piernas (paraparesis) o de ambas piernas y brazos (tetraparesis). El Konzo se atribuye a una alta exposición de cianuro a través de la dieta basada con raíces de yuca amarga (*Manihot esculenta* Crantz) procesadas inadecuadamente. Esta enfermedad se ha reportado en áreas rurales remotas de Mozambique, Tanzania, Camerún, Angola, República Central África y República Democrática del Congo en particular en las áreas de cultivo y donde se consume la yuca como base de la alimentación (Rivadeneira *et al.*, 2012).

Se presenta dificultad progresiva para caminar acompañada de retención urinaria, estreñimiento, dolor lumbar e importancia. Al examen neurológico se encuentran signos del sistema cortico-espinal como hiperreflexia, signo de Babinski, clonus y espasticidad. Puede haber dificultad

para hablar y visión borrosa durante un mes. Algunos pacientes quedan con disartria y atrofia óptica. La mayoría de los pacientes llegan a necesitar uno o dos bastones y 10% quedan en silla de ruedas (Vladimir-Zaninovic, 2003).

A pesar de su gravedad, konzo sigue siendo una enfermedad desatendida. La enfermedad se asocia con un alto consumo dietético de cianógeno de las raíces de yuca amarga combinado con una dieta deficiente en proteínas. Las epidemias se producen cuando estas condiciones coinciden en momentos de grave escasez de alimentos (Nzwalo y Acantilado, 2011).

4.2.1 Características clínicas y diagnóstico diferencial de Konzo

La enfermedad típicamente ocurre en personas aparentemente sanas y no existe fase prodrómica u otras enfermedades que puedan originarla. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido cuatro criterios para el diagnóstico del Konzo (tabla 3). El inicio de esta enfermedad se caracteriza por una paraparesis abrupta ocurriendo en los primeros días de la enfermedad. Algo característico es que una persona sana que va a la cama se siente bien y despierta durante la noche o la mañana siguiente sin ser capaz de pararse o caminar. La paraparesis también puede ocurrir abruptamente durante o después de un trabajo físico o de una larga caminata (Rivadeneira *et al.*, 2012).

Los síntomas iniciales se describen como pesadez, temblor o debilidad de las piernas asociados con la dificultad o inhabilidad para pararse. Otros síntomas pueden aparecer con el tiempo incluyendo debilidad en los brazos o manos, dificultad en la articulación del habla y vista nublada. Los síntomas sensoriales son dolor radicular de la espalda baja y parestesia en las piernas, entre otros (Vladimir-Zaninovic, 2003).

Tabla 3. Criterios utilizados por la OMS para el diagnóstico del konzo.

Criterio	OMS
1	Anormalidad espástica simétrica visible mientras camina o corre.
2	Historia de la aparición de konzo de menos de una semana, seguido por un curso no progresivo en una persona aparentemente sana.
3	Espasmos exagerados bilaterales de rodillas y tobillos sin signos de enfermedad de médula espinal.
4	Ausencia en el consumo de chícharos (<i>Lathyrus sativus</i>).

Tabla tomada de Rivadeneyra *et al.*, 2012.

La toxicidad de la yuca ha mantenido el interés de los estudios de toxicidad crónica de linamarina debido a su alto consumo por la población, si bien la toxicidad ha sido vinculada inequívocamente a la etiología del bocio, NAT y Paraparesis Espástica Epidémica (Konzo), no es mucho lo que se sabe acerca de las posibles consecuencias tóxicas de linamarina en el hígado y riñones.

CAPÍTULO 5

HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR LINAMARINA: ESTUDIOS PRECLÍNICOS

5.1 Hígado de rata

5.1.1 Anatomía del hígado

El hígado es un órgano de coloración rojo oscuro, con un peso aproximado de 10 a 50 gramos (Sharp y Villano, 2013). A comparación con el ser humano este es más prominente ocupando toda el área de la cavidad

abdominal; y casi recubierto por el peritoneo visceral y por una capa de tejido conectivo denso e irregular situada en el plano profundo del peritoneo (Rogers y Dintzis, 2012).

5.1.2 Localización del hígado

El hígado ocupa gran parte del hipocondrio derecho y una porción de epigastrio, en la cavidad abdominopelvica. Su superficie convexa, permite que se apoye contra la cara posterior cóncava del diafragma y su superficie caudal está en contacto con el estómago y los intestinos (Krinke, 2000).

5.1.3 Características anatómicas

El hígado de rata se encuentra dividido en dos lóbulos: el lóbulo izquierdo que es el más grande, ya que contiene a los lóbulos cuadrado inferior y caudado posterior, principalmente por la distribución de vasos sanguíneos; y el derecho, el más pequeño. El ligamento falciforme es un repliegue del peritoneo parietal que se extiende desde la cara inferior del diafragma, entre los dos lóbulos principales del hígado, hasta la cara superior de dicha glándula, y ayuda a suspenderlo. En el borde libre del ligamento falciforme, está el ligamento redondo del hígado, cordón fibroso residuo de la vena umbilical fetal y se extiende del hígado al ombligo. Los ligamentos coronarios derecho e izquierdo son repliegues angostos del peritoneo parietal que suspenden el hígado en el diafragma, tal como se ilustra en la figura 4 (Krinke, 2000).

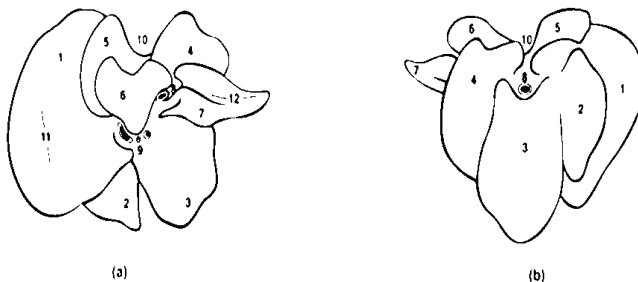


Figura 4. Hígado de rata.
Cara visceral (a) y diafragmática (b). Fuente: Krinke, 2000.

Descripción de la figura 4.

- | | |
|---|--|
| 1. Lóbulo lateral izquierdo. | 7. Proceso caudado del lóbulo caudado. |
| 2. Lóbulo medial izquierdo. | 8. Crecimiento caudado de la vana en el recolector hepático. |
| 3. Lóbulo lateral derecho. | 9. Ducto hepatoentérico entrada de la arteria hepática y vena porta, y salida del conducto colédoco y hepático común. |
| 4. Lóbulo medial derecho. | 10. Borde dorsal y surco esofágico. |
| 5. Proceso papilar preentricular del lóbulo caudado. | 11. Cara visceral y lóbulo lateral derecho (impresión gástrica). |
| 6. Proceso papilar retroentricular del lóbulo caudado. | 12. Proceso caudado (impresión renal). |

El hígado de la rata no posee vesícula biliar para almacenar la bilis, la secreción digestiva del hígado es directa. Los conductos hepáticos transportan la bilis desde los lóbulos del hígado al conducto biliar (conducto colédoco) que luego pasa a lo largo del duodeno. El conducto atraviesa el lado dorsal del páncreas y entra en el lado mesentérico del duodeno de unos tres centímetros desde el píloro. El hígado recibe sangre arterial de la arteria hepática, y la sangre venosa a través de la vena porta. Sustancias alimenticias absorbidas desde el tubo digestivo se llevan al hígado a través de esta vena (Krinke, 2000; Sharp y Villano, 2013).

5.1.4 Histología del hígado

Cada lóbulo del hígado se compone de unidades funcionales llamadas lobulillos, que consisten en células epiteliales especializadas (los hepatocitos), dispuestas en láminas ramificadas e irregulares conectadas unas con otras, alrededor de una vena central. En lugar de capilares, el hígado posee grandes espacios epiteliales con revestimiento del endotelio, llamado sinusoides, por donde circula la sangre. Además, contienen fagocitos fijos, que son células reticuloendoteliales estrelladas (de Kúpffer), que se encargan de la destrucción de leucocitos y eritrocitos viejos, bacterias y otros materiales extraños en la sangre venosa, que proviene del tubo digestivo y que recircula por el hígado (Krinke, 2000; Rogers y Dintzis, 2012).

5.1.5 Funciones del hígado

Son numerosas y complejas (más de 1500 funciones químicas). Sin embargo, se pueden considerar en dos grupos: las de tipo externa y las internas; dentro de las primeras se encuentran los procesos de síntesis y excreción de sustancias. Los hepatocitos sintetizan proteínas, carbohidratos, lípidos, incluido el colesterol, ácidos biliares y urea. Entre las sustancias excretadas están la bilis, sales biliares y bilirrubina. Por otro lado las internas consisten en procesos complejos como lo son: el metabolismo de sustancias, procesos de almacenamiento, reacciones de detoxificación e inmunológicas (Krinke, 2000).

Las funciones específicas del hígado son:

- **Metabolismo de carbohidratos:** El hígado reviste importancia especial en el mantenimiento de la glucemia normal. Cuando este parámetro es bajo, el hígado puede desdoblar el glucógeno en glucosa, que libera en el torrente sanguíneo. Además, esta glándula puede convertir ciertos aminoácidos, ácido láctico y otros azúcares, como la fructuosa y galactosa, en glucosa. Si la glucemia es alta, como ocurre justo

después de una comida, el hígado convierte glucosa en glucógeno para su almacenamiento (Krinke, 2000).

- **Metabolismo de lípidos:** Los hepatocitos almacenan ciertos triglicéridos, desdoblan ácidos grasos para generar ATP; sintetizan lipoproteínas que transportan ácidos grasos, triglicéridos y colesterol hacia las células; además, sintetiza colesterol, y lo usa en la producción de sales biliares (Krinke, 2000).
- **Metabolismo de proteínas:** Los hepatocitos desaminan (separan el grupo amino, NH_2) los aminoácidos, de modo que puedan utilizarse para la producción de ATP o convertirse en hidratos de carbono o grasas. Luego, el amoníaco (NH_3) tóxico resultante se transforma en urea, que es mucho menos tóxica, y se excreta a través de la orina. Además los hepatocitos sintetizan proteínas plasmáticas como las globulinas alfa y beta, albúmina, protrombina y fibrinógeno (Krinke, 2000).
- **Excreción de bilirrubina:** Obtenida por la catálisis del grupo hemo de los eritrocitos, cuya absorción es generada en el hígado desde la sangre y secretada en la bilis. Gran parte de la bilirrubina de la bilis se metaboliza en el intestino delgado por acción de bacterias y se elimina en las heces y orina (Krinke, 2000).
- **Almacenamiento:** Además de glucógeno, el hígado es un sitio importante de almacenamiento de ciertas vitaminas (A, B12, D, E y K) y minerales (hierro y cobre), que libera cuando se necesitan en otras partes del cuerpo (Krinke, 2000).

5.1.6 Hepatotoxicidad

El hígado es afectado por muchas sustancias tóxicas, tras la ingestión oral (la vía más frecuente de intoxicación) este órgano es el primero en recibir la presencia de la sustancia ajena, y actuar como destoxificadora,

excretándolos a través de la vía biliar haciéndolos más hidrosolubles (Borgel *et al.*, 2001; Segarra, 2006). Los agentes hepatotóxicos son sustancias específicas que se caracterizan por dañar exclusivamente a este órgano (Segarra, 2006). Son hepatotóxicos todos aquellos que pueden producir un daño hepático, de esta forma se distinguen dos clases: aquellos que dañan internamente conocidos como intrínsecos y los que dañan externamente llamados extrínsecos (Borgel *et al.*, 2001); de los dos anteriores el primero es el más común donde el daño hepático es dosis-dependiente y se puede clasificar en:

- Daño directo: Como deterioro físico directo sobre el hepatocito.
- Daño indirecto: En la interferencia gradual de las vías metabólicas y de excreción del hepatocito (Borgel *et al.*, 2001).

De acuerdo al párrafo anterior, el daño hepático variará conforme a su dosis en dos tipos, el agudo que corresponde a los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia; y la crónica que dependerá de la frecuencia y la cantidad de la dosis (Borgel *et al.*, 2001). La mayoría de los tóxicos son de tipo intrínsecos y se clasifican en citotóxicos, colestásicos o mixtos. Cuando el daño es citotóxico se habla en general de un deterioro a nivel celular, cuando el daño es por reacción de idiosincrasia se produce un daño colestásico (Moreno, 2002).

- Daño citotóxico: Incluye degeneración, necrosis y esteatosis hepática. La necrosis puede ser zonal o difusa. La necrosis zonal producida por algunos tóxicos es en la zona central del lóbulo y la difusa en cualquier parte del hígado.
- Daño colestásico: Caracterizado principalmente por detención del flujo biliar con poca inflamación (Borgel- *et al.*, 2001).

En el daño extrínseco generalmente se le atribuye a un factor externo que produce una inflamación y a su vez un daño del tejido hepático, sin embargo, también se presenta en el uso repetitivo de una sustancia, conocido como daño hepático crónico cuyo principio es una degeneración gradual tanto funcional y física del hígado (Álamo, 2005; Lorenzo *et al.*, 2008).

El daño hepático tanto agudo o crónico a menudo se asocia a una falla renal o bien a una faceta del daño sistémico por el tóxico. Las manifestaciones clínicas habitualmente se presentan de 24 a 36 horas en el caso de exposiciones agudas, y de 3 a 6 meses por exposiciones crónicas, donde se produce un aumento de la función hepática, es decir, de sus enzimas hepáticas (transaminasas y fosfatasa alcalina), así como de otros factores (aumento de bilirrubina, disminución de protrombina), (Borgel *et al.*, 2001). La aparición de acidosis metabólica es otro elemento dentro de un daño hepático, así como la hiperglucemia. Dentro de las posibles complicaciones puede existir hemorragia por alteración de los factores de coagulación, así como una falla masiva hepática, también conocida como encefalopatía hepática, que puede llevar al coma y la muerte (Borgel *et al.*, 2001; Moreno, 2002).

CAPÍTULO 6

NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR LINAMARINA: ESTUDIOS PRECLÍNICOS

6.1 Riñón de rata

6.1.1 Anatomía del riñón

En las ratas adultas tiene una masa de aproximadamente 0.8-5.4 gramos y un volumen de 3.7 mL/250 gramos (Sharp y Villano, 2013). El riñón

de la rata es de color caoba, liso, con forma de frijol, y están cercanos al eje dorsoventral (Rogers y Dintzis, 2012).

6.1.2 Localización del riñón

Los riñones son órganos que se localizan entre el peritoneo y la pared posterior del abdomen. Debido a su posición por detrás del peritoneo en la cavidad abdominal se dice que son retroperitoneales. La posición del riñón derecho descansa detrás del hígado y el izquierdo debajo del diafragma, adyacente al bazo, separados de estos órganos por el peritoneo parietal posterior. Sobre cada riñón hay una glándula suprarrenal. Se encuentran posicionados entre las vértebras lumbares y las torácicas. El riñón derecho está un poco más abajo que el izquierdo debido a que el hígado ocupa un espacio considerable como lo ilustra la figura 5, (Krinke 2000).

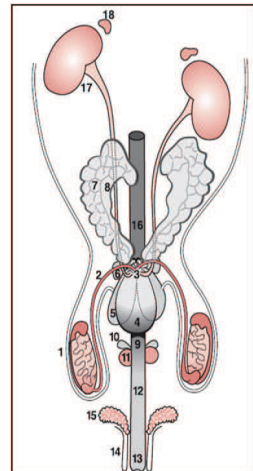


Figura 5. Riñón de rata. Fuente: Krinke, 2000.

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Testículo derecho del escroto. | 10. Glandula bulbouretral. |
| 2. Ducto deferente derecho. | 11. Músculo bulbo cavernoso. |
| 3. Glándula del ducto deferente. | 12. Cuerpo del pene. |
| 4. Vesícula urinaria. | 13. Glándula del pene. |
| 5. Próstata ventral. | 14. Prepucio. |
| 6. Próstata dorso-lateral. | 15. Glándula prepuciales. |
| 7. Glándula vesicular. | 16. Recto. |
| 8. Glándula coaguladora. | 17. Riñón y uréter derecho. |
| 9. Músculo uretral. | 18. Glándula suprarrenal derecha. |

6.1.3 Características anatómicas

Cada riñón está cubierto por tres capas de tejido. La capa más profunda o cápsula renal, es una lámina lisa y transparente de tejido conectivo denso irregular. Esta lámina sirve como barrera contra traumatismos y ayuda a mantener la forma del órgano. La capa intermedia o cápsula adiposa, es una masa de tejido adiposo que rodea la cápsula renal. También protege al riñón de los traumatismos y los sostiene firmemente en su sitio, dentro de la cavidad abdominal. La capa superficial o fascia renal es otra capa delgada de tejido conectivo denso e irregular que fija el riñón a las estructuras que lo rodean y a la pared abdominal. Esta capa es profunda con respecto al peritoneo. En el lado cóncavo de los riñones se encuentra una fisura vertical llamada hilio renal, a través del cual, sale el uréter del riñón, así como vasos sanguíneos, linfáticos y algunos nervios. Un corte frontal del riñón muestra dos regiones distintas: un área superficial, de color rojo claro, llamado corteza renal y una región profunda, de color pardo rojizo, denominado médula renal (Krinke, 2000).

6.1.4 Histología del riñón

La médula renal contiene de 8 a 18 pirámides renales cónicas. La base de cada pirámide está frente a la corteza renal y su extremo más estrecho llamado ápex o papila renal, apunta hacia el centro del riñón. Las porciones de la corteza renal que se extienden entre las pirámides renales se denominan columnas renales. La conjunción de corteza renal y pirámides constituyen la porción funcional o parénquima del riñón. En esta parte se encuentran las unidades funcionales del riñón (cerca de 1 millón de nefronas). La orina que éstas forman drena al interior de gruesos conductos capilares que se extienden a través de la papila renal de las pirámides. Los conductos capilares desembocan en estructuras en forma de copa llamadas

cálices menores y mayores. Cada riñón tiene de 8 a 18 menores y de 2 a 3 mayores. Los primeros reciben la orina de los conductos capilares de una papila renal y llevan a un cáliz mayor. De los segundos la orina pasa a una cavidad más grande llamada pelvis renal y luego salen a través del uréter hacia la vejiga urinaria (Krinke, 2000).

6.1.5 Funciones del riñón

Los riñones realizan el trabajo más importante del sistema urinario, puesto que las otras partes son prácticamente vías de paso y áreas de almacenamiento. Al filtrar la sangre y formar la orina, los riñones contribuyen a la homeostasis de varias maneras. Las funciones renales incluyen:

- Regulación de la composición iónica de la sangre: Los riñones ayudan a regular la concentración de distintos iones de la sangre, principalmente los iones (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{+2}), cloruro (Cl^-) y fosfato (HPO_4^-), (Krinke, 2000).
- Mantenimiento de la osmolaridad de la sangre: Regulando por separado la pérdida de agua y de solutos de la orina, los riñones mantienen la osmolaridad es decir un cierto número de partículas disueltas en la orina, mejorando la homeostasis (Krinke, 2000).
- Regulación del volumen de sangre: Al conservar o eliminar agua, los riñones regulan el volumen de sangre y por consiguiente el líquido intersticial. (Krinke, 2000).
- Regulación del pH sanguíneo: Los riñones excretan una cantidad variable de H^+ en la orina y retiene iones bicarbonato (HCO^{-3}), un importante amortiguador de H^+ , estos dos iones generan la regulación (Krinke, 2000).
- Regulación de la concentración de glucosa en sangre: Los riñones pueden desaminar el aminoácido glutamina, emplearlo para la

glucogénesis (síntesis de nuevas moléculas de glucosa) y liberación de glucosa en sangre (Krinke, 2000).

- Excreción de desperdicios y sustancias extrañas. Mediante la formación de la orina, los riñones ayudan a eliminar desperdicios de sustancias sin función útil alguna para el cuerpo. Parte de los desperdicios excretados en la orina resultado de reacciones metabólicas, por ejemplo, urea de la desaminación de aminoácidos, bilirrubina del catabolismo de la hemoglobina, creatinina a partir de creatina de las fibras musculares, ácido úrico del catabolismo de ácidos nucleicos, y otras sustancias metabolizadas como son los fármacos y toxinas del medio ambiente (Krinke, 2000).

6.1.6 Nefrotoxicidad

El riñón recibe un gran flujo de sangre del gasto cardiaco para una masa pequeña, sin embargo son filtradas todas las sustancias que llegan a este órgano excretor así como también el contenido del ultrafiltrado concentrados en los túbulos renales para su reutilización a un nivel sanguíneo. Por esta razón, los riñones están expuestos a daño por cualquier tóxico, cuya concentración sanguínea filtrada puede ser proporcional a la cantidad del tóxico (Borgel *et al.*, 2001).

Las sustancias nefrotóxicas pueden provocar:

- Daño global de la función renal: Insuficiencia renal aguda.
- Síndrome de Fanconi (aminoaciduria, proteinuria, fosfaturia, glucosuria).
- Resistencia al ADH (diabetes insípida).
- Acidosis tubular renal.
- Hiper o hipokalemia.
- Hipertensión.

- Edemas.
- Hipomagnesemia (Borgel *et al.*, 2001).

Las intoxicaciones pueden provocar una insuficiencia renal en forma de:

- Daño directo: Como deterioro físico-químico directo sobre la nefrona, causado por necrosis tubular por aminoglicósidos y nefritis intersticial por hipersensibilidad o tóxica (Borgel *et al.*, 2001).
- Daño indirecto: Interferencia gradual de las vías de excreción de la nefrona, esto por alteración hemodinámica: hipotensión, depresión de volumen, falla circulatoria (Borgel *et al.*, 2001).

El daño renal implica una rápida pérdida de función renal, puede causar aumento de creatinina con caída del aclaramiento renal. La disminución drástica del aclaramiento renal plantea rápidamente el uso de la hemodiálisis como su tratamiento (Borgel *et al.*, 2001). La insuficiencia renal es potencialmente letal y revierte en forma gradual la homeostasis después de uno o varios días o semanas. Se pueden presentar oliguria. Cuando el daño es leve, el volumen urinario no disminuye, incluso puede aumentar (Borgel *et al.*, 2001). La falla renal produce un aumento progresivo de las concentraciones plasmáticas de fosfatos, potasio, iones hidrógeno y metabolitos nitrogenados como creatinina y nitrógeno ureico. La creatinina plasmática habitualmente se eleva una vez establecida la falla renal (Borgel *et al.*, 2001).

CAPÍTULO 7

MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA HEPATOTOXICIDAD Y NEFROTOXICIDAD INDUCIDA POR DERIVADOS DE YUCA

7.1 Pruebas de funcionamiento hepático

Fernández y colaboradores (2008) indican que las pruebas de función hepática se pueden utilizar para determinar presencia o ausencia de daño hepático, realizar diagnósticos específicos, determinar severidad y establecer pronósticos y monitorizar el curso de la enfermedad hepática. Algunas pocas pruebas hepáticas miden funciones identificables, como ocurre con la bilirrubina, albúmina y tiempo de protrombina, mientras que la mayoría no mide una función específica sino que indica la presencia de daño y la falta de permeabilidad de las vías biliares. Entre estas pruebas están las aminotransferasas, la gammaglutamil transpeptidasa y la fosfatasa alcalina. Por último están las pruebas que apuntan a una etiología específica, como son los marcadores de infección viral.

The National Academy of Clinical Biochemistry y la American Association for the Study of Liver Diseases, recomiendan un panel específico de exámenes para ser usado en la evaluación inicial de una enfermedad hepática conocida o sospechada, lo designan como “panel de función hepática” (Fernández *et al*, 2008), está compuesto por los siguientes analitos:

7.1.1. Transaminasas

La alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) son los indicadores más comúnmente utilizados para evaluar la presencia de necrosis hepática. Se encuentran en altas concentraciones en las células hepáticas, donde catalizan la transferencia de grupos aminos para producir ácido pirúvico y oxaloacético, respectivamente, utilizando vitamina B6 como cofactor (Dufour *et al*, 2000). Cuando se presenta daño a la membrana celular del hepatocito, estas enzimas que se encuentran en el citoplasma de las células pasan al plasma, aumentando su concentración en circulación. Las transaminasas son sensibles pero poco específicas del daño

de los hepatocitos, siendo ALT más específica que AST, ya que esta no solo se encuentra en hígado sino también en el músculo esquelético y cardíaco, en el riñón y en los eritrocitos (Kew, 2000).

7.1.2 Fosfatasa alcalina (ALP)

Corresponde a un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de varios ésteres a un pH alcalino. La fosfatasa alcalina sérica tiene varios orígenes (hígado riñón, placenta, intestino, huesos, leucocitos) aunque la fuente más importante es el hígado y los huesos. La fosfatasa alcalina del hígado se encuentra en la superficie canicular y por lo tanto es marcador de disfunción biliar, cuyos valores se pueden aumentar hasta 10 veces en obstrucción de vías biliares, en procesos infecciosos o en presencia de masas (Fernández *et al*, 2008).

7.1.3 Bilirrubina total y bilirrubina directa

La bilirrubina es el principal metabolito del grupo hemo de la hemoglobina, mioglobina y los citocromos. En condiciones normales la mayor parte de la bilirrubina se produce por destrucción de eritrocitos viejos en células del sistema mononuclear fagocítico en el bazo. La bilirrubina indirecta o no conjugada pasa al torrente sanguíneo por difusión pasiva y circula unida a la albumina. Una o varias proteínas transportadoras captan la bilirrubina y la transportan al interior del hepatocito, donde se conjuga con una o dos moléculas de ácido glucurónico mediante la acción de la enzima UDP-GT (bilirrubina uridínofosfato glucuroniltransferasa) para formar monoglucuronidos y diglucuronidos. La bilirrubina conjugada o directa es hidrosoluble, lo que le permite pasar a la bilis y, a continuación, al intestino, donde es transformada por la flora intestinal en urobilinógeno y estercobilina. El urobilinógeno es reabsorbido en parte y excretado por la orina como urobilina (Prieto *et al.*, 2010). La Bilirrubina total es la suma de bilirrubina

directa y bilirrubina indirecta, puede aumentar si la destrucción de eritrocitos aumenta o si la conjugación de bilirrubina en el hígado es defectuosa (González *et al.*, 2013). Clínicamente el aumento de la bilirrubina directa puede originarse por deterioro en la excreción de bilirrubina en el hígado, a causa de una enfermedad hepatocelular, sepsis, trastornos hereditarios, u obstrucción biliar extra hepática.

7.1.4 Albúmina y proteínas totales

Las proteínas integran un grupo de macromoléculas que participan en gran variedad de funciones dentro del organismo, entre las que se encuentran la respuesta inmunológica, transporte de moléculas, catálisis enzimática, distribución de líquidos, etc. Por ello, su determinación proporciona información sobre el funcionamiento y alteraciones patológicas de varias actividades orgánicas como las gastrointestinales, hepáticas, hematológicas, inmunológicas y renales (González *et al.*, 2013). Casi todas las proteínas del plasma se producen en el hígado, entre ellas la albúmina, esta proteína no sólo se altera cuando hay daño hepático sino cuando hay pérdida de proteínas, estados catabólicos y desnutrición. Es la proteína transportadora de numerosas sustancias endógenas, como la bilirrubina, y exógenas como los medicamentos. Se observa una disminución en la albúmina sérica cuando hay destrucción del tejido hepático (Fernández *et al.*, 2008).

7.1.5 Pruebas de función renal

Las pruebas de función renal tienen objetivos principales como la detección precoz de las lesiones renales, localización anatómica del daño (pre renal, glomerular, tubular) y cuantificar el daño del órgano comprometido. Algunas de estas pruebas van dirigidas a evaluar la función glomerular a través de la medida de la velocidad de filtración glomerular, y

otras, dirigidas a evaluar la función tubular. Entre las pruebas que evalúan la función glomerular se encuentran: reclutamiento minutado, urea y creatinina séricas, proteinuria cuantitativa, selectividad de proteinuria y depuración de creatinina. La prueba de dilución, excreción urinaria de ácidos, dintel para la reabsorción de bicarbonato, excreción fraccionada de bicarbonato, pH urinario vs bicarbonato plasmático, excreción de sodio, potasio, calcio y ácido úrico entre otras, están consideradas como pruebas de función tubular (González, 2015).

A continuación se describen algunas de las pruebas de función renal que se utilizaron en el presente trabajo.

7.1.6 Urea

Es un compuesto orgánico producido en el hígado como producto final del catabolismo de las proteínas (Prieto y Yuste, 2010). Es una de las sustancias más difusibles en el cuerpo, en concentraciones elevadas puede ser tóxica, ya que, puede desnaturalizar proteínas. Después de la síntesis en el hígado, la urea es llevada en la sangre hacia el riñón donde se filtra el plasma por el glomérulo, y la urea es excretada por la orina (González *et al.*, 2013). La concentración de urea en sangre (uremia) aumenta como consecuencia de dietas con exceso de proteínas, ejercicio, consumo de alimentos, insuficiencia cardiaca, estados de fiebre, sepsis extensa, hemorragias gástricas, hipovolemia, vómitos, diarreas, quemaduras extensas, obstrucciones renales, así como también por fármacos o tóxicos que propician la destrucción de proteínas. Una concentración alta de urea en sangre se le conoce como azoemia y si es acompañada con insuficiencia renal se le llama síndrome urémico (González *et al.*, 2013). La medición de la urea sanguínea ha sido utilizada para medir la filtración glomerular, pero sus resultados son poco confiables, ya que, varios factores generan su aumento, por lo tanto, es recomendable que se utilice en combinación con el análisis

de creatinina y nitrógeno ureico en sangre (BUN), para comprobar su origen renal (Ruiz y Ruiz, 2010).

7.1.7 Creatinina

La creatinina es el producto resultante del catabolismo de la fosfocreatina en el tejido muscular, trasladándose a la sangre y eliminándose casi en su totalidad por el riñón, sin embargo, no sufre reabsorción tubular, por lo que, a diferencia de la urea, las concentraciones plasmáticas de creatinina guardan estrecha relación con el volumen del filtrado glomerular o por una drástica modificación muscular. Igualmente, su valor es menos dependiente de la dieta y no se modifica con el ejercicio ni con las variaciones del metabolismo proteico. Por todo ello, este parámetro es mejor índice que la urea para determinar la función renal (Prieto y Yuste, 2010). Es importante mencionar que la concentración de creatinina variará inversamente con la filtración glomerular, por lo que cualquier reducción de ésta última representa una limitación en la excreción de creatinina, que continua produciéndose en el tejido muscular, originando la acumulación en el torrente sanguíneo (González *et al.*, 2013). El aumento de la creatinina responde a las mismas causas que la elevación de las cifras de urea de origen renal, donde la insuficiencia renal encabeza como el principal culpable de su crecimiento a nivel plasmático. (Prieto y Yuste, 2010).

7.1.8 Nitrógeno ureico en sangre

El nitrógeno ureico en sangre (BUN) (Blood Urea Nitrogen, por sus siglas en inglés) es la cantidad de nitrógeno circulando en forma de urea en el torrente sanguíneo. En animales sanos la urea es filtrada del plasma por el glomérulo renal. Esta regresa a la sangre a través de los túbulos renales, pero la mayoría se excreta a través de la orina. No obstante, si el riñón no está funcionando apropiadamente, no se puede remover suficiente urea del

plasma, llevando al aumento de los niveles de BUN. Con base a lo anterior esta prueba no es muy sensible ya que aproximadamente el 75% del tejido renal debe haber perdido su función antes de que se detecten valores altos en la sangre (Mutis y Pérez, 2005). Los niveles de nitrógeno ureico en la sangre fluctúan con un número de condiciones, tales como el aumento de la ingesta de proteínas, sangrado intestinal, infección, fiebre, deshidratación, medicamentos y quemaduras. La prueba de nitrógeno ureico en sangre no indica insuficiencia renal, así como la creatinina en suero, ya que los factores que contribuyen al cambio pueden estar presentes. Por lo tanto, el BUN debe ser considerado junto con la prueba de la creatinina en suero para demostrar su origen de tipo renal (Mutis y Pérez, 2005).

7.1.9 Ácido úrico

El ácido úrico es el producto de descomposición final del metabolismo de la purina dentro del hígado. En el plasma es transportado del hígado a los riñones, donde se filtra a través del glomérulo. La reabsorción del 98 al 100% del ácido úrico en el filtrado glomerular ocurre en los túbulos proximales, mientras que en los túbulos distales se secreta pequeña cantidad (González *et al.*, 2013). Esta ruta representa el 70% de la excreción diaria. En la enfermedad renal crónica aumenta la concentración de ácido úrico porque se deteriora la filtración y secreción, no obstante, esta prueba no es útil como indicador de la función renal porque muchos factores afectan su concentración plasmática, desde una dieta rica en carnes, fármacos o alcohol, de tal forma que su combinación con creatinina y BUN determinaría si su procedencia es de tipo renal (Prieto y Yuste, 2010; González *et al.*, 2013).

7.2 Determinación de glucosa en sangre

Como parte del análisis bioquímico, la determinación de glucosa en sangre es un sinónimo de lo saludable que se encuentra un organismo, su

disminución gradual es indicativa de un padecimiento que apenas está apareciendo o ya está presente pero en una etapa menor, es decir su nivel refleja las condiciones nutricionales, emocionales y endocrinas del sujeto (Murray, 2013). La glucosa es un azúcar simple formado por seis átomos de carbono. Su metabolismo oxidativo proporciona la mayor parte de la energía utilizada en el organismo, por lo que existen varios mecanismos de control homeostático para mantener las concentraciones constantes (Prieto y Yuste, 2010).

La presencia de cantidades detectables de glucosa se presenta cuando los valores de la glucosa en sangre superan la capacidad de reabsorción tubular. Esta suele presentarse cuando las cifras de glucosa sérica se encuentran por arriba de los 180 mg/dL. La presencia de glucosuria sin hiperglicemia se asocia a disfunción renal, donde la capacidad de absorción está disminuida (Ruiz *et al.*, 2010).

CAPÍTULO 8

MODELOS EXPERIMENTALES PARA EVALUAR TOXICIDAD

8.1 Modelos animales

El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en la investigación biomédica. Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnósticos y tratamientos de enfermedades que afectan al ser humano y a los animales, además de sus importantes aportes en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos, donde en muchos casos hasta la fecha son insustituibles (Hernández, 2006). El animal de laboratorio es cualquier especie animal que se mantiene bajo determinadas condiciones y se utiliza con fines científicos. Un animal estandarizado es aquel cuya composición genético-sanitaria es

bien definida, y su crianza y mantenimiento está bajo ambientes controlados que cumplen con los requerimientos específicos de cada especie, los cuales garantizan el bienestar del animal (Zúñiga, 2001). El ambiente en el cual se mantienen los animales debe ser el apropiado para cada especie, permitiendo el despliegue completo de las conductas específicas y disminuir al mínimo conductas inducidas por estrés (Balcombe, 2006; Gent, 2006). Los animales de laboratorio deben tener unas cualidades controlables desde el punto de vista de la experimentación, para que sean homogéneos se deben considerar tres aspectos (Molina *et al.*, 2012):

- Somático: peso, forma, sexo, entre otros.
- Genético: por su igualdad o similitud biológica.
- Sanitario: sin gérmenes (axénicos) o con gérmenes controlados (gnotoxénicos).

8.1.1 Modelos y características

Muchos investigadores consideran al ratón como un modelo animal casi perfecto por su corto tiempo generacional, alta reproducibilidad y fácil mantenimiento siendo los animales más sofisticados que pueden ser utilizados por los investigadores. La rata ocupa el segundo lugar, es utilizada en investigaciones nutricionales, comportamientos y endocrinológicas (Hernández, 2006).

8.1.2 Normativas y razones para el uso de modelos animales

Las razones para el uso de modelos animales es permitir investigar problemas científicos que son difíciles o imposibles de estudiar directamente en personas, ya que, nunca se han comprobado o apenas son descubiertas. Un modelo permite realizar la investigación en condiciones más sencillas, mejor controladas y económicas. Lo importante es que el modelo animal y la conducta humana sean similares con respecto a los rasgos relevantes del

problema en consideración. Por ejemplo, las similitudes entre las ratas y los humanos en la forma de evitar comidas peligrosas hacen que la rata sea un modelo válido para investigar el aprendizaje de aversión a la comida en humanos (Domjan, 2009), por lo tanto, la calidad de un nuevo descubrimiento dependerá de un número adecuado de elementos vivos más o menos semejantes con el ser humano donde se pueda comprobar y determinar su hallazgo, para conseguir su validez científica (Rodríguez, 2007).

En México el uso de los animales de experimentación por los investigadores se rige bajo la NOM-062-ZOO-1999 en donde se mencionan las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales, en resumidas cuentas nos menciona que para disponer de ellos es un privilegio pero conlleva muchas responsabilidades desde capacitación de un personal, instalación y equipamiento de un lugar, higiene, evaluación médica y disposición final de sus productos de desecho (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2000; Aluja, 2002).

A nivel internacional el elemento para el control de animales de experimentación es la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, que indica desde cómo tratar con animales, el medio ambiente donde se deben albergar, el uso apropiado de sedación (anestesia y analgesia), limpieza de las instalaciones y los planes de trabajo que se pueden operar con base al animal en estudio (Committee for the Update of the Guide for Care and Use of Laboratory Animal, 2011).

8.1.3 El uso de los animales en pruebas de toxicidad

Las investigaciones preclínicas más completas para determinar el riesgo en el humano son los estudios en animales de laboratorio; estas investigaciones son de obligada necesidad en la evaluación de productos químicos, como los componentes de alimentos, fármacos y agroquímicos.

Hasta el presente, no hay dudas sobre la importancia práctica de las pruebas *in vitro* y de otros sistemas alternativos, pero éstas no pueden considerarse sustitutivas de los estudios con animales (Flanm y Loretzen, 1986). La mayoría de las pruebas alternativas con sistemas celulares y componentes subcelulares pueden ayudar a entender los efectos y mecanismos a estos niveles. Pero estas pruebas tienen la limitación de no predecir la respuesta morfofuncional general del organismo (Tennant *et al.*, 1987). Estudios han demostrado que existen razones para el empleo de animales, por ejemplo en investigaciones con células aisladas, sólo se logran interacciones de los componentes subcelulares de un tipo, y en el caso de los animales se producen entre células del mismo tipo o de diferentes tipos de órganos, como, por ejemplo, hígado y riñón, timo y tejido linfoide, hipófisis y otras glándulas. Estas respuestas sistémicas no pueden ser conseguidas con los sistemas alternativos. En resumen, en el animal hay un amplio y complejo mecanismo de retroalimentación entre órganos y tejidos ajustado a la variación química y a las modificaciones del medio ambiente, frente a las cuales el animal se compensa y sobrevive o sobre reacciona y muere. Esto es imposible de conseguir en las pruebas *in vitro* o sistemas celulares aislados (Rao y Huff, 1990).

Las investigaciones que emplean animales son de distinta índole y, por supuesto, van dirigidas a evaluar diferentes situaciones relacionadas con la toxicidad de los compuestos, incluyen, además de las clásicas pruebas agudas, precrónicas y de larga duración, otros sistemas como los estudios de toxicidad reproductiva, reacciones alérgicas y de inmunotoxicidad (Moreira, 1995).

A pesar de las grandes diferencias anatómicas, fisiológicas y metabólicas de las especies e incluso rasgos individuales dentro de ellas, todos los seres vivos comparten una larga serie de caracteres comunes que permiten la comparación de datos obtenidos experimentalmente entre ellos y, por supuesto, con el hombre, sin embargo, es un hecho innegable que en

particular los mamíferos funcionan con más semejanzas metabólicas que diferencias, y en ello se fundamenta el empleo de modelos animales para probar los compuestos químicos que por diferentes razones se van a poner en contacto con los seres humanos (Moreira, 1995).

CAPÍTULO 9

APORTACIÓN AL ESTUDIO TOXICOLÓGICO DE LA LINAMARINA A NIVEL PRECLÍNICO

En esta fase experimental se utilizaron 16 ratas macho adultas de la cepa Wistar con un peso entre 350-400 g al inicio de los experimentos. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estandar en un bioterio de instancia con temperatura ambiente y ciclo de luz oscuridad de 12 X 12 horas (la luz se encendió a las 7:00 am). El acceso al agua y alimento fue *ad libitum*. Todas las manipulaciones experimentales fueron realizaron de acuerdo a los códigos internacionales de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Committee for the Update of the Guide for Care and Use of Laboratory Animal, 2011), y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (SEMARNAT, 2001).

Para evaluar la dosis tóxica de linamarina se han utilizado diferentes modelos animales y distintas dosis, sin embargo, la dosis utilizada en este trabajo fue semejante a los trabajos de Soler-Martin *et al.*, 2010; cuyos resultados evidenciaron que las dosis de 20mM de acetoniato de hidrina muestran efectos desde las primeras administraciones. Los grupos experimentales del presente trabajo estuvieron integrados por un vehículo, y un grupo de linamarina a una concentración de 20 mM. El volumen de 0.4 mL está basado en los trabajos de Krinke, 2000; y Machholz *et al.*, 2012,

donde se menciona que el volumen recomendado para la administración intraperitoneal es de 10 mL/Kg.

9.1 Diseño experimental

El presente trabajo siguió un diseño transversal, conformado por dos grupos (n=8), un grupo control al cual se le administró 0.4ml de solución salina isotónica 0.9% y un segundo grupo al que se le administró una dosis de linamarina 20mM utilizando el mismo volumen que para el grupo control, ambos grupos tuvieron un esquema subcrónico el cual está basado en las publicaciones de Rogóz, *et al.*, 2002, Martínez, *et al.*, 2012 y Santos, *et al.*, 2012, y consiste en realizar tres inyecciones por vía intraperitoneal, en un periodo de 24 horas: 24, 5, y 1 hora antes de la toma de la muestra. Los animales fueron sometidos a pruebas conductuales al finalizar las administraciones. Posteriormente se tomó una muestra sanguínea transcárdica para su análisis.

9.2 Esquema de dosificación y administración

En este estudio se utilizó la vía de administración intraperitoneal. Para realizar esta administración, la aguja debe entrar en la piel en un ángulo de 20 a 45 °. Para evitar la inyección en el intestino o la vejiga urinaria, es esencial para insertar sólo la punta de la cánula en la cavidad peritoneal (Claassen, 1994). Cuando se utiliza este método se tiene que tener en cuenta que las sustancias administradas por esta vía se absorben primero en la circulación portal. La biotransformación de las sustancias inyectadas puede tener lugar en el hígado antes de alcanzar la circulación general, de modo que su biodisponibilidad es muy diferente a la de una inyección intravenosa. Las inyecciones intraperitoneales generalmente se llevan a cabo sin anestesia, se debe aplicar en el cuadrante inferior izquierdo del abdomen.

En esta zona de la rata no hay órganos vitales, excepto para el intestino delgado (CCAC, 1980).

9.3 Pruebas conductuales

Se utilizó la prueba de actividad locomotriz en campo abierto. Esta prueba consistió en colocar a la rata en una caja de acrílico opaca (44 X 33 X 20 cm) cuya base está dividida en cuadros de 11 X 11 cm. Se evaluó el número de cuadros cruzados por el animal durante los 5 minutos de prueba tomando como criterio que la rata pasara al menos tres cuartas partes de su cuerpo de un cuadro a otro (Figura 6). Esta evaluación se empleó para determinar un posible efecto de hipoactividad inducida por los tratamientos. En esta misma prueba se contabilizó el número de periodos de conducta vertical y su duración, esta conducta es definida como los periodos en los que la rata adquiere una postura vertical con respecto al piso, apoyada en sus extremidades posteriores. Otra variable evaluada fue el acicalamiento, definido como aquellos periodos en los que el animal realiza movimientos cortos con sus extremidades anteriores dirigidos de manera cefalocaudal. La conducta vertical y el autoacicalamiento se utilizaron para detectar posibles alteraciones en la coordinación motora.



Figura 6. Prueba de campo abierto. Representación de la variable número de cuadros cruzados.

Adicionalmente se incluyó la prueba de Rota-rod, la cual permitió evaluar la incoordinación motriz en los animales. El “rota rod” consiste en una barra giratoria que trabaja a diferentes velocidades, en este caso se ajustó a 18rpm, sus dimensiones constan de 3cm de diámetro, colocada a una altura de 17cm. La barra está dividida en cuatro compartimentos de 7.5cm de ancho, delimitados por discos de 25cm de diámetro, en cada compartimento

se colocó a una rata. Para esta prueba se realizó un entrenamiento previo a las ratas en el rota-rod durante 5 días consecutivos entre 1-5 min, respectivamente. Los animales fueron colocados en el aparato y se midió el tiempo de latencia durante el cual las ratas caminaron sobre el rodillo hasta su caída (latencia a la caída), donde una lámina (plato o placa) detendrá el conteo al caer el animal (Figura 7) (García *et al.*, 2008)



Figura 7. Rota-rod. Evaluación de la coordinación motora de la rata.

Otras de las pruebas incluidas en este estudio fue la prueba de nado. Esta prueba consistió en colocar al animal en un estanque de vidrio (26 X 29 cm de base X 50 cm de altura) con agua a una temperatura de 25°C (± 1). El nivel de agua se ajustó de manera que le permitió al animal tocar el fondo del estanque con las extremidades posteriores y la cola. En esta prueba se evaluó el número de giros, definidos como los periodos en los cuales la rata no tiene desplazamiento y nada girando sobre su eje (Figura 8), la conducta de giro es un comportamiento de incoordinación y desequilibrio que se le ha atribuido al daño sustancias con capacidad neurotóxica (Rivadeneira *et al.*, 2009; Saavedra *et al.*, 2011).

Todas las sesiones de prueba en campo abierto y nado forzado fueron video-grabadas para realizar el registro manual por dos observadores independientes y verificar los resultados. Las grabaciones se realizaron con un dispositivo de videograbación externo y un dispositivo acoplado a un

software de seguimiento de video diseñado para automatizar las pruebas en los experimentos de comportamiento, llamado ANY – maze™ de la versión 4.98.



Figura 8. Nado Forzado. Evaluación de la conducta de giro.

9.4 Obtención de muestras sanguíneas

La obtención de muestras se llevó a cabo mediante punción transcardiaca para lo cual se sometió al animal a anestesia profunda con éter etílico, procurando mantenerlo con vida; Se utilizaron jeringas de 5mL con un tamaño de aguja de 22mm. Se colocó a la rata en posición ventral y la aguja fue insertada a través de la pared torácica lateral y espacios intercostales, en la región máxima de pulsación del corazón en un ángulo de 20 a 30°, se avanzó lentamente la aguja, haciendo leve presión negativa en el barril de la jeringa (la sangre fluye en el cubo de la aguja cuando la punta ha entrado en



una de las cámaras del corazón), y se aspiró suavemente hasta que el flujo sanguíneo se detuvo (figura 9) (Donovan y Brown, 2006).

Figura 9. Punción transcardiaca.

Las muestras sanguíneas obtenidas fueron colocadas en tubos secos de la marca Vacutainer, dejando coagular la sangre y posteriormente se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos para obtener el suero al cual se le realizaron las siguientes pruebas bioquímicas (Glucosa, BUN, urea, creatinina, ácido úrico) y pruebas de funcionamiento hepático (transaminasas, fosfatasa alcalina, proteínas totales, bilirrubina, albumina), utilizando el método de química seca (sistema multicapas en un soporte de plástico que contiene todos los reactivos necesarios para analizar la muestra) a través del equipo Vitros 250 de Johnson & Johnson. Los resultados obtenidos de las diferentes pruebas se compararon con los intervalos de referencia normales que se presentan en la tabla 4 y 5.

Tabla 4. Valores de referencia de Química Sanguínea para ratas de la cepa Wistar.

Analito	Valores	Unidades
Glucosa	6-10	mmol/L
Urea	10.7 - 20	mg/dL
Creatinina	11 -28	µmol/L
Ácido úrico	50 -250	µmol/L
BUN	3-7	mmol/L

Tomada de Suckow *et al.*, 2006; Giknis y Clifford, 2008; Sharp y Villano, 2013

Tabla 5. Valores de referencia de Pruebas de Funcionamiento Hepático para ratas de la cepa Wistar.

Analito	Valores	Unidades
AST	63-157	U/L
ALT	19-53	U/L
ALP	36-312	U/L
Bilirrubina T.	0.04-0.2	mg/dL
Bilirrubina I.	0-0.1	mg/dL
Bilirrubina D.	0.03-0.06	mg/dL
Proteínas totales	5.6-7.6	g/dL
Albúmina	4-5	g/dL

Tomada de Suckow *et al.*, 2006; Giknis y Clifford, 2008; Sharp y Villano, 2013

Los datos numéricos que pasaron la prueba de normalidad de cada una de las variables cuantificadas fueron analizadas mediante la prueba t-Student, en caso contrario la prueba utilizada fue la U-Mann-Whitney. El criterio de significancia fue de $p \leq 0.05$.

Resultados

Campo Abierto

Ninguno de los tratamientos modificó significativamente el número de cuadros cruzados [$t = -1.933$; $p = 0.074$], aunque fue mayor en el grupo linamarina 20mM (87.500 ± 9.705) respecto al grupo Vehículo (56.625 ± 12.691). De igual forma, e análisis del tiempo empleado en el acicalamiento no mostró diferencias significativas [$t = 1.297$; $p = 0.216$] entre los grupos: Vehículo (71.696 ± 17.120 s) y linamarina 20mM (46.289 ± 9.952 s). De manera semejante, el análisis del tiempo empleado en la conducta vertical no reveló diferencias significativas [$t = -1.902$; $p = 0.078$] entre los grupos: Vehículo (217.071 ± 16.569 s) y Linamarina 20mM (255.348 ± 11.420 s).

Rota-Rod

En esta prueba que permite evaluar el deterioro en el equilibrio del sujeto experimental, el análisis de la latencia a la caída en el rota-rod no reveló diferencias significativas [$t = -0.263$, $p = 0.817$] entre grupos: Vehículo (217.071 ± 16.569 s) y Linamarina 20mM (255.348 ± 11.420 s).

Prueba de nado

La conducta de giro permite evaluar la incoordinación motora durante el nado, cabe señalar que esta conducta sólo se presentó en el grupo tratado con linamarina 20mM (6.35 ± 1.31), y no fue observada en el grupo vehículo. Debido a este hecho no fue posible realizar el análisis estadístico de esta variable.

Estudio Serológico

Los datos de las pruebas bioquímicas son presentados en la Tabla 6 y 7. En el grupo linamarina 20mM se encontró un incremento significativo de los valores de los analitos que integran la química sanguínea tales como urea, creatinina, ácido úrico y nitrógeno ureico, en los cuales se obtuvieron valores muy por arriba de los de referencia y los obtenidos en el grupo vehículo.

Tabla 6. Datos de química sanguínea de las ratas tratadas con linamarina 20mM en un tratamiento subcrónico 24, 5 y 1 hora antes de la toma de la muestra.

Química Sanguínea			
Analitos	Grupos Experimentales	Valores de Referencia	Valor de p

	Vehículo (n=8)	Linamarina 20mM (n=8)		
Glucosa	6.49 ± 0.19	3.75 ±0.084*	6 – 10 (mmol/L)	p= <0.001
Urea	13.57 ± 0.39	35.33 ± 1.02*	10.7 – 20 (mg/dL)	p= <0.001
Creatinina	9.56 ± 0.97	60.12 ± 0.12*	11 – 28 (µmol)	p= <0.001
Ac. Úrico	55.195 ± 1.07	281.37 ± 11.43*	50 – 250 (µmol)	p=<0.001
BUN	5.30 ± 0.27	10.02 ± 0.29*	3 – 7 mmol/L	p= <0.001

Los valores se expresan como media ± el error estándar, * p< 0.05 vs grupo vehículo.

Tabla 7. Datos de pruebas de funcionamiento hepático de las ratas tratadas con linamarina 20mM en un tratamiento subcrónico 24, 5 y 1 hora antes de la toma de muestra.

Pruebas de funcionamiento hepático				
Analitos	Grupos Experimentales		Valores de Referencia	Valor de p
	Vehículo (n=8)	Linamarina 20mM (n=8)		

AST	60.12 ± 8.23	215.25 ± 21.50*	63 – 157 (UI/L)	p= <0.001
ALT	58.50 ± 1.23	71.75 ± 1.23*	19 – 53 (UI/L)	p= <0.001
ALP	187.87 ± 12.43	326.37 ± 4.96*	36 – 312 (UI/L)	p= <0.001
Bilirrubina T	0.21 ± 0.02	0.667 ± 0.007*	0.04 – 0.2 (mg/dL)	p= <0.001
Bilirrubina I	0.06 ± 0.01	0.100 ± 0.00	0 – 0.1 (mg/dL)	p= 0.021
Bilirrubina D	0.27 ± 0.07	0.525 ± 0.02*	0.03 – 0.06 (mg/dL)	p= 0.008
P. Totales	5.55 ± 0.12	4.113 ± 0.13*	5.6 – 7.6 (g/dL)	p= <0.001
Albúmina	4.22 ± 0.08	2.975 ± 0.07*	4 – 5 (g/dL)	p= <0.001

Los valores se expresan como media ± el error estándar, * p< 0.05 vs grupo vehículo.

La concentración de glucosa [t= 13.003; p= <0.001], urea [t= -19.984; p= <0.001], creatinina [t= -51.517; p= <0.001], ácido úrico [t= -19.69; p=<0.001] y nitrógeno ureico [t= -11.714; p= <0.001], fue mayor respecto al grupo vehículo, bajo nuestras condiciones experimentales. Por otro lado, el aspartato aminotransferasa (AST) [t=-6.73; p= <0.001], la alanina aminotransferasa [t= -7.571; p= <0.001] y la fosfatasa alcalina (ALP) [t= -10.34; <0.001] fueron significativamente mayor, respecto al grupo vehículo.

En el caso de las proteínas totales [t= 7.912; p= <0.001] y la albúmina [t= 11.428; p= <0.001], se observó una reducción significativa en su concentración, respecto al grupo vehículo.

Finalmente, la bilirrubina directa [t= -3.100; p= 0.008] y total [t= -20.131; p= <0.001] fue significativamente mayor, respecto al grupo vehículo. Mientras que se mostraron diferencias significativas de acuerdo a los tratamientos, para la directa y la total. Por su parte la bilirrubina indirecta no reveló diferencias significativas [t= -2.600; p= 0.021], La prueba indicó que la concentración de linamarina aumenta estas variables con respecto al grupo vehículo.

Discusión

La toxicidad conductual deriva de las modificaciones inducidas por sustancias que impactan en la percepción, el procesamiento e integración mental de la información y que repercute en la actividad psicomotriz, lo cual impacta negativamente en el individuo; esto interfiere en su capacidad de adaptar su conducta a los acontecimientos, necesidades y ambiente de su entorno físico (González De Rivera, 1993).

La prueba de campo abierto se utiliza para evaluar la actividad motora basal, detectar alteraciones motoras e identificar cambios en la motricidad de los animales bajo tratamientos farmacológicos o determinadas manipulaciones experimentales (Brudzynski y Krol, 1997). En el presente

experimento se utilizó esta prueba para identificar alteraciones en los patrones motores de la rata, asociados a la administración intraperitoneal subcrónica de linamarina 20mM. Con los resultados obtenidos en el número de cuadros cruzados se aprecia que el tóxico no afectó la actividad exploratoria, el equilibrio, ni la coordinación motora; pero se observa que hay una tendencia a incrementar esta conducta.

Esta prueba se ha utilizado para evaluar fármacos con efectos neurotóxicos que se manifiestan en cambios conductuales y psicomotrices que reflejan un daño en el Sistema Nervioso Central (Hasan y Maheshwari, 2013). Las funciones motoras requieren un conjunto de músculos, reflejos y regiones del cerebro, específicos para su eventual procedimiento, observando mejor las alteraciones en las estructuras del Sistema Nervioso Central que regulan la función motora (Crawley, 2007).

Por otro lado, en la prueba de nado, la conducta de giro se ha asociado a alteraciones en la coordinación motora de las extremidades y desequilibrio. En relación con los pacientes que presentan Neuropatía Atáxica Tropical y Konzo, la incoordinación motora y desequilibrio se atribuye específicamente al desarrollo y presencia de una parálisis lenta y progresiva de las extremidades, que impiden generar correctamente movimientos y en algunos casos mantenerse en pie (U.S. Department of Health and Human Services, 2012), esta afectación en la rata se observa al nadar en giros, puesto que al serle imposible nadar de manera normal, busca la forma de encontrar su equilibrio y coordinar sus movimientos, sin lograrlo. En nuestro grupo de investigación, esta prueba ha sido empleada para la evaluación de alteraciones motrices e incoordinación en ratas, y se demostró que el consumo crónico de semillas de cícada o de jugo de yuca producen dos tipos de conductas anormales durante el nado de las ratas: la de giro y el nado lateral (Rivadeneira et al., 2009; Rivadeneira et al., 2012). La administración

intraperitoneal subcrónica de linamarina 20mM promovió la aparición de la conducta de giro en la prueba de nado, la cual no se presentó en el grupo vehículo. Lo anterior sugiere que la linamarina puede ser una de las sustancias responsables de las alteraciones motoras asociadas con el consumo a largo plazo de yuca.

Para evaluar un estudio de toxicidad se miden distintos parámetros bioquímicos que permiten identificar una amplia gama de sucesos fisiológicos y metabólicos, las pruebas de funcionamiento hepático y renal son de las principales que nos permiten apreciar los daños provocados por un tóxico. El hígado es el órgano más grande del cuerpo y uno de los más importantes en cuanto a la actividad metabólica que desarrolla en el organismo, puede decirse que es el centro de tratamiento de residuos tóxicos y por eso está más expuesto a sufrir efectos nocivos (Haley y Berndt, 1987).

La hepatotoxicidad se define como un daño en el hígado que se asocia con insuficiencia hepática causado por exposición a algún xenobiótico, la señal de lesión hepática tradicionalmente utilizada es la elevación de alanina aminotransferasa, pero esta enzima no es considerada como un marcador específico por lo que se consideran otras pruebas que en conjunto evalúan mejor el daño hepático, tales como bilirrubinas, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa, proteínas totales y albúmina (Prieto y Yuste, 2010). Las elevaciones en los niveles séricos de las enzimas ALT, AST y FA, son tomadas como indicadores de daño hepático, mientras que los incrementos en los niveles de bilirrubina total y conjugada como medidas de función hepática. Los niveles de bilirrubina total o bilirrubina directa reflejan la capacidad del hígado para hacer el pasaje de la bilirrubina del plasma a la bilis. Otros parámetros de función hepática es la cuantificación de la síntesis de proteínas, lo que se refleja en los cambios de la concentración de albúmina (Risso, 2008).

Los valores obtenidos en los parámetros que integran las pruebas de funcionamiento hepático (ALT, AST, FA, bilirrubina directa e indirecta), en

este estudio, así como la disminución de proteínas totales y la albúmina demostraron un evidente daño en el hígado, lo que indica que linamarina 20mM en un tratamiento subcrónico 24, 5 y 1 hora antes de la toma de la muestra causa toxicidad hepática, estos resultados se asemejan a los obtenidos en otras investigaciones (Sousa et al., 2002; Shama y Wasma, 2011; Osoteku et al., 2013) donde se utilizaron distintas dosis de linamarina, acetonicianohidrina y cianuro de potasio en ratas, manejando distintos tiempos y donde se pudieron identificar daños hepáticos y renales a través de estudios bioquímicos e histológicos.

Por otro lado, existe una gran cantidad de tóxicos que pueden producir daño a nivel renal, tanto en forma directa como indirecta (Cachafeiro *et al.*, 2015). El riñón es el órgano más importante para la eliminación de xenobióticos y sus metabolitos o formas conjugados en el cuerpo (Haley y Berndt, 1987).

Las pruebas de función renal se basan en la determinación del nitrógeno no proteico de la sangre (creatinina, urea y ácido úrico), aunque también es importante evaluar el nitrógeno ureico y la glucosa. La creatinina se produce de forma endógena a partir de la creatina y el creatinfosfato como resultado de los procesos metabólicos musculares. Se elimina por riñón mediante filtración glomerular. Su determinación en suero sirve para el diagnóstico y el control de enfermedades renales agudas y crónicas así como para la estimación del filtrado glomerular (Perazzi y Angerosa, 2011). La urea es el producto final del catabolismo proteico, se filtra libremente por el glomérulo y se reabsorbe de forma pasiva en la nefrona, el aclaramiento urinario de urea permite estimar la función renal, en situaciones de reducción de volumen, al disminuir la perfusión renal, aumenta la reabsorción de urea, lo que conlleva una elevación de sus niveles plasmáticos. El ácido úrico es el producto final del catabolismo de las purinas, se filtra libremente a nivel glomerular, se reabsorbe y se excreta de forma activa en los túbulos renales.

Cuando existe un daño renal se altera el mecanismo de eliminación del ácido úrico, siendo habitual que aparezca hiperuricemia (Avendaño *et al.*, 2008).

El nitrógeno ureico es un producto de desecho producido por la descomposición de proteínas, su medición en sangre es probablemente el procedimiento más comúnmente utilizado para la evaluación de la función glomerular y es notablemente sensible. Cuando la filtración glomerular disminuye, el BUN aumenta. Paralelamente, hay un aumento en el nivel de creatinina en plasma. La relación entre el BUN o creatinina en plasma y la tasa de filtración glomerular ha sido bien establecida en la insuficiencia renal crónica. La función tubular puede ser evaluada por la medición de la excreción urinaria de varias sustancias. Después de la administración de una sustancia nefrotóxica existe una reducción en la reabsorción de glucosa, por lo tanto también es importante evaluar los niveles de glucosa en sangre (Haley y Berndt, 1987).

Todos los componentes de la química sanguínea que se evaluaron en el presente trabajo nos permiten apreciar la función renal a partir de la evaluación de la filtración glomerular, el incremento significativo en las concentraciones de estos analitos se correlaciona con la administración del neurotóxico, ya que las ratas pertenecientes al grupo vehículo tuvieron valores dentro del rango de referencia, lo que nos indica que el tóxico está ejerciendo un efecto nocivo en los riñones.

Se han reportado otros estudios donde se relaciona al consumo de yuca con daños renales (Okolie, 1999). En conejos alimentados con yuca y frijoles que contenía cantidades considerables de glucósidos cianogénicos, se demostró que hubo daño hepático y, el aumento de urea y creatinina se asoció a un daño de la función renal, impidiendo la filtración correcta de los desechos y provocando el aumento sérico de estos analitos; por otro lado, Shama y Wasma (2011) utilizaron ratas para determinaron que los glucósidos cianogénicos son elementos que generan toxicidad en el consumo crónico de yuca, a través de la administración crónica por vía oral

de un extracto de yuca, lo que causó una vacuolización de los hepatocitos y alteración de los glomérulos, así como degradación o necrosis de los túbulos renales.

Ramírez (2010) menciona que después de una exposición no letal de ácido cianhídrico su vida medía en plasma solo sería entre 20 y 60 min, con lo que se explica que la administración de linamarina 20mM en un tratamiento subcrónico 24, 5 y 1 hora antes de la toma de la muestra provoque alteraciones a nivel renal y hepático, ya que el tóxico tiene tiempo suficiente de llegar a la circulación sanguínea y por lo tanto comenzar su metabolismo y excreción.

Las investigaciones de la presente línea de trabajo, han determinado que la administración oral de jugo de yuca en ratas sanas y sin un control de dieta, genera incoordinación motriz en pruebas de campo abierto (aumento en el número de cuadros cruzados, deterioro de la conducta vertical y de la conducta de acicalamiento), rota-rod (deterioro de la actividad motora y desequilibrio motor), y en la prueba de nado (aparición de la conducta de nado lateral y de la conducta de giro). También se han identificado que la administración de linamarina o acetonaohidrina intracerebralmente, producen alteraciones conductuales y motrices en la prueba de campo abierto (incremento en el número de cuadros cruzados y conducta vertical) y en nado (aparición de la conducta de giro y nado lateral), en las mismas condiciones de dieta.

En conclusión, la administración de linamarina en un tratamiento de 24, 5 y 1 hora antes de realizar las pruebas conductuales y la toma de la muestra, provoca alteración motora en la conducta de nado, así como daño renal y hepático en la rata macho Wistar, lo que sugiere que este principio activo, contenido en la yuca, podría contribuir a los efectos tóxicos asociados a su consumo bajo ciertas condiciones.

Referencias Bibliográficas

- Álamo, C. (2005). Guía farmacológica de analgésicos. Madrid, España: Ediciones Arán, pp. 114-15.
- Allem, AC. (2002). Cassava: Biology, Production y Utilization. The origins and taxonomy of cassava. CABI Publishing. 1–16.
- Aluja, AS. (2002). Animales de Laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Gac Med Méx; 138: 295-8.
- Avendaño, L., García, A., Rodríguez, A., Díaz, C., Egido de los Ríos, J., Peláez, LS. (2008). Nefrología clínica. 3era Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid España.
- Balcombe, J. (2006). Laboratory environments and rodents behavioural needs, a review. Laboratory Animals. 40 (3): 217-235.
- Benea, JP., Tylleskar, T., Gitebo, N., Matadi, N., Gebre-Medhin M., Rosling, H. (1997). Geographical and seasonal association between linamarin and cyanide exposure from cassava and the upper motor neurone disease konzo in former Zaire. Trop Med Int Health. 2 (12): 1143-51.
- Borgel, L. Brantes, MJ. Briones, BG., Argandoña, MM., Intriago, AG., Inojosa, R., Tapia ZR. (2001). Protocolos para el manejo del paciente intoxicado. Santiago, Chile: Organización Panamericana de la salud, pp. (2) 69-88.

- Boxer, G. y Rickards, J. (1952). Studies on the metabolism of the carbon of cyanide and thiocyanate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 36:7–26.
- Brudzynski, SM., Krol, S. (1997). Analysis of locomotor activity in the rat: parallelism index, a new measure of locomotor exploratory pattern. *Physiol Behav*; 62:635-42.
- Cachafeiro L., Estébanez, B., Asensio, M., Perales, E. (2015). Protocolo diagnóstico del daño renal por tóxicos y productos tisuulares. *Medicine*; 11(79): 4772-6.
- Cartay, R. (2004). Difusión y comercio de la yuca (*Manihot Esculenta*) en Venezuela y en el mundo. *Agroalimentaria*; 18: 13-22.
- CCAC (Canadian Council on Animal Care) (1980). In *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*, 1: 53-54. Ottawa:CCAC.
- Ceballos, H. (2002). La yuca en Colombia y el Mundo: Nuevas Perspectivas para un Cultivo Milenerario. In Ospina, B; Ceballos, H. *La Yuca en el Tercer Milenio. Sistema Moderno de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización*. CIAT .CO. Vol. 327 Capitulo I. p. 1-13.
- Cereda, P. (2003). Procesamiento de yuca como mecanismo de destoxificación. Serie: cultura de tuberculosas amiláceas latino-americanas. *Fundación Cargill*. 3(3): 47-80.
- Claassen, V. (1994) In: Claassen, V *Neglected Factors in Pharmacology and Neuroscince Research*, pp 46-58. Amsterdam:Elsevier

- Cock, JH. (1989). La yuca, Nuevo potencial para un cultivo tradicional. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 240.
- Committee for the Update of the Guide for Care and Use of Laboratory Animal. (2011). Guideline for the care and use of laboratory animals. 8va edición. Washington D.C., USA: National academic press, pp. 1-246.
- Cooke, RD., Richard, JE., Thompson, AR. (1985). Nutritional aspects of cassava storage and processing. VIth Symposium of the International Society for Trpical Root Crops, Guadalupe, pp. 645-48.
- Conn, E.E. (2009) Cyanogenic glycosides. *Int Rev Biochem*; 27: 21-43.
- Crawley, J. (2007). What's Wrong With My Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice. 2da edición. New Jersey, United States: John Wiley y Sons, Inc. pp. 69-71.
- Cruz, G. (2002). Taxonomía y Morfología de la Yuca. In Ospina, B; Ceballos, H. La Yuca en el Tercer Milenio. Sistema Moderno de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización. CIAT. Vol. 327 Capitulo II. p. 17-34.
- Da Silva, J. (2008). Derivados de la yuca y componentes tóxicos en Brasil. *Temas agrarios*. 13(2): 5-16.
- Domjan, M. (2009). Principios de aprendizaje y conducta. 5ava edición. Madrid, España: Parainfo; pp 12-14.

- Donovan, J., Brown, P. (2006). Blood Collection. Current Protocols in Immunology. Chapter 17. Supplement 73, Unit 1.7, John Wiley y Sons, Inc.
- Dufour, R., Lott, J., Nolte, F., Gretch, D., Koff, R., Seeff, L. (2000). Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance Characteristics of laboratory test. Clin Chem. 46: 2027 – 2049.
- Durani, Y. (2014). Análisis de sangre: función hepática (hígado). Chief Medical Editor, KidsHealth, Nemours Center for Children's Health Media, Division of Endocrinology, pp. 1-6.
- Ernesto M, Cardoso AP, Nicala D, Mirione E y Bradbury JH, (2002). Persistent Konzo and cyanogen toxicity from cassava in northern Mozambique. Acta Trop; 82, 357–62.
- Fernández, E., Fernández, E., Moreno, I., Moreno, M. (2008). Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico. Medicina & Laboratorio. 14: 11-12.
- Flanm, WG., Loretzen, RJ. (1986). The use of in vitro methods in safety evaluation. In Vitro Toxicol; 87(1):3-4.
- Gámez, R., Más, R. (2007). Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. CENIC Ciencias Biológicas; 38(3).
- García, M., Díaz, C., Villalobos, R. (2008). Estudio toxicológico y farmacológico de los extractos hidroalcohólicos de algunas especies de Smilax de Centroamérica. Revista de Fitoterapia; 8 (1) 49-57.

- Gent, NA. (2006). Study in refining husbandry techniques for the in house breeding of rat and mice. *Animal Technology and Welfare*; 5(1): 3-8.
- Giknis, M., Clifford, CB. (2008). Clinical laboratory parameters for Crl: WI (Han). Charles River: accelerating drug development exactly, pp 1-17.
- González De Rivera RJL, (1993). Toxicología conductual de los psicofarmacos: concepto e instrumento de medida. *Psiquis*, 14 (1): 1-9.
- González, ME., Rojas, AE., Hernández, C., Camarillo, AL. (2013). Manual de Prácticas Química Clínica. Amateditorial. Zapopan, Jalisco.
- González, F. (2015). Pruebas de Función Renal. Departamento de Pediatría, Hospital Militar "Dr. Carlos Arvelo". Caracas, Venezuela. pp 1-12.
- Haley, TJ., Berndt, W. (1987). Toxicology. Hemisphere Publishing Corporation.
- Hasan, S., Maheshwari, TP. (2013). Pyrethroid Based Mosquito Repellent Inhalation Induced Changes. In Physical Activity In Albino Rats After Chronic Exposure. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 3.
- Hernández, R., Fernández, C., Baptista, P. (2010). Metodología de la Investigación. 5ta edición. Editorial McGraw-Hill. Chile.
- Hernández, S. (2006). El modelo animal en las investigaciones Biomédicas. *Biomedicina*. 2(3): 252-6.

- Jansz, ER., Uluwaduge, I. (1997). Biochemical aspects of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with special emphasis on cyanogenic glucosides - A Review. *J. Nat. Sci. Foundation. Sri Lanka* 25(1):1-24.
- Kew, M. (2000). Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *The Lancet*. 355: 591- 592.
- Krinke, GJ. (2000). The laboratory rat, en capítulo: Rutes of administration, Metabolism digest; Sistem Urinary. Londres, Inglaterra: Academic Press, pág. 253-67; 359-88; 385-400.
- Laboratory Animals (1993). Extracción de Sangre en los Mamíferos y Aves de Laboratorio PRIMER INFORME DEL GRUPO CONJUNTO DE TRABAJO BVA/FRAME/RSPCA/UFAW SOBRE EL REFINAMIENTO. 27: 1-22.
- Lang, J. y Stintzy, F. (2010) A case of slow poisoning by hydrocyanic acid caused by cyanhydrin acetone. *Arch Mal Prof*; 21: 652-657.
- Llorens, J. (2004). Enfermedades neurológicas asociadas al consumo de variedades de mandioca con alto contenido en gluconitrilos. *Endocrinol Nutr*. 51(7): 418-25.
- Lorenzo, P., Moreno. A., Lizasoain, I., Leza, JC., Moro, MA., Portolés, A. (2008). *Farmacología básica y clínica*. 18a. Edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, pp. 1205.
- Mabberley, DJ. 1998. *The plant-book*, 2da Editions. Cambridge University Press, Cambridge. 858 p.

- Machholz, E., Mulder, G., Ruiz, C., Corning, BF., Pritchett-Corning, KR. (2012). Manual Restraint and Common Compound Administration Routes in Mice and Rats. *J Vis Exp.* (67), e2771, doi:10.3791/2771.
- McMahon, J., White, W., Sayre, R.T. (1995) Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J Exp Bot*; 46: 731–741.
- Marín, A., Perdomo, D., Albarran, JG., Fuenmayor, F., Zambrano, C. (2008). Evaluación morfológica y bioquímica de clones élites de yuca a partir de vitroplantas. *INCI. Caracas.* 33 (5).
- Martínez, L., Herrera, JJ., Olivares, N., Fernández, A. (2012). Participación de las hormonas gonadales en el efecto de los fármacos antidepresivos en la rata macho. *Salud Mental*; 35: 359-366.
- Mattos, P., Gomes, C., Farias, N., Fukuda, C. (2002) Cultivo da yuca nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. *Cultura de tuberosas amiláceas Latino Americanas, Fundação Cargill*; 2 (14): 274-301.
- Maziya-Dixon, B., Dixon, AGO., Ssemakula, G. (2009). Changes in total carotenoid content at different stages of traditional processing of yellow-fleshed cassava genotypes. *Int J Food Sci Technol* 44: 2350–2357.
- Molina, JL., Silveira, PE., Heredia, RD., Fernández, CD., Bécquer, ML., Gómez, HT., González, MY., Castro, M. (2012). Los simuladores y los modelos experimentales en el desarrollo de habilidades quirúrgicas en el proceso de enseñanza-aprendizaje de la Ciencias de la Salud. *REDVET*; 6(13) 1-23.

- Montaldo, A. (1979). La yuca o mandioca. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (IICA), San José, Costa Rica. 386 p.
- Moreira-Díaz, EE. (1995). Fundamentos metodológicos de los bioensayos de oxidadad/carcinogenicidad. *Rev Cubana Enfermer*; 11(3) 1-2.
- Moreno, RO. (2002). Hepatotoxicidad por fármacos. Madrid, España: *Revista Española de Reumatología Suplementos*; 1(1) 60-71.
- Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Rodwell, V., Weil, P. (2013). *Harper Bioquímica Ilustrada*. (29 Edición) Mc Graw Hill Lange.
- Mutis, BC., Pérez, JT. (2005). Determinación y análisis de valores de nitrógeno ureico en sangre (BUN), glucosa, creatininkinasa (CK) y ácido láctico pre y post ejercicio en una población de atletas equinos de salto en Bogotá, D.C. Madrid, España: *REDVET*; 2(6); 1-28.
- Nelson, L. (2006). Acute cyanide toxicity: mechanisms and manifestations. *J Emerg Nurs. (Suppl)* 32: S8–S11.
- Nzwalo, H., Acantilado, J. (2011). Konzo: From Poverty, Cassava, and Cyanogen Intake to Toxic-Nutritional Neurological Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. Jun 2011; 5(6): e1051.
- Okezie, BO., kosikokowski, FV. (1981). Cassava as a food. *CRC Critical reviews in food science y nutrition*. 17(3): 259-275.
- Okolie, NP., Osagie, AU. (1999). Liver and kidney Lesions and Associated Enzyme Changes Induced in Rabbits by Chronic Cyanide Exposure. *Food and Chemical Toxicology*. 37: 745-750.

- Oliveira, N. (1986). Consideraciones sobre los principales tóxicos de yuca. UEPAR, Brasília, 14p.
- Osoteku, OA., Alabi, MA., Kareem, FA y Olugbemi, SA. (2013). Hepatotoxicity Studies of Linamarin in Low Protein Diet. International Journal of Engineering Science Invention, 2 (12), 8-13.
- Ospina, B., Ceballos, H. (2002). La yuca en el tercer Milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Centro Internacional de Agricultura Tropical; Consorcio Latinoamericano y del Caribe de Apoyo a la Investigación y Desarrollo de la Yuca. 586.
- Osuntokun, BO. (1994). Chronic cyanide intoxication of dietary origin and a degenerative neuropathy in Nigerians. Acta Hort. 375:311-21.
- Perazzi, B., Angerosa, M. (2011). Creatinina en sangre: calidad analítica e influencia en la estimación del índice de filtrado glomerular. Acta bioquim clin Latinoam; 45(2).
- Pérez, MZ. (1987). Caracterización Preliminar de 25 materiales de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz) Colectado en los Departamento de Chiquimula, El Progreso, Izabal, Jutiapa y Zacapa. Licenciado en Ciencias Agrícolas. Universidad de San Carlos Guatemala Facultad de Agronomía. GT. p. 10-11-14.
- Porsolt, RD., Pichon, M., Jaifre, M. (1997). Depression: a new model sensitive to the antidepressant treatment. Nature; 266:730-2.

Prieto, JM., Yuste-Ara, JR. (2010). La clínica y el laboratorio. Interpretación de análisis y pruebas funcionales. Exploración de los síndromes. Cuadro biológico de las enfermedades. 21ª edición. Elsevier España, S.L.

PubChem (2015). Linamarin. Página web: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/linamarin#section=Top>. Consultado el día 17 de enero de 2015.

Ramírez, V. (2010). Toxicidad del cianuro. Investigación bibliográfica de sus efectos en animales y en el hombre. An Fac med; 71(1): 54-61.

Rao, NG., Huff, E. (1990). Refinement of long term toxicity and carcinogenesis studies. Fundam Appl Toxicol; 15:33-43.

Repetto, M. (2009). Toxicología Fundamental. Cuarta edición. Díaz de Santos. Pág. 404.

Risso, MV. (2008). Hepatotóxicidad. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Medicina.

Rivadeneira, E., Saavedra, M., Rodríguez, JF. (2009). El tratamiento con progesterona previene las alteraciones motoras inducidas por la intoxicación con semillas de cicada (*Dioon spinulosum*) en la rata macho. Rev. Toxicol; 26: 117-21.

Rivadeneira, E., Rodríguez, JF. (2014). Cycads and their association with certain neurodegenerative diseases. Neurología; 29(9): 517-522.

- Rivadeneira-Domínguez, E., Rodríguez-Landa, JF., Salas-Montero, DR. (2012). Neuropatía atáxica tropical y konzo asociadas al consumo excesivo de yuca. *Arch Neurocién (Mex)*. 17(1): 45-48; 2012.
- Rodríguez, Y. (2007). Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioethica*; 13 (1) 25-40.
- Rogers, AB., Dintzis, SM. (2012). *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*. California, USA: Academic Press, pp. 193-201.
- Rogóz, Z., Skuza, G., Maj, J., Danysz, Q. (2002). Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Neuropharmacology*. 42: 1024-1030.
- Rosas, C. (2015). Evaluación conductual y bioquímica (química sanguínea y pruebas de funcionamiento hepático) de la administración intraperitoneal de acetona en la rata macho Wistar. Universidad Veracruzana. Para acreditar la experiencia receptoral de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo. Xalapa, Veracruz, México.
- Ruiz, A., Ruiz, AA. (2010). *Fundamentos de interpretación clínica de los exámenes de laboratorio*. Segunda edición. Editorial medica panamericana.
- Saavedra, M., Rivadeneira, E., Rodríguez, JF. (2011). Alteraciones motoras inducidas por la microinyección intrahipocámpica de metilazoximetanol en ratas macho forzadas a nadar. *Arch Neurocién (Mex)*; 4 (16) 186-92.

San José, AC. (1998). Hidrología médica y terapias complementarias. Sevilla, España: Universidad de Sevilla, pp. 157.

Santos, T., Marizete, M., Baungratz, Haskel, S., Delwin de Lima, D. (2012). Behavioral interactions of simvastatin and fluoxetine in tests of anxiety and depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 8: 413-422.

Schaumburg, HH., Spencer, PS., Thomas, PK. (1983). Toxic neuropathy: Pharmaeutical agents. In disorders of peripheral nerves. Philadelphia, USA: FA Davis Company, pp. 119-30.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT (2001). Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación, Diario Oficial de la Federación, 18 de Junio de 2001, pp. 1-58.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA. (2015). Servicio de información alimentaria y pesquera. Producción anual de yuca. Disponible en página web: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> Consultado el día 28 de julio de 2015.

Segarra, E. (2006). Fisiología de los aparatos y sistemas. DF, México: Ediciones Universidad de la Cuenca, pp. 98-108.

Selmar, D., Lienerei, R., Biehl B., Conn, E. E. (1989). Hydroxynitrile lyase in *Hevea brasiliensis* & significance for rapid cyanogenesis. *Physiology of plants*; 75: 97-101.

- Shama, A., Whasma, A. (2011). Evaluation of the toxicity of *Manihot esculenta* on Winstar Rats after Traditional Sudanese Processing. Khartoum, Sudan: J Pharmacol. Toxicol. 6 (4): 418-26.
- Sharp, PE., Villano, J. (2013). The laboratory rat. 2da Edición. Florida, USA: CRC Press, pp. 6-7, 25.
- Soler-Martin C., Riera, J., Seoane A, Cutillas, B., Ambrosio, S., Boadas-Vaello, P., *et al.* (2010). The targets of acetone cyanohydrin neurotoxicity in the rat are not the ones expected in an animal model konzo. *Neurot and Teratol.* 32(2):289–94.
- Soto, B., Marioka, PC., Górnjak, SL. (2002). Effects of long-term low-dose cyanide administration to rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2002 Sep; 53(1):37-41.
- Sousa, AB., Soto, B., Guerra, JL., Kimura, ET y Gorniak, SL., (2002). Does prolonged oral exposure to cyanide promote hepatotoxicity and nephrotoxicity? *Toxicology*, 174 (2):87–95.
- Sreeja, G., Nagahara, N., Minami, L. (2003). New aspects in pathogenesis of konzo: neural cell damage directly caused by linamarin contained in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Brit J Nutr.* 90: 467-472.
- Suárez, L., Maderos, V., (2011). Apuntes sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Tendencias actuales. Cultivos tropicales.* 32(3): 27 – 35.
- Suckow, MA., Veisbroth, SH., Franklin, CL. (2006). The laboratory rat. 2da edición. Madrid, España: Elsevier Academic Press, pp 133.

Sunderman, F.W., y Kincaid, J.F. (2008) Toxicity studies of acetone cyanohydrin and ethylene cyanohydrin. *Arch Ind Hyg Occup Med*; 8 (4): 371-376.

Tagle, MA., Bussalleu, AR. (2012). *Avances en Hapatología*. 2da Edición. Lima, Perú: Universidad Peruana.

Tennant, RW., Mongolin, B., Schelby, M. (1987). Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. *Science*; 236:933-41.

U.S. Department of Health and Human Services, (2012). *Enfermedades de la neurona motora*. USA, Washington, D.C.; Public Health Service y National Institutes of Health, pp. 2.

Vladimir-Zaninovic, MD. (2003). Posible asociación de algunas enfermedades neurológicas con el consumo excesivo de la yuca mal procesada y de otros vegetales neurotóxicos. *Colomb Med*. 34: 82-91.

White, LB., Arias DI., Mc Mahon, JM., Sayre, RT. (1998). Cyanogenesis in cassava. The role of hydroxynitrile lyase in root cyanide production. *Plant Physiol*. 116 (4): 1219–25.

Zeller, H., H.T. Hofmann, A.M. Thiess, and W. Hey. (2009) Toxicity of nitriles (results of animal experiments and 15 years of experience in industrial medicine). *Zentralbl Arbeitsmed*; 19 (8): 225-238.

Zhihong, X., Jiayang, L., Yongbiao, X., Weicai, Y. (2006). *Biotechnology and Sustainable Agriculture 2006 and Beyond*. Springer.

Zúñiga, J., Tur, M., Miloco, S., Pineiro, R. (2001). Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal México. Mc Graw- Hill Interamericana. P. 682.

**More
Books!** 



yes
I want morebooks!

Buy your books fast and straightforward online - at one of the world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.get-morebooks.com

¡Compre sus libros rápido y directo en internet, en una de las librerías en línea con mayor crecimiento en el mundo! Producción que protege el medio ambiente a través de las tecnologías de impresión bajo demanda.

Compre sus libros online en
www.morebooks.es

OmniScriptum Marketing DEU GmbH
Bahnhofstr. 28
D - 66111 Saarbrücken
Telefax: +49 681 93 81 567-9

info@omniscrptum.com
www.omniscrptum.com

OMNIScriptum 

