
Efecto protector de la melatonina y el tiosulfato de sodio sobre la histopatología y la ultraestructura del riñón en ratas con intoxicación aguda por Paraquat.

Elizabeth Ramírez-Zambrano¹, Eulogia Zambrano², Gloria Rojas¹, Miguel Zambrano¹ y Luis Teneud³.

¹Cátedra de Histología, ²Departamento de Farmacología y Toxicología,

³Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. Correo electrónico: anaer@ula.ve

Palabras clave: Paraquat, melatonina, tiosulfato, renal.

Resumen. La intoxicación aguda con paraquat (PQ) produce daños severos en muchos órganos, entre ellos el riñón, donde se desarrolla insuficiencia renal. Se han utilizado varios antídotos en el tratamiento de la intoxicación por PQ sin resultados satisfactorios. En este estudio se determinó el efecto protector de la melatonina (MLT) y el tiosulfato de sodio (TSS) sobre el riñón, en ratas con intoxicación aguda por paraquat. Se utilizaron 40 ratas Wistar, machos, divididas en 4 grupos de 10 ratas cada uno. Al grupo I, control, se le inyectó 1 ml de solución fisiológica, vía intraperitoneal (ip); el grupo II, recibió DL₅₀ de PQ, ip; los grupos III y IV recibieron DL₅₀ de PQ, y simultáneamente la primera dosis de MLT (15 mg/kg) o TSS (1,5 g/kg), respectivamente (ip). Treinta minutos después, los grupos III y IV recibieron otra dosis igual de MLT y TSS. A las 24 horas de tratadas las ratas fueron sacrificadas con pentobarbital, extrayéndose el riñón para su estudio morfológico. Con la microscopía de luz y electrónica, en el grupo II se evidenciaron cambios morfológicos de necrosis tubular aguda en el túbulo proximal; observándose hallazgos similares de menor intensidad en los animales tratados con los antídotos, sugiriendo una protección parcial. En conclusión, el uso individual de la MLT y TSS, en las dosis y plazo empleados, revierte parcialmente el daño que causa el paraquat a la célula. En consecuencia, son necesarias más evaluaciones de estas drogas para su uso clínico en el tratamiento de la intoxicación por paraquat.

Protective effect of melatonin and sodium thiosulphate on histopathology and ultrastructure of the kidney in rats with acute intoxication for Paraquat.

Invest Clín 2007; 48(1): 81 - 89

Key words: Paraquat, melatonin, sodium sulphate, renal.

Abstract. Paraquat (PQ) toxicity produces severe injuries in many major organs systems, including kidney, developing renal failure with fatal evolution in most of the cases. Several antidotes have been used in the treatment of paraquat intoxication without satisfactory results. The antioxidative effect of melatonin (MLT) and sodium thiosulphate (STS) on kidney in rats with acute intoxication by PQ was studied. Forty male Wistar rats were used, divided in 4 groups of 10 rats each. Group I, control, was injected intraperitoneally (ip) with 1 ml of saline solution; group II, received DL_{50} of PQ, ip; groups III and IV, DL_{50} of PQ, and simultaneously the first dose of MLT (15 mg/kg, ip) or STS (1,5 g/kg, ip) respectively. Thirty minutes later, groups III and IV received a second similar dose of MLT and TSS. After 24 hours, rats were sacrificed with pentobarbital, and kidneys were extracted for morphological study. Light and electronic microscopy observations showed in group II morphological changes of acute tubular necrosis in proximal tubule in group II, similar findings, with lesser magnitude, were observed in the animals treated with the antidotes, suggesting a partial protection. In conclusion, individual use of MLT and STS at the doses and time used partially prevent damage caused by paraquat to the cell. In consequence, more experiments with these drugs are necessary to consider them as specific treatments in cases of poisoning by paraquat.

Recibido: 26-01-2006. Aceptado: 08-06-2006.

INTRODUCCIÓN

El paraquat (PQ) es un herbicida ampliamente utilizado como desecativo de las plantas, para preservar las cosechas. Se expide en forma líquida, es de color rojo parduzco, parecido al ron o a la "coca-cola", insípido, de aquí que ocurran envenenamientos accidentales; aunque también se ha usado con fines suicidas (1). Su acción bioquímica está dada por su forma reducida, ésta interfiere la reacción de transferencia de electrones inhibiendo la reducción del NADP a NADPH y de la xantino-oxidasa, iniciando las reacciones que llevan a mayor producción

de especies oxígeno reactivas (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos) con la subsecuente peroxidación de lípidos (1-4). Este proceso de peroxidación produce alteraciones notables de la estructura y función de las membranas, especialmente de las mitocondrias y del retículo endoplásmico. En las mitocondrias, el PQ afecta el transporte de electrones en la membrana interna lo que conlleva a una disminución de la capacidad fosforilativa/oxidativa, pérdida de enzimas y nucleótidos (5, 6).

Los efectos del PQ en el humano usualmente son muy similares a los ocasionados en ratas y en otros animales experi-

mentales. La intoxicación por PQ produce principalmente daño en el pulmón, caracterizado por insuficiencia respiratoria, constituyéndose en la primera causa de muerte de estos pacientes. Así, la investigación en el tratamiento de la intoxicación por PQ se ha enfocado en las lesiones pulmonares (2). Sin embargo, existen complicaciones en otros órganos. Por ejemplo, en el riñón es muy frecuente la insuficiencia renal por necrosis tubular aguda nefrotóxica; debido a que el PQ es concentrado por la célula tubular proximal, ejerciendo su efecto tóxico en ese sitio (7-12).

Hasta el momento no se ha conseguido un antídoto efectivo en el tratamiento de intoxicación con PQ. Se han utilizado diversas sustancias, entre otras la catalasa, superóxido dismutasa, deferoxomina, vitamina E, vitamina C, N-Acetilcisteína, glutatión; además de procedimientos como la hemodiálisis precoz (3, 13-19). También se han empleado la Melatonina (MLT) y el Tiosulfato de Sodio (TSS), para determinar el efecto de estos dos antioxidantes sobre los daños inducidos por PQ en pulmón e hígado; encontrándose protección contra la toxicidad oxidativa inducida por el PQ (20-25). Sin embargo, los estudios toxicológicos y farmacológicos no son suficientes para considerar aún su uso clínico.

El objetivo de éste trabajo fue determinar, histológicamente, si el uso individual de la MLT y el TSS protege contra el daño que ocasiona el PQ a las células renales del túbulo proximal en ratas; y comparar si hay diferencias del efecto protector de ambos medicamentos, que pudieran brindar utilidad en la intoxicación por PQ en humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 40 ratas Wistar machos con peso entre 250 y 270 g, divididos en 4 grupos de 10 ratas cada uno. Las drogas

empleadas, Paraquat (Gramoxone®, Imperial Chemical Industries), Melatonina (Biosigma) y Tiosulfato de Sodio (Biosigma) se administraron por vía intraperitoneal (IP). El grupo I (control) recibió 1 ml/Kg de solución fisiológica. El grupo II, sólo recibió PQ a una dosis de 27,5 mg/Kg (DL₅₀). Al grupo III, se le administró la DL₅₀ de PQ y, simultáneamente, la primera dosis de MLT (15 mg/Kg). El grupo IV, recibió la DL₅₀ de PQ y, simultáneamente, la primera dosis de TSS (1,5 g/Kg). Treinta minutos más tarde, los grupos III y IV recibieron una segunda dosis, de MLT Y TSS, respectivamente. A las 24 horas de tratados los animales, fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/Kg, IP). Mediante laparotomía mediana se extrajeron los riñones. Las muestras, para ser estudiadas mediante microscopía de luz, se fijaron en Bouin por 72 horas, siendo procesadas por método convencional para ser incluida en parafina, realizándose cortes de 3 micras de espesor que fueron coloreadas con hematoxilina y eosina de Mayer al 0,1% (26), observándose en un microscopio de luz Medilux-12. Los fragmentos para microscopía electrónica se fijaron en una mezcla de glutaraldehído al 3% y formaldehído al 3%, luego postfijados en tetróxido de osmio al 1% y procesados para microscopía electrónica según el método descrito (27). El material se examinó en un microscopio electrónico Hitachi H-500.

Los criterios morfológicos de necrosis tubular aguda nefrotóxica fueron los referidos por Meadows y Robbins (28, 29). Al analizar los cortes al microscopio de luz a 400x, los túbulos fueron clasificados como: sin daño, daño leve, daño moderado o daño severo. Se calculó el porcentaje de túbulos afectados por campo, y se promediaron los resultados de 6 campos. Se aplicó un ANOVA de una vía, seguido de un test de Tukey para el análisis de los datos.

RESULTADOS

En la Tabla I se muestran los resultados obtenidos con el empleo de la microscopía de luz. En el grupo I (control) se observaron los túbulos proximales conservados (Fig. 1). En el grupo II (PQ) se encontraron grados variables de lesión tubular, con predominio de daño severo [F(3,23) = 12,76; $p < 0,0001$], caracterizados por pérdida del borde en cepillo, desorganización celular, pérdida del borde apical y células epiteliales con citoplasma vacuolado y núcleos condensados (Fig. 2). Algunos

túbulos mostraron dilatación y detritus celular en la luz. En los grupos III (PQ + MLT) y IV (PQ + TSS), se apreciaron cambios morfológicos similares a los descritos en el grupo II pero, a diferencia de éste último, la mayoría de los túbulos presentaba daño moderado, [para el grupo II, F(3,23) = 18,32; $p < 0,0001$; para el grupo III, F(3,23) = 0,94; no significativo] (Fig. 3). Al comparar la presencia de daño tubular severo en los 3 grupos, ambos antídotos mejoraron significativamente las alteraciones provocadas por el PQ [F(2,17) = 17,45; $p < 0,0001$].

TABLA I
DAÑO TUBULAR RENAL. PORCENTAJES DE TÚBULOS LESIONADOS EN DIFERENTES GRADOS DE ACUERDO AL TRATAMIENTO RECIBIDO (EXPRESADO EN PROMEDIO \pm ERROR ESTÁNDAR)

| | Sin daño | Leve | Moderado | Severo | Total |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|
| Control | 100 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| PQ | 3,98 \pm 1,61 | 20,21 \pm 6,41 | 24,67 \pm 6,38 | 51,14 \pm 7,72* | 100 |
| PQ + MLT | 20,09 \pm 6,25 | 14,98 \pm 2,94 | 53,91 \pm 5,87* | 11,02 \pm 4,34 | 100 |
| PQ + TSS | 23,46 \pm 13,08 | 28,37 \pm 12,00 | 37,47 \pm 16,91 | 10,70 \pm 5,76 | 100 |

* $p < 0,0001$.

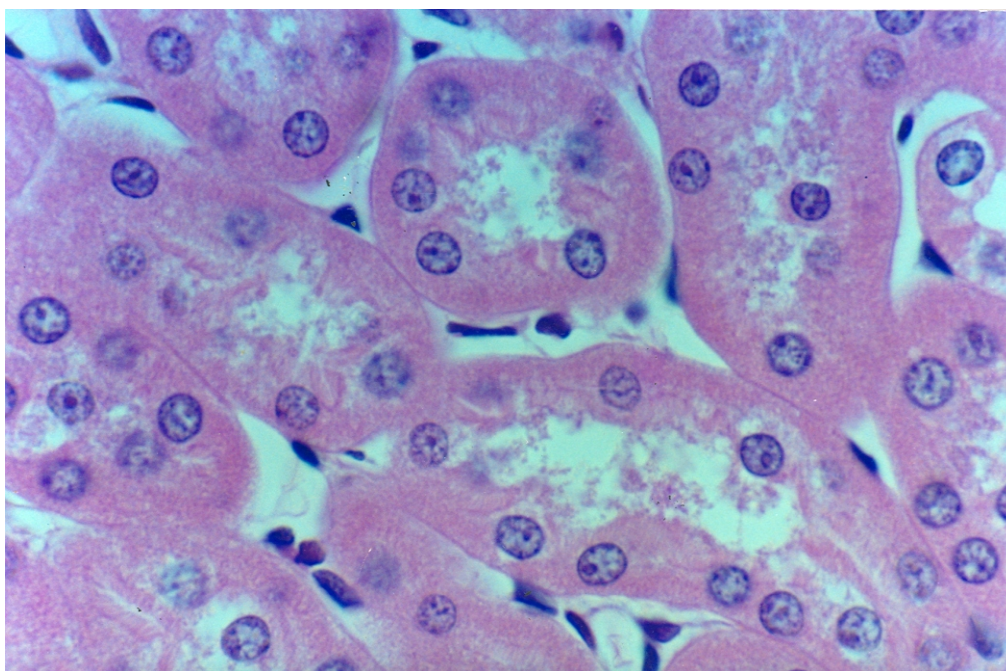


Fig. 1. Grupo I (control). Se observan túbulos proximales normales. H.E. 1000 X.

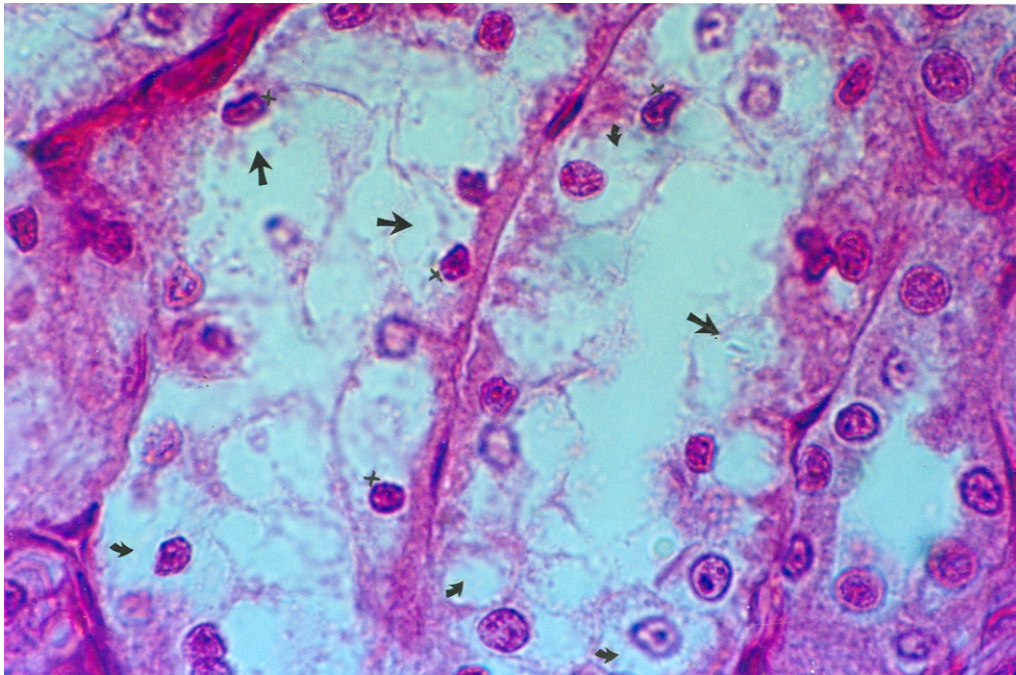


Fig. 2. Grupo II (PQ). Se observan túbulos proximales cuyas células presentan citoplasma vacuolado (⇨), con pérdida del borde en cepillo (⇨), núcleo con cromatina condensada (x), desorganización de la arquitectura celular y lisis. H.E. 1000 X.

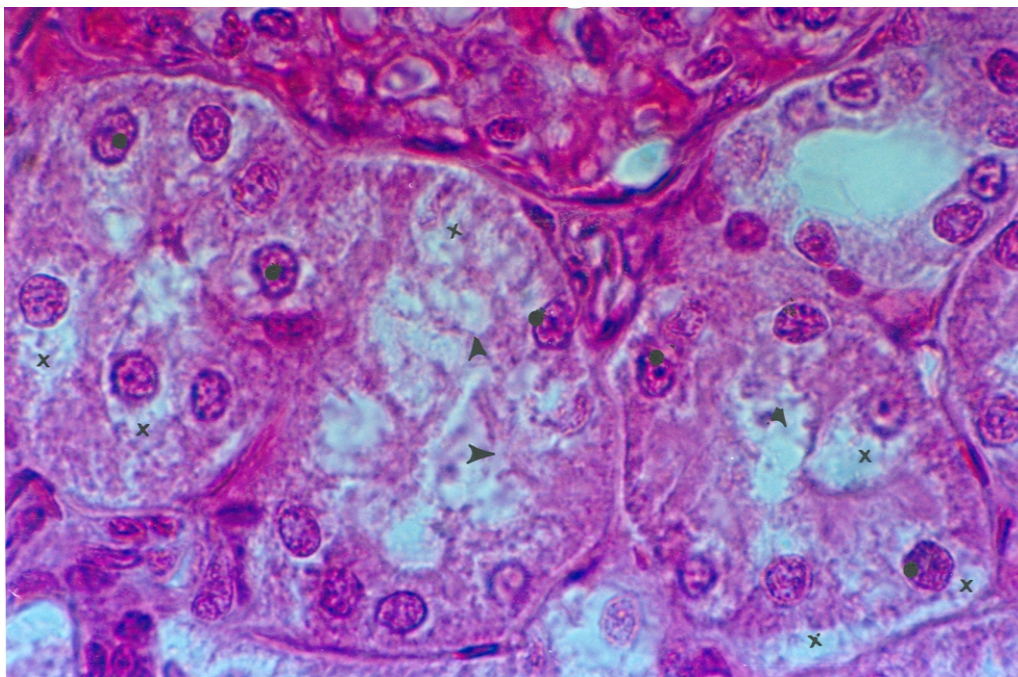


Fig. 3. Grupo III (PQ + MLT). Imagen de túbulos proximales. Nótese las células con citoplasma vacuolado (x), pérdida del borde apical (▶), y núcleos con cambios en su cromatina (•). H.E. 1000 X.

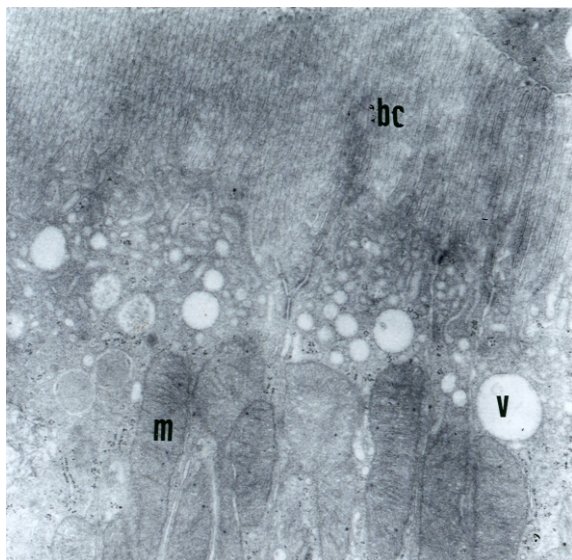


Fig. 4. Grupo I (control). Microfotografía electrónica de un segmento de una célula del túbulo proximal. Además de la integridad del borde en cepillo (bc), se puede apreciar la actividad vesicular (V) y el aspecto normal de las mitocondrias (m). 20.000 X.

Microscopía electrónica: en el grupo I, se observaron los túbulos proximales con características normales en la organización de las microvellosidades y el contenido de sus organelas (Fig. 4). Las células epiteliales proximales de los animales del grupo II, mostraron daños severos, como ruptura del polo apical, alteración de la arquitectura de las microvellosidades, mitocondrias edematizadas con pérdida de las crestas, grandes lisosomas, dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso con degranulación, y lisis del citoplasma (Fig. 5). En los grupos III y IV se encontraron células epiteliales proximales con los mismos daños antes descritos y en otras células sólo edema en citoplasma y mitocondrias (Fig. 6). Todos los grupos mostraron integridad en la membrana basal tubular.

DISCUSIÓN

Los cambios descritos son similares a los observados por otros autores sobre el

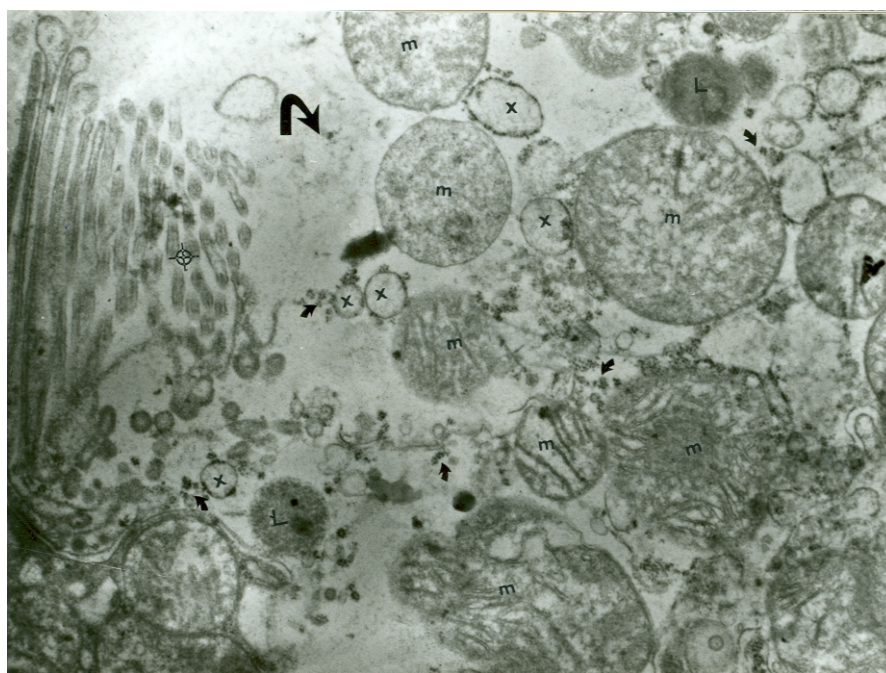


Fig. 5. Grupo II (PQ). Microfotografía electrónica de un túbulo proximal. El campo muestra ruptura del polo apical (➡), daño de la arquitectura de las microvellosidades (⊕). Mitocondrias edematizadas con lesión de las crestas y ruptura de membrana (m). Dilatación de las cisternas del retículo endoplásmico (x). Separación de los ribosomas del RER (➡). Lisosomas (L). 18.000 X.

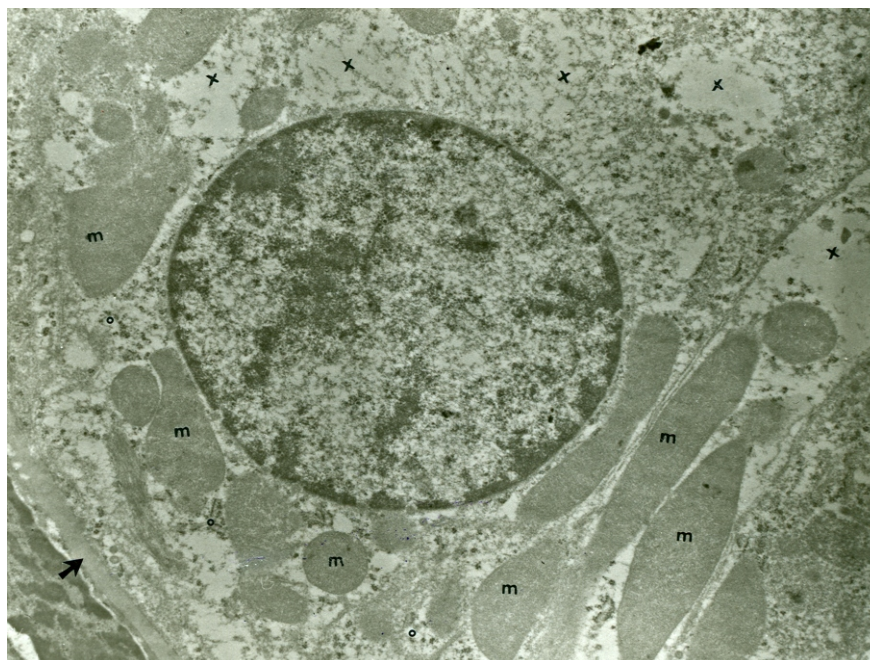


Fig. 6. Grupo IV (PQ+TSS). Microfotografía electrónica de un segmento celular de un túbulo proximal. El citoplasma presenta edema (x). Las mitocondrias edematizadas y amorfas (m) y retículo endoplásmico con cisternas ligeramente dilatadas (O). Membrana basal tubular conservada (→). 16.000 X.

daño epitelial renal causado por paraquat (7, 9-12, 30, 31) y han sido descritos en la necrosis tubular aguda nefrotóxica (28, 29). Al comparar el daño estructural del tejido renal en las ratas intoxicadas con PQ y los grupos tratados con MLT y TSS, se observó que los daños en las células del túbulo proximal fueron similares, aunque en los animales tratados con los antidotos el porcentaje de túbulos afectados con daño severo era significativamente menor.

In vivo e *in vitro*, la MLT Y TSS han mostrado un importante efecto antioxidante contra la toxicidad del paraquat (20-25). En el presente experimento, estas drogas no interfirieron o compitieron con el PQ para evitar el efecto de éste sobre el sistema de oxidorreducción y así evitar el daño celular tubular renal. Sin embargo, el hecho de encontrar cambios leves en las células de los túbulos proximales a la ultraestructura, en los grupos tratados con los antidotos, sugiere una protección parcial.

En otros trabajos, se han obtenido resultados favorables sobre el tejido pulmonar y hepático luego de la administración de MLT o TSS durante 3 a 7 días consecutivos (20, 24), lo que podría explicar la poca efectividad de estos antidotos en el presente estudio. Además, se ha demostrado con el uso combinado del MLT y TSS que la extensión del daño en el parénquima pulmonar es menor, considerándose un efecto sinérgico de ambos medicamentos como restauradores de los depósitos de glutatión (datos no publicados).

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo citotóxico del PQ es fundamentalmente la producción de radicales superóxido, conduciendo a la peroxidación lipídica en las membranas. Se ha determinado en el hígado de rata que la quinona-NADH oxidoreductasa de la membrana externa mitocondrial productora de especies oxígeno reactivas, es un nuevo sistema de oxidorreducción participante en la toxicidad del PQ

(32), lo que explica el daño selectivo del PQ a la mitocondria *in vivo* e *in vitro*. En el riñón, estos efectos del PQ se han estudiado en el túbulo proximal, donde se desacopla la fosforilación oxidativa que induce la peroxidación lipídica, inhibición de la cadena redox y la actividad ATP sintetasa; además en este segmento tubular se ha demostrado un mecanismo de transporte activo para el PQ que no se ha encontrado en el túbulo distal (9-12). Esto explica el daño celular por la mayor concentración de PQ en el túbulo proximal. También se ha comprobado una elevación de las enzimas antioxidantes en las células glomerulares, que protegen las funciones renales contra el daño inducido por los radicales superóxido, sugiriendo que estas enzimas juegan un papel importante en los desórdenes funcionales inducidos por los radicales. Esta modulación constituye uno de los mecanismos de resistencia al daño renal agudo (33).

En conclusión, en el presente trabajo el uso individual de la MLT y TSS, en las dosis empleadas, a corto plazo no evitaron el daño estructural que causa el PQ a las células del túbulo proximal del riñón de ratas, por lo que aún no pueden ser considerados como tratamiento específico en los pacientes intoxicados con PQ. Por esto, son necesarios nuevos ensayos utilizando estos dos antidotos, de forma individual o combinada, por tiempo más prolongado, para determinar si hay un verdadero efecto protector sobre el tejido renal y así poder ser recomendados en la terapia clínica.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Investigación en Ultraestructura, Facultad de Medicina, de la Universidad Centro-Occidental Lisandro Alvarado. Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes (CDCHT-ULA) por la

ayuda financiera para la realización de este trabajo, mediante el proyecto M-586-96-03-C.

REFERENCIAS

1. **Autor AP.** Biochemical Mechanisms of Paraquat Toxicity. Academic Press, New York. (Ed.), 1977.
2. **Suntres ZE.** Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* 2002; 180: 65-77.
3. **Bus JS, Aust SD, Gibson JE.** Lipid peroxidation: a possible mechanism for paraquat toxicity. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1975; 11:31-38.
4. **Sakai M, Yamagami K, Kitazawa Y, Takeyama N, Tanaka T.** Xantine oxidase mediates paraquat-induced toxicity on cultured endothelial cell. *Pharmacol Toxicol* 1995; 77:36-40.
5. **Palmeira CM, Moreno AJ, Madeira VM.** Mitochondrial bioenergetics is affected by the herbicide paraquat. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1229:187-192.
6. **Costantini P, Petronilli V, Colonna R, Bernardi P.** On the effects of paraquat on isolated mitochondria. Evidence that paraquat causes opening of the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore synergistically with nitric oxide. *Toxicology* 1995; 99:77-88.
7. **Oreopoulos DG, Soyannwo MA, Sinniah R, Fenton SS, Bruce JH.** Acute renal failure in case of Paraquat poisoning. *Br Med J* 1968; 1:749-750.
8. **Clark DG, McElligott TF, Hurst EW.** The toxicity of paraquat. *Br J Ind Med* 1996; 23:126-132.
9. **Chan BS, Seale JP, Duggin GG.** The mechanism of excretion of paraquat in rat. *Toxicol Lett* 1997; 90:1-9.
10. **Chan BS, Lazzaro VA, Seale JP, Duggin GG.** Transport of paraquat in a renal epithelial cell line LLC-PK1. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279: 625-632.
11. **Chan BS, Lazzaro VA, Seale JP, Duggin GG.** Characterization and uptake of paraquat by rat renal proximal tubular

- cells in primary culture. *Hum Exp Toxicol* 1996; 15:949-956.
12. Chan BS, Lazzaro VA, Seale JP, Duggin GG. Transport of paraquat by a renal epithelial cell line, MDCK. *Ren Fail* 1997; 19: 745-751.
 13. Hong SY, Yang JO, Lee EY, Lee ZW. Effects of N-acetyl-L-cysteine and glutathione on antioxidant status of human serum and 3T3 fibroblasts. *J Korean Med Sci* 2003; 18:649-654.
 14. Patel M, Day BJ. Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *TIPS* 1999; 20:359-364.
 15. van Asbeck BS, Hillen FC, Boonen HC, de Jong Y, Dormans JA, van der Wal NA, Marx JJ, Sangster B. Continuous intravenous infusion of deferoxamine reduces mortality by paraquat in vitamin E-deficient rats. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 769-773.
 16. Kang SA, Jang YJ, Park H. *In vivo* dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Rad Res* 1998; 28: 93-107.
 17. Hoffer E, Avidor I, Benjaminov O, Shenker L, Tabak A, Tamir A, Merzbach D, Taitelman U. N-acetylcysteine delays the infiltration of inflammatory cells into the lungs of paraquat-intoxicated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 120:8-12.
 18. Brown LA, Bai C, Jones DP. Glutathione protection in alveolar type II cells from fetal and neonatal rabbits. *Am J Physiol* 1992; 262: L305-L312.
 19. Lheureux P, Leduc D, Vanbinst R, Askenasi R. Survival in a case of massive paraquat ingestion. *Chest* 1995; 107:285-289.
 20. Yamamoto H. Protection against paraquat-induced toxicity with sulfite or thiosulfate in mice. *Toxicology* 1993; 79: 37-43.
 21. Gunnison AF. Sulfite toxicity: a critical review of in vitro and in vivo data. *Food Cosmet Toxicol.* 1981; 19: 667-682.
 22. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res.* 1995; 18:1-11.
 23. Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR. Melatonin - a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed *in vitro*. *Ann NY Acad Sci* 1994; 738:419-420.
 24. Melchiorri D, Reiter RJ, Attia AM, Hara M, Burgos A, Nistico G. Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci* 1995; 56: 83-89.
 25. Melchiorri D, Reiter RJ, Sewerynek E, Hara M, Chen L, Nistico G. Paraquat toxicity and oxidative damage. Reduction by melatonin. *Biochem Pharmacol* 1996; 51:1095-1099.
 26. Di Fiore MSH. *Diagnostico Histológico*. Tomo 1. Librería "El Ateneo" Editorial Buenos Aires 1959; pp: 98-150.
 27. Palacios-Prü E, Mendoza RV. An unusual relationship between glial cell and neural dendrites in olfactory bulbs of *Desmodus rotundus*. *Brain Res* 1972; 36: 404-408.
 28. Meadows R: *Renal Histopathology*. A light, electron and immunofluorescent microscopy study of renal disease. Second edition. New York: Oxford University Press, 1978. p. 164.
 29. Robbins S, Cotran R, Kumar V. *Patología Estructural y funcional*. Cuarta edición. España Interamericana McGraw-Hill, 1990; vol 1.
 30. Fowler B, Brooks RE. Effects of the herbicide paraquat on the ultrastructure of mouse kidney. *Am J Pathol* 1971; 63: 505-520.
 31. Lock EA, Ishmael J. The acute toxic effects of paraquat and diquat on the rat kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979; 50:67-76.
 32. Shimada H, Hirai K, Simamura E, Pan J. Mitochondrial NADH-quinone oxidoreductase of the outer membrane is responsible for paraquat cytotoxicity in rat livers. *Arch Biochem Biophys* 1998; 351:75-81.
 33. Yoshioka T, Bills T, Moore-Jarrett T, Greene HL, Burr IM, Ichikawa I. Role of intrinsic antioxidant enzymes in renal oxidant injury. *Kidney Int* 1990; 38:282-288.