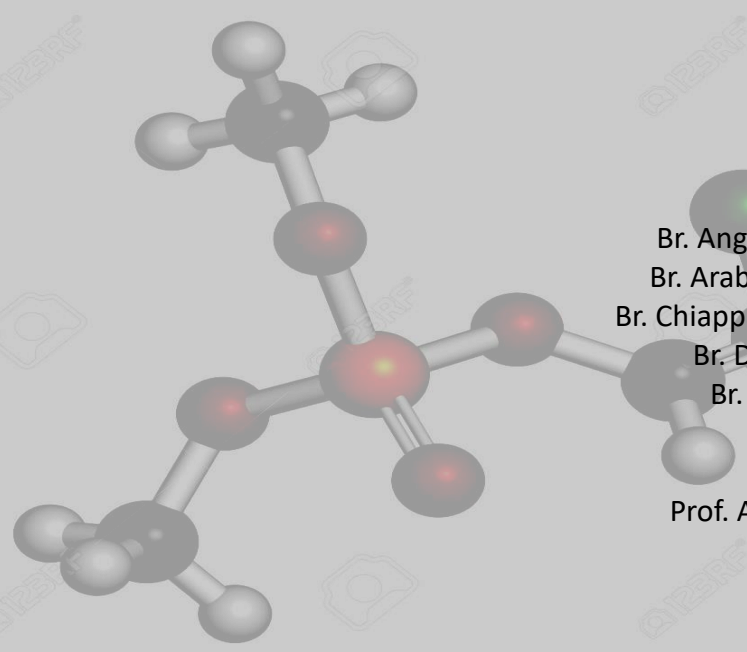


IMPACTO DE AGROQUÍMICOS INHIBIDORES DE LA ACETILCOLINESTERASA (ORGANOFOSFORADOS Y CARBAMATOS) SOBRE ÓRGANO Y CÉLULAS ASILADAS DE CORAZÓN.



GRUPO 52 - Integrantes:

- Br. Angelo, Nicolás
- Br. Arabeity, Alvaro
- Br. Chiappara, Nicolás
- Br. Dutra, Javier
- Br. Galli, Pablo

Docente Orientador:
Prof. Agdo. Dr. Gonzalo Ferreira



<u>INDICE DE CONTENIDOS:</u>	<u>PAGINA</u>
RESUMEN.....	3
I-INTRODUCCION.....	4
-I.A- Generalidades.....	4
-I.B- Marco Teórico de función y patología cardíaca relevante.....	4
-I.B.1 - Funcionamiento Cardíaco Normal.....	4
I.B.2 – Clasificación y bases patogénicas de los trastornos del ritmo cardíaco (arritmias).....	5
I.B.3 – Injuria por Isquemia/Reperusión a nivel cardíaco.....	7
-I.C-Agroquimicos Organofosforados.....	9
-I.D- AzinfosMetil y Carbofurano.....	11
II-OBJETIVO E HIPOTESIS.....	11
III-MATERIALES Y METODOS.....	12
-III.A-Normas éticas y uso de animales.....	12
-III.B-Materiales y Metodos.....	12
IV-RESULTADOS.....	13
-IV.1. Carbofurano – Relacionados con Objetivo Específico 1.....	13
-IV.2. AzinfosMetil – Relacionados con Objetivo Específico 2.....	15
-IV.3. Comparación Carbofurano y AzinfosMetil – Relacionados con Objetivo Específico 3.....	17
V-DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	20
VI-AGRADECIMIENTOS.....	22
VII-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	22

Resumen

Organofosforados y carbamatos son sustancias cuyo mecanismo de acción común es inhibir a la enzima acetilcolinesterasa. Son pesticidas ampliamente utilizados en Uruguay y en el mundo. Son importantes determinantes de morbilidad y mortalidad en zonas rurales a nivel humano, alterando también ecosistemas [1]. Sus efectos tóxicos en animales y seres humanos son multisistémicos [2] [3]. El objetivo de este trabajo es estudiar la toxicidad de los agroquímicos organofosforados y carbamatos en la función de corazón y cardiomiocitos aislados. Se procedió de dos maneras complementarias, i) revisando material publicado del tema, y ii) realizando experimentos con cobayos o ratas. La función cardíaca se evaluó por tensión y actividad eléctrica en corazón y células cardíacas aisladas, en situación control y ante exposición aguda a estos agroquímicos. Finalmente, se realizó un análisis estadístico estableciendo que alteraciones significativas pueden producir a nivel cardíaco. La exposición aguda al carbamato carbofurano produjo un efecto inotrópico negativo, con una dosis media próxima a 20 μ M. Adicionalmente produjo trastornos de la frecuencia y ritmo cardíacos en dosis similares. En contraste, la exposición al organofosforado AzinfosMetil, no metabolizado, a esas dosis no produjo mayores efectos, aunque sí se pudieron evidenciar los mismos, de naturaleza similar a los descritos para carbofurano, a dosis mayores. En conclusión, nuestros resultados sugieren que ambos grupos de insecticidas caracterizados por inhibir la actividad anticolinesterasa, son capaces de ejercer efectos agudos directos en la función cardíaca en corazones aislados y denervados, de manera independiente de dicha inhibición enzimática.

Palabras clave: Organofosforados, Carbamatos, Toxicidad, Corazón, Calcio intracelular.

I. INTRODUCCION – ***I.A - Generalidades*** -Los agroquímicos son productos muy utilizados en las zonas rurales de casi todo el territorio nacional. Por lo tanto, muchas personas que habitan en estas zonas podrían estar expuestas a los mismos. Se sabe que los agroquímicos son tóxicos. Por ejemplo, se han descrito síndromes neurológicos por intoxicación con agroquímicos organofosforados [4]. Sin embargo, no existen al presente estudios exhaustivos a nivel cardíaco. En el corazón hay receptores metabotrópicos muscarínicos que responden a acetilcolina [5]. También se han descrito otras alteraciones, como ser hiperglicemia, stress oxidativo, aumento de calcio intracelular [6]. En esta monografía, nos preguntamos, cuales son los efectos de distintos agroquímicos cuya acción común es inhibir a la acetilcolinesterasa. Estos estudios pueden ser relevantes dado que pueden sugerir que los efectos agudos de agroquímicos pueden deberse a efectos independientes de su acción anticolinesterásica (o no). Para comprender la repercusión cardiovascular a exposición aguda de dichos compuestos, nuestro trabajo primero comprendió una **revisión bibliográfica** del **marco teórico** de funcionamiento y patología cardíacas que pueden ser afectados por estos agroquímicos, así como también una revisión bibliográfica de la **toxicidad y datos epidemiológicos de daños por los agroquímicos que estudiaremos** en el mundo y en nuestro país. La exposición que continúa es por tanto, parte de la sección de introducción, pero también de resultados.

I.B- Marco Teórico de función y patología cardíaca relevante – I.B.1 - Funcionamiento Cardíaco Normal

El funcionamiento cardíaco normal está determinado por una serie de mecanismos eléctricos acoplados a eventos mecánicos de contracción, que a nivel celular se explican por el potencial de acción cardíaco, el acoplamiento excito-contráctil y la interacción de las proteínas contráctiles [7]. Durante el potencial de acción cardíaco (PAC), las variaciones en la polaridad de membrana se deben a cambios secuenciales en la permeabilidad de ésta a determinadas corrientes iónicas, producto de la apertura y cierre de canales iónicos específicos y selectivos para determinados iones.

La actividad eléctrica del corazón se inicia en el nodo sinusal, a través de éste se propaga hacia las aurículas derecha e izquierda despolarizándolas. Esta despolarización llega hasta el nódulo AV donde la velocidad de propagación se hace lenta hasta sobrepasarlo, luego el impulso en el haz de His toma una velocidad de conducción máxima para finalmente avanzar rápidamente por las fibras de Purkinje y el tejido ventricular [8].

El PAC presenta diferencias según la región del corazón en que se encuentre. De esta forma podemos distinguir dos grandes grupos de PAC: el PAC de las células nodales y el PAC de las células contráctiles. En el acoplamiento excito-contráctil el ion Calcio (Ca^{2+}) juega un rol

central. El Ca^{2+} que entra por los canales de Ca^{2+} de tipo L interactúa con los canales liberadores de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (RS) denominados RyR2. Así se produce la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . El Ca^{2+} liberado por los RyR2 participa en la inactivación de los canales de Ca^{2+} tipo L, con lo cual se genera una realimentación negativa mediada por Ca^{2+} . Altas concentraciones de Ca^{2+} dentro del RS, aumentan la sensibilidad de los RyR2 al Ca^{2+} . El Ca^{2+} liberado por el RS es el que interactúa con las proteínas contráctiles cardíacas. El Ca^{2+} liberado por el RS, luego de liberado durante una contracción, debe volver a llenar el RS. El Ca^{2+} ingresa al RS por una, Ca-ATPasa (proteína SERCA). La proteína SERCA presenta una inhibición mediada por fosfolamban, que durante la relajación es fosforilada perdiendo su efecto inhibitor y así permitir el rápido llenado del RS con Ca^{2+} . Todos estos eventos se desarrollan en detalle en [7].

La contracción de las células cardíacas está determinada por la interacción entre 6 proteínas. Estas son: miosina, actina, tropomiosina, y el complejo de las troponinas (I,T,C) [9].

I.B.2 – Clasificación y bases patogénicas de los trastornos del ritmo cardíaco (arritmias).

I.B.2.1 – Arritmias en general - Los trastornos del ritmo del corazón se denominan arritmias. Estas se dividen en dos grandes grupos: taquiarritmias y bradiarritmias. Las taquiarritmias cursan con un aumento de la frecuencia cardíaca, y las bradiarritmias lo hacen con una disminución de la misma. Dentro de éstas algunas pueden ser benignas y otras pueden ser de extrema gravedad, como la fibrilación ventricular, taquicardia ventricular y el bloqueo auriculoventricular completo. La Fibrilación ventricular es una arritmia severa que tiene un alto riesgo de muerte. Se caracteriza por un ritmo ventricular rápido mayor a 250 latidos por minuto, irregular, con frecuente morfología caótica, que genera una pérdida total de la contracción cardíaca. El corazón tiene un aspecto macroscópico que se describe como “bolsa de gusanos” [10].

Respecto a las bases patogénicas de las arritmias se clasifican en cuatro grandes categorías [11, 12].

- A) Automatismo anormal: Además del nodo sinusal, la actividad marcapaso automático se observa en fibras auriculares especializadas de la unión auriculoventricular y fibras de Purkinje. El automatismo anormal se desarrolla en circunstancias como la isquemia o la alteración del equilibrio electrolítico, en fibras cardíacas desprovistas de automatismo y pueden convertirse en marcapasos dominante, sobrepasando la frecuencia del automatismo sinusal normal.
- B) Actividades eléctricas desencadenadas: Son aquellas que no surgen espontáneamente, se originan siempre precedidas de un potencial de acción. Son llamadas pospotenciales y se

generan durante la fase de repolarización, estos pueden ser precoces (fase 2, 3) o tardíos (tras finalizar fase 3). Se ha observado en los tejidos auricular, ventricular y en el sistema His-Purkinje en situaciones que cursan con el aumento de catecolaminas, hipercalcemia y toxicidad digital (pospotenciales tardíos) o durante la bradicardia, hipopotasemia u otras circunstancias que prolongan el potencial de acción (Pospotenciales tempranos).

C) Bloqueos de la conducción: La presentación de alteraciones electrolíticas, isquemia o trastornos degenerativos en las células pueden producir anomalías del potencial de acción celular, provocando que este sea incapaz de propagar el impulso eléctrico. Los bloqueos pueden ser fijos, transitorios o funcionales. Se distinguen bloqueos completos o incompletos de ramas o hemirramas del haz de His y de los nodos [13].

D) Arritmias por reentrada: Es el mecanismo más frecuente de arritmia cardíaca. Las reactivaciones de una zona de miocardio, por un mismo impulso eléctrico, están dadas por las reentradas en una vía alternativa. Para que se produzca una reentrada son necesarias: 1- un circuito eléctrico potencial formado por dos brazos. 2- un bloqueo unidireccional en uno de los brazos, una conducción suficientemente lenta en el otro para que la zona proximal al bloqueo recupere la excitabilidad y pueda reactivarse de forma retrógrada. Un ejemplo clásico de arritmia por reentrada es el síndrome de Wolff Parkinson White.

I.B.2.2.- Alternancias - La alternancia cardíaca es la oscilación latido a latido de la actividad eléctrica y/o de la fuerza de contracción, manteniendo un ritmo regular. Es una respuesta muy frecuente a estímulos nocivos percibidos por el corazón que generalmente preceden a la fibrilación ventricular [14]. Los factores favorecedores de las alternancias que disminuyen su umbral de activación son: la hipotermia, inhibición de la glucólisis, hipocalcemia, la perturbación de la función mitocondrial, la acidosis hipercapnica, la hipertrofia e isquemia miocárdica, y la insuficiencia cardíaca [15]. En tanto los factores protectores, que aumentan el umbral de activación son: la hipercalcemia, la sensibilización farmacológica de los canales de Calcio y la estimulación b-adrenérgica [16]. Aunque se considera una afección multicausal, inducida generalmente por ritmos cardíacos rápidos, influenciados por una gama amplia de factores, la base de esta patología radica en las alteraciones que generan inestabilidad en el acoplamiento de voltaje de membrana y la concentración de calcio intracelular. Aun se plantea la cuestión de si las alternancias son impulsadas por la membrana celular o por el calcio intracelular. Las alternancias de voltaje impulsadas por la membrana celular fueron determinadas por un solo parámetro, la restitución de la duración del potencial de acción (APD), proceso que depende del tiempo debido a la recuperación de la inactivación de las corrientes de iones

en el que se basa el potencial de acción. Por otra parte, las alternancias promovidas por el Ca^{2+} intracelular requieren de dos parámetros claves para su generación: la liberación fraccionada de la carga de Ca^{2+} del RS y la eficiencia latido a latido de la recaptación de Ca^{2+} citosólico. A pesar de la complejidad de la señalización de Ca^{2+} cardíaca, en estos últimos años se han visto progresos importantes para el entendimiento del fenómeno de las alteraciones cardíacas. La evidencia teórica y experimental indica que en base a la señalización de Ca^{2+} y el funcionamiento de sus proteínas, se van a desarrollar nuevos fármacos y tratamientos genéticos como estrategias terapéuticas con el fin de suprimir arritmias cardíacas. Una revisión profunda del tema tratado en este párrafo, se desarrolla en [17].

I.B.3 – Injuria por Isquemia/Reperusión a nivel cardíaco.

I.B.3.1 – Definiciones - Entendemos por isquemia a una lesión celular producida por la disminución o cese de la llegada de sangre a los tejidos [18]. Los fenómenos isquémicos o de hipoperfusión ocasionan una disminución de oxígeno hasta alcanzar un nivel crítico donde el consumo se hace dependiente de dicho aporte, creándose a nivel celular un estado que se conoce como deuda de oxígeno [18, 19]. Dependiendo del tiempo, el fenómeno de isquemia va causando daño celular progresivo hasta llegar a la muerte, pero si se establece la reperfusión tisular antes del daño irreversible la célula puede reaccionar recuperándose completamente, o por el contrario incrementado la lesión que tenía previo a la reperusión lo que conocemos como Injuria por reperusión [20]. La injuria por reperusión puede ser minimizada de varias maneras, sometiendo al corazón a breves períodos de isquemia reversibles previo al período de isquemia definitivo, estableciendo lo que se conoce como preconditionamiento isquémico [20, 21], durante la isquemia llamado acondicionamiento isquémico y posterior a la misma o post acondicionamiento isquémico [21-23].

I.B.3.2 – Fisiopatología de la injuria por reperusión de la isquemia - La fisiopatología de la injuria por reperusión involucra 4 mecanismos que son: 1) Disminución de fosfatos de alta energía (ej adenosin-trifosfato, ATP); 2) Aumento en la producción de radicales libres; 3) Inadecuada reperusión tisular; 4) Sobrecarga de Ca^{2+} [19, 24]. Respecto a estos mecanismos, someramente se explican por: 1- Disminución de ATP: consumo y la reposición asociado a disminución de flujo tisular de electrones a la mitocondria, con la consecuente disminución de la presión de oxígeno tisular, generándose afectación de las bombas dependientes de ATP; es así por ejemplo que la afectación de la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa, tiene como consecuencia una salida de K^+ , desde la célula y una acumulación intracelular de Na^+ [18, 20]. Se terminará produciendo una alteración del sistema energético celular en condiciones de hipoxia, con afectación de la fosforilación oxidativa y un aumento de la actividad de glucólisis anaerobia, esto conducirá a un aumento en la concentración de ácido láctico y como consecuencia una disminución del pH que

acidificara el medio intracelular, con la afectación final de múltiples enzimas celulares [18] - 2-Aumento/Producción de radicales libres: Con la llegada de flujo sanguíneo durante la reperfusión aumentan las células pro-inflamatorias, como mastocitos activados, neutrófilos etc. Estas contribuirán a producir un aumento en la concentración de radicales libres en dicho sitio, los cuales son muy tóxicos y producen disfunción celular por diferentes mecanismos como lo son, la peroxidación de membrana lipídica, la desnaturalización de enzimas y la disfunción de organelos, entre otros [19] - 3-Inadecuada reperfusión: también llamada síndrome de no reflujo, en el cual el tejido isquémico no logra alcanzar los niveles de flujo existentes antes de someterse a la isquemia [19, 24] - 4-Sobrecarga de Ca^{2+} : es secundaria a la recaptación por deterioro en la actividad del retículo sarcoplasmático, que lleva a un aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólica, que determina un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial inducida por este ion. Este aumento de permeabilidad depende de la acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, lo cual a su vez es regulado por el potencial a través de la membrana mitocondrial interna; si este potencial de membrana se conserva durante el incremento de Ca^{2+} , se favorece la entrada y sobrecarga mitocondrial del mismo, resultando en el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la posible evolución hacia la muerte celular [25]; por lo tanto el potencial a través de la membrana interna mitocondrial y el nivel de Ca^{2+} en su matriz determinan en la isquemia la posible evolución hacia la muerte celular. El Ca^{2+} finalmente también activa fosfolipasas y otras enzimas degradantes que contribuyen a aumentar el daño tisular [18, 25].

I.B.3.3 - Acondicionamiento cardíaco – Se llama así al mecanismo cardioprotector, que puede ser pre, intra o post –isquémico, que puede ser realizado por medios físicos y/o químicos. Los medios físicos consisten en someter al corazón a breves periodos de isquemia reversible, en determinado tiempo e intervalos de duración con el fin de generar mecanismos cardioprotectores frente a futuras situaciones de isquemia prolongada. Los medios químicos consisten en la aplicación de drogas o fármacos cardioprotectores, realizado antes, durante y después de la isquemia [26]. El acondicionamiento se puede explicar cómo breves períodos de isquemia que estimulan liberación de adenosina, bradiquininas, etc; hacia la circulación y por esta acceden a los miocitos. En estos se unen a receptores G unidos a receptores de superficie activándose y disparando una cascada de transducción, por medio activación de enzimas tales como la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K)-AKT, quinasas reguladas por señal extracelular (ERK $\frac{1}{2}$), así como el factor inducible por hipoxia (HIF). Estos factores y las quinasas de supervivencia actúan sobre la mitocondria, abriendo canales de K^{+} -ATP dependientes liberando sustancias reactivas al oxígeno. Finalmente se terminan activando otras quinasas de supervivencia como la proteína-quinasa C, entre otras. Estos mecanismos son los que terminan explicando el acondicionamiento y los

beneficios del mismo frente a la injuria por reperusión [26].

1.C- Agroquímicos organofosforados y Carbamatos

Los **organofosforados (OPFRs)**, son compuestos orgánicos degradables que contienen enlaces fósforo-carbono, utilizados principalmente en el control de plagas [27]. Se distribuyen a nivel mundial y de forma ubicua presentes en varios medios ambientales como el polvo, el aire interior, la atmósfera, las aguas superficiales, los sedimentos y el suelo [28]. Son derivados de ácido fosfórico sintéticos, cuyas estructuras varían dependiendo de diferentes enlaces éster y pueden ser divididos en tres tipos, los OPFRs clorados, OPFRs alquilos y OPFRs arilos. Los OPFRs tienen una amplia gama de propiedades físico-químicas diferentes entre sí, como son, solubilidad, la presión de vapor y factores de bioconcentración. Estas propiedades son factores importantes a la hora de evaluar el comportamiento de estos en el ambiente y sobre los organismos. Los OPFRs más volátiles tienden a permanecer en el aire y los más pesados en el polvo. Los OPFRs del grupo Alquilo y Arilo, con mayor masa molecular son más hidrófobos, tienen similares factores de bioconcentración y afinidad por los sedimentos y el suelo [28]. Los Clorados son más solubles en agua, por lo cual se consideran ser una amenaza persistente para los animales acuáticos [28]. Durante los últimos años casi todos los organofosforados producidos se han detectado en animales marinos, peces de agua dulce, aves, insectos y humanos [28]. La migración de los OPFRs en el medio ambiente conduce a su exposición a los organismos y su subsecuente absorción. En seres humanos la absorción se da principalmente por vía inhalatoria de aire interior. El polvo domestico es una de las fuentes más importantes para personas que viven en ambientes interiores [29]. Otra vía significativa de absorción es mediante la ingestión de alimentos y agua contaminadas, en donde los plásticos de embalaje también juegan un papel importante [30]. El contacto dérmico también puede ser una vía de absorción al tocar agua contaminada, al usar toallitas para manos o al contacto directo con los productos que contienen OPFRs [30]. Sin embargo, la exposición total de los seres humanos a OPFRs, incluyendo todas las vías de absorción, sigue siendo desconocida. La absorción en animales depende de la especie. En animales acuáticos la vía principal de absorción es mediante las branquias y tejido epitelial [31, 32]. En animales depredadores la vía principal es la ingestión, esta depende del lugar que ocupe el animal en la cadena trófica ya que un animal al final de dicha cadena es posible que consuma más OPFRs [33]. Se ha visto que los OPFRs tienen la propiedad de acumularse en diferentes tipos de organismos vivos, lo cual se denomina proceso de bioacumulación. El potencial real acumulativo es variable entre los diferentes OPFRs, individuos y especies [34]. También se sabe que el comportamiento alimenticio junto con la eficiencia para metabolizar a los OPFRs, pueden afectar en gran medida el potencial de acumulación de estos. Hay estudios que sugieren que el tamaño y el género influyen en la bioacumulación, en donde se vio que los peces

más grandes podían acumular más OPFRs y que las hembras tenían más concentración que los machos [32]. Además se observó que los animales al final de la cadena trófica tenían más concentración de OPFRs que los del principio. Esto se debe a la biomagnificación, la cual es un proceso de bioacumulación. Por otro lado se sabe que el metabolismo es un determinante principal de la bioacumulación y el aclaramiento de xenobióticos, así como un determinante indirecto de los efectos toxicológicos de los OPFRs [35]. Estos son metabolizados en el hígado a través de dos fases de biotransformación a metabolitos que son más hidrófilos y más fácilmente eliminados [36]. La eliminación de los OPFRs ocurre en un gran porcentaje a través de la orina, las heces y por último, por el gas expirado [37, 38]. Hay que dejar claro que los estudios sobre el metabolismo de OPFRs se han limitado a ratas de laboratorio y en modelos humanos in vitro, no hay información sobre el proceso metabólico in vivo lo cual debería ser un objetivo a investigar en el futuro. Se sabe que OPFRs son tóxicos para el ser humano debido a que son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, la cual hidróliza a la acetilcolina en sitios de transmisión colinérgica. Por la importancia del tema se han realizados estudios sobre la absorción, bioacumulación, biomagnificación y procesos metabólicos[39]. Los OPFRs clorados han demostrado ser neurotóxicos y cancerígenos [40, 41]. Estos pueden entrar fácilmente al torrente sanguíneo e inducir tumores en el hígado, riñón y testículos [42]. También se sabe que estos se encuentran en el polvo domestico y que se correlaciona con una menor concentración de hormonas tiroideas y niveles altos de prolactina en hombres [43, 44]. Los **carbamatos** son compuestos orgánicos derivados del ácido carbámico, algunos de ellos conocidos como uretanos. Su mecanismo de acción como los OPFRs es por inhibición de la colinesterasa, pero en sitios de acción distintos [39]. Se han reportado diversos casos de intoxicación aguda por diversos agroquímicos organofosforados y carbamatos en intentos de autoeliminación en las que se ha descrito alteraciones cardiacas en los pacientes, tanto alteraciones eléctricas a nivel del ECG reflejadas como arritmias e imitación de IAM como alteraciones a nivel de enzimas cardiacas simulando injuria cardiaca [45, 46]. Un estudio de cohorte histórico realizado en Taiwán demostró una relación significativa entre el desarrollo de cardiopatías a largo plazo y la exposición aguda a insecticidas organofosforados incluso en pacientes con o sin otros factores de riesgo cardiovasculares como diabetes, hipertensión arterial y dislipemias. Se vio que la acumulación de acetilcolina en el terminal sináptico puede estar asociada a una injuria miocárdica persistente en el paciente con intoxicación por organofosforados. También se vio que un temprano y adecuado tratamiento de la exposición logró reducir significativamente el riesgo de desarrollo de patologías cardiovasculares y neurológicas [47]. De esta manera este y futuros estudios deben estar enfocados a la necesidad de estudiar el mecanismo por el cual los organofosforados causan daño a nivel cardiovascular y neurológico, además del riesgo de la exposición crónica a los mismos y

sus secuelas.

1.D- AzinfosMetil y Carbofurano-

El azinfosmetil y el carbofurano son agroquímicos utilizados para el control de plagas en la industria agropecuaria. El azinfosmetil es un compuesto organofosforado utilizado frecuentemente en nuestro medio como insecticida. El carbofurano es uno de los pesticidas más tóxicos, utilizados en nuestro medio en plantación de soja, maíz y papa, por su efectividad en eliminar gusanos (anfidios). Ambos comparten como mecanismo de acción la inhibición de la acetilcolinesterasa [39]. Estos interactúan con la enzima, inhibiendo competitivamente la actividad de la misma en el sitio de acetilcolina, comportándose como sustancias anticolinesterásicas (permitiendo así que la acetilcolina siga ejerciendo su actividad). Pequeñas dosis pueden ser fatalmente tóxicas en humanos, generalmente por contacto, ingestión y/o inhalación. Estos tóxicos son absorbidos por las plantas a través de sus raíces y pueden permanecer en las mismas incluso hasta el momento de llegar a sus consumidores.

II. OBJETIVOS E HIPOTESIS

Teniendo en cuenta todos los antecedentes mencionados, el **trabajo experimental** de esta monografía, o sea su **segunda parte**, tiene como **objetivo general** estudiar si azinfosmetil (OPFRs) y carbofurano (Carbamato), pueden ejercer efectos directos ante exposición aguda a los mismos en corazones aislados denervados. De realizarse este hallazgo es una información relevante que indica que dichos compuestos pueden producir cardiotoxicidad independientemente de su acción anticolinesterásica, sugiriendo que deberían haber métodos alternativos de tratamiento para disminuir la mortalidad ante intoxicaciones agudas que afectan la función cardíaca. Éstos son estudios que viene llevando a cabo el Laboratorio del Dr. Ferreira, participando nuestro grupo de metodología en instancias puntuales de los mismos como ser preparación de soluciones, etc. Los resultados que presentamos fueron obtenidos por el Laboratorio de Canales Iónicos del Dr. Ferreira y pertenecen al mismo. Dados los antecedentes fatales por envenenamiento agudo por ambos, con descripción de fallas cardíacas, nuestra **hipótesis general** de trabajo, es que aún en corazones denervados, la exposición aguda a los mismos producirá trastornos de la función cardíaca.

Nuestro **objetivo específico 1**, es estudiar la dependencia de la curva dosis respuesta con carbofurano. Nuestra **hipótesis específica 1**, es que carbofurano a relativamente bajas concentraciones del orden uM, producirá alteraciones deletéreas de la función cardíaca en ino y cronotropismo. Finalmente, exploramos como la injuria por isquemia y reperfusión puede ser afectada por este agroquímico.

Nuestro **objetivo específico 2**, es estudiar la dependencia de la curva dosis respuesta con azinfos-metil. Nuestra **hipótesis específica 2**, es que azinfos-metil, a relativamente bajas concentraciones del orden uM, producirá alteraciones deletéreas de la función cardíaca en ino y cronotropismo. Finalmente, exploramos como la injuria por isquemia y reperfusión puede ser afectada por este agroquímico.

Nuestro **objetivo específico 3**, es comparar la dependencia de la curva dosis respuesta con azinfos-metil y carbofurano, estableciendo si hay diferencias estadísticamente significativas o no. Nuestra **hipótesis específica 3**, es que azinfos-metil tendrá efectos deletéreos, a dosis más altas que el carbofurano, dado que el azinfos-metil necesita de cambios a nivel hepático para producir especies más reactivas en los organismos.

III. MATERIAL Y METODOS

III.A. Normas éticas y uso de animales

Los cobayos fueron sacrificados por dislocación cervical, método aprobado por CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal). Para estos experimentos se utilizaron cobayos de sexo masculino, con un peso aproximado de 200-300g. Los experimentos fueron realizados con el consentimiento aprobado por CHEA (Expediente N° 071140-001464-12).

III.B. Materiales y Métodos

Los experimentos de corazón aislado de cobayo se realizaron mediante Método de Langendorff, efectuándose el registro simultáneo de la actividad eléctrica y tensión [48]. Mediante este método, se realizaron estudios dosis respuesta, con diferentes concentraciones de agroquímicos. En todo momento el corazón recibe una solución Tyrode (similar al suero electrolítico del plasma) y oxígeno, desde el momento en que es obtenido y colocado en el set up (Langendorff) [49]. La solución Tyrode se obtuvo a partir de una solución de Tyrode madre llevándola a 1.8 mM de Ca^{2+} , con un pH de 7.3. Su composición final fue: NaCl 135 mM, KCl 5,4 mM, MgCl_2 1 mM, $\text{Na}(\text{H}_2)\text{PO}_4$ 0.33 mM, Hepes, 10 mM. A esta solución base se le agregaron los agroquímicos Azinfosmetil y Carbofurano a partir de stocks de alta solubilidad en H_2O . Se administró oxígeno sobre la solución Tyrode a una presión de 50 kp/cm². El flujo se midió varias veces durante los experimentos y fue de aproximadamente 12 mL/min. La temperatura es medida de manera constante con un sensor de temperatura (Digital Multimeter) En los experimentos realizados se evaluaron los cambios de tensión (amplitud) y frecuencia, registrados en el corazón aislado de cobayo, ante concentraciones crecientes de los diferentes agroquímicos, carbofurano y azinfos-metil. También se observaron los cambios producidos en la actividad eléctrica cardíaca, ante

diferentes dosis de los agroquímicos. Los experimentos de dosis respuesta se realizaron con estos 2 agroquímicos distintos que supuestamente utilizan los mismos mecanismos de acción anticolinesterasa en su función como pesticidas. También realizamos experimentos para evaluar la injuria por isquemia y reperfusión. Para ellos se detuvo el flujo de perfusión por un lapso reversible de 5 a 10 minutos, manteniendo la temperatura del corazón a 37 grados Celsius. Mientras, se monitorearon simultáneamente los cambios en tensión y actividad eléctrica cardíacas. Se registró la tensión con un sensor insertado en la base del músculo papilar conectado a un transductor de tensión Grass Force Displacement Transducer FT03. La señal eléctrica se registró con electrodos que se colocan en la superficie del corazón, registrando potenciales de acción monofásicos. Estas señales se amplificaron con amplificador diferencial IteL 601 con filtro de 10 Hertz y ganancia de 1000. La salida del amplificador se conectó a conversor análogo-digital Minidigi 1ª de 16 bits (Axon Instruments). Para obtener los registros se utilizó el software Axovacs (Molecular Devices). Para el análisis de datos se utilizaron los siguientes softwares: Clampfit (Molecular Devices) y Sigmaplot (Jandel Sci). A las curvas dosis respuesta se les ajustó una ecuación de Hill de acuerdo con [50]. Las pruebas estadísticas se desarrollaron con los datos experimentales empleando Sigmaplot de acuerdo con [51].

IV. RESULTADOS

IV.1. Carbofurano – Relacionados con Objetivo Específico 1.

En la figura 1, observamos los registros de tensión y eléctricos ante la exposición a carbofurano 10 uM. Pueden verse claramente las alternancias de las contracciones (flechas)

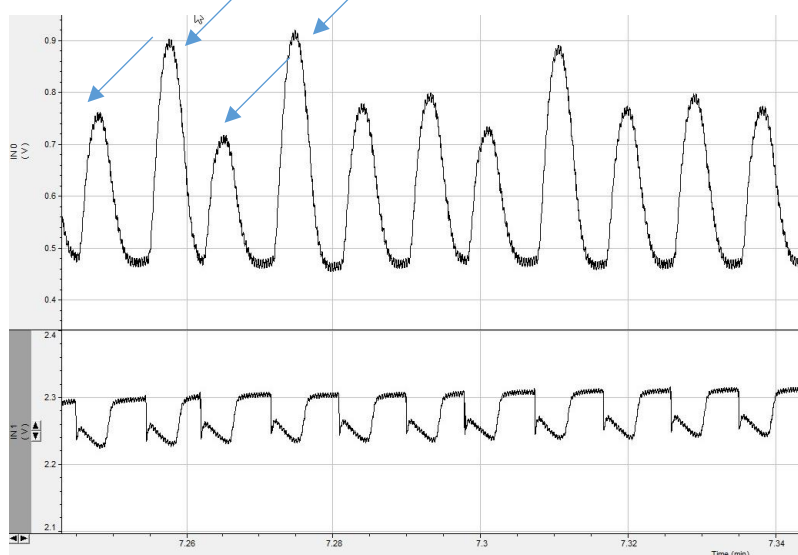
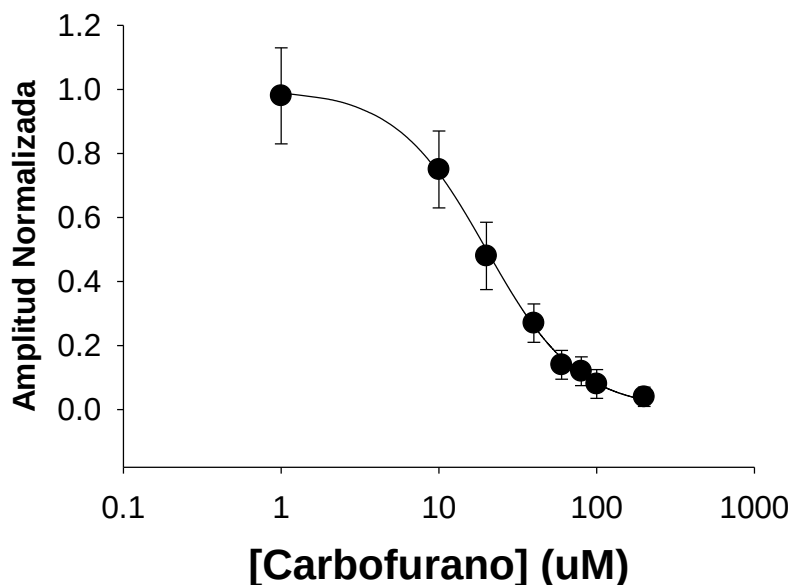


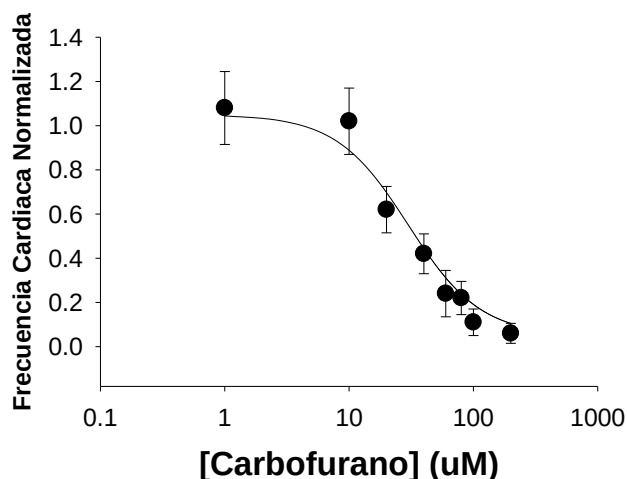
Fig1. Registro eléctrico (abajo) y de tensión (arriba), en un procedimiento experimental de dosis respuesta con carbofurano 10 uM. Se observan alternancias mecánicas (flechas).

A continuación efectuamos los estudios de dosis respuesta con carbofurano, observándose un efecto inotrópico negativo, evidenciado por una disminución de la contractilidad cardíaca en los

registros de tensión. El efecto inotrópico negativo aumenta en función del aumento de las dosis administradas de carbofurano, de esta forma se observa una inhibición de la contractilidad cardíaca con una dosis media de 20uM, luego de ajustar una ecuación de Hill (ver Fig.2).



Adicionalmente, se evidenció un descenso en la línea de base luego de los lavados y recuperación con tyrode. Este efecto fue acumulativo con el aumento de la dosis administrada de carbofurano. También observamos efectos cronotrópicos negativos, con un marcado descenso de la frecuencia cardíaca, en dosis similares a las que se observaron los efectos inotrópicos negativos (ver Fig.3). Dicho efecto se vio aumentado con el aumento de las dosis administradas de carbofurano.



Respecto al ritmo cardíaco, se evidenció la presencia de alternancias mecánicas, sugestivas de trastornos de la homeostasis de Calcio intracelular.

En los experimentos de dosis respuesta con isquemia previa, se observaron alteraciones en la recuperación de la función cardíaca normal. Estas alteraciones fueron: aumento del tiempo de

recuperación, con una disminución de la línea de base y de la amplitud de la onda de tensión contráctil, y la aparición de alternancias. Hicimos primero un registro control en ausencia del agroquímico (Fig. 4) y luego un registro con el agroquímico (Fig.5).

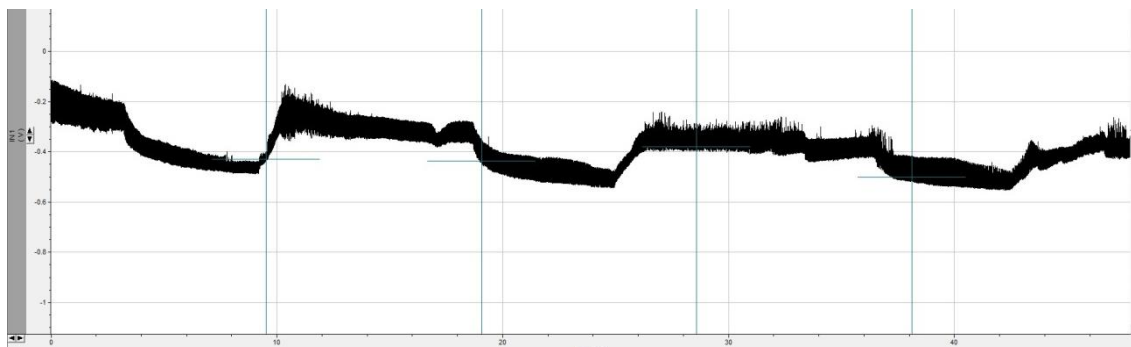


Fig4. Registro control. Registro de tensión en un procedimiento experimental de ischemia reperfusión.

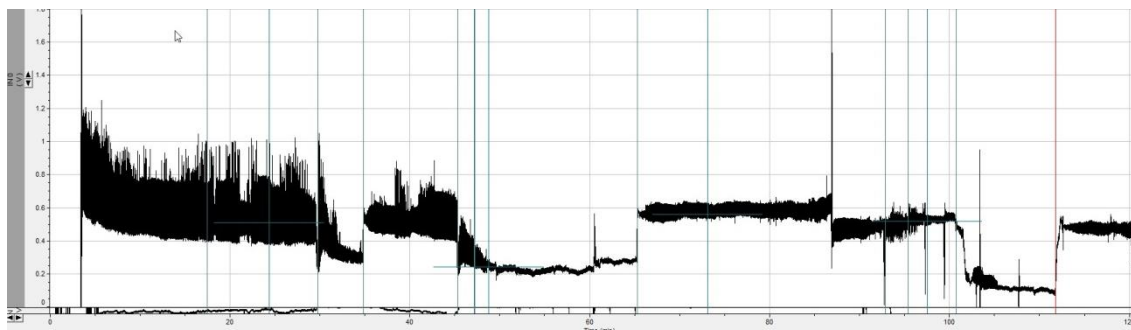


Fig5. Registro de tensión, en un procedimiento experimental donde se realiza ischemia y reperfusión con solución de carbofurano 10 uM en Tyrode. Se observa un marcado efecto inotrópico negativo.

IV.2. AzinfosMetil – Relacionados con Objetivo Específico 2.

Los resultados observados para el azinfosmetil fueron muy distintos a los de carbofurano. Esto se debe a que trabajamos con la sustancia sin metabolización hepática, que potencia su activación. El azinfosmetil con el que trabajamos se potencia por una activación enzimática por citocromo p450, que equivale a un primer paso hepático. De todas formas desconocíamos, si este agroquímico podría tener efectos cardiotoxicos independiente de su activación enzimática, por lo cual fue evaluado mediante los experimentos. Los resultados fueron acorde a la hipótesis planteada de una actividad de azinfosmetil, aún en ausencia de potenciación hepática. El azinfosmetil mostró efectos cardiotoxicos mucho menos marcados que carbofurano. La Fig. 6 muestra un registro típico de exposición a azinfosmetil 10 uM.

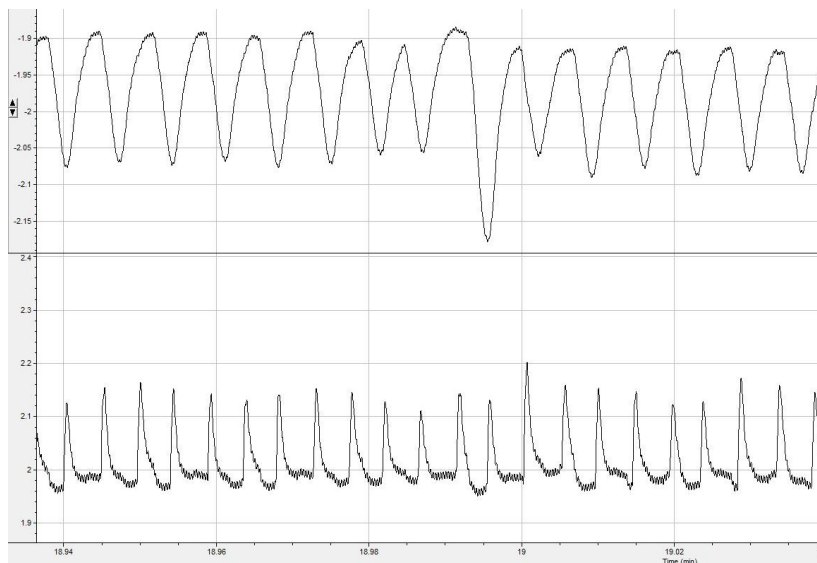


Fig6. Registro eléctrico (abajo) y de tensión (arriba), en un procedimiento experimental de dosis respuesta con azinfosmetil 10 uM. Se observan menos alteraciones que con carbofurano. El Potencial de Acción Monofásico luce distinto dado en este caso se trata de una rata. Con los cobayos se obtuvieron resultados similares.

A 10 uM, a diferencia de carbofurano, se observaron cambios mínimos de tensión, de frecuencia y ritmo cardíaco. La curva Dosis Respuesta con ajuste de la ecuación de Hill se observa en la Fig.7.

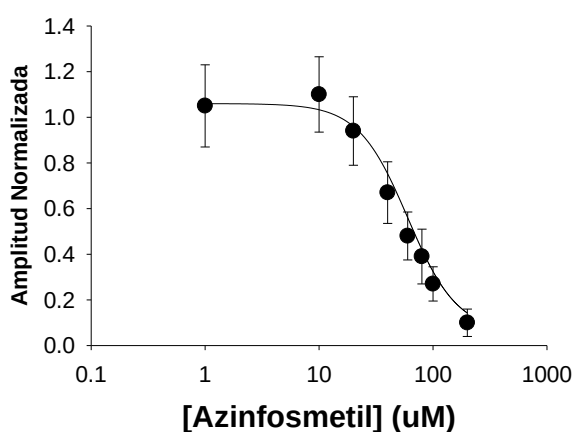


Fig.7 Curva Dosis Respuesta del inotropismo a AzinfosMetil con ajuste de ecuación de Hill. La dosis media es de aprox. 70 uM, numero de hill -2.5 (n=3).

Es interesante que a dosis cercanas a 10 uM, es posible observar un incremento de la tensión con AzinfosMetil, a diferencia de lo observado con carbofurano.

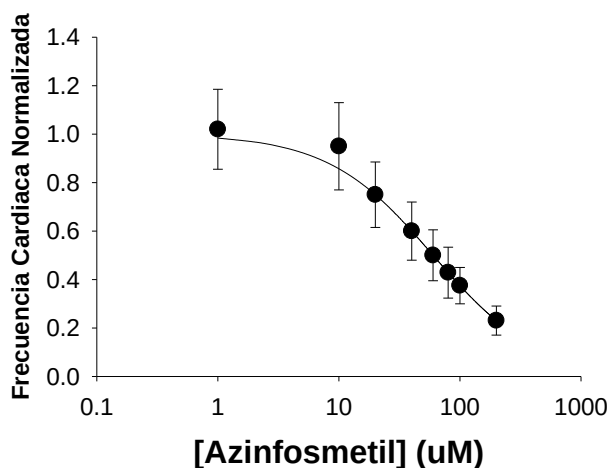


Fig.8 Curva Dosis Respuesta del cronotropismo a AzinfosMetil con ajuste de ecuación de Hill. La dosis media es de aprox. 80 uM, numero de hill -1.8 (n=3).

En la Fig.8 se observa el cronotropismo negativo para el azinfosmetil. Finalmente, se estudió la injuria por isquemia y reperfusión en presencia de Azinfos Metil. A diferencia de carbofurano, en los experimentos con isquemia previa, el corazón se recuperó de la isquemia casi normalmente con la solución de AzinfosMetil 10 uM en Tyrode. Tampoco se evidenció un aumento de las alteraciones isquémicas en estas condiciones. Los resultados se muestran en la Fig.9.

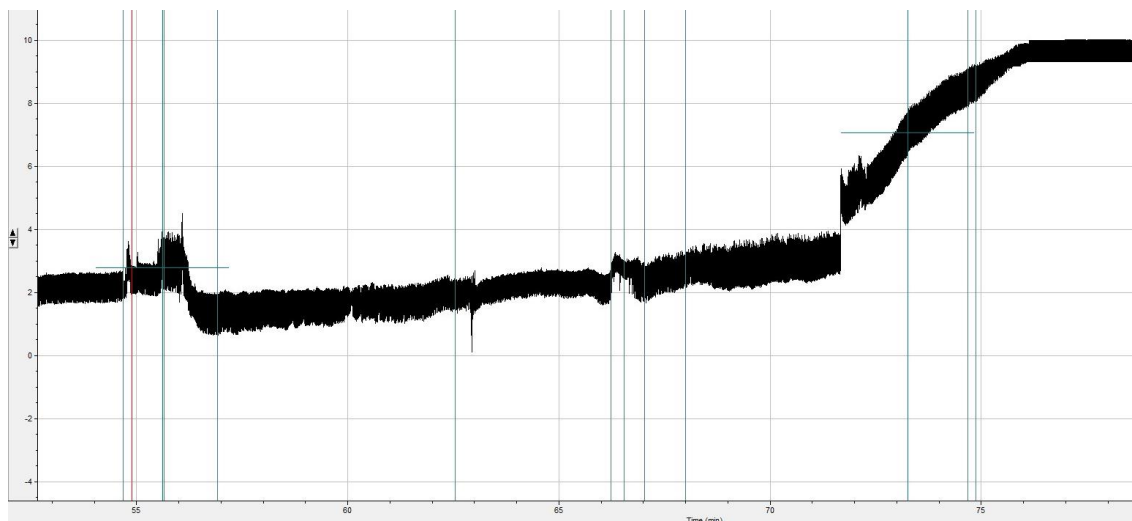


Fig9. Registro de tensión, en un procedimiento experimental donde se realiza isquemia y reperfusión con solución de AzinfosMetil 10 uM en tyrode. Se observa un débil efecto inotrópico negativo.

IV.3. Comparación Carbofurano y AzinfosMetil – Relacionados con Objetivo Específico 3.

Realizamos las comparaciones de los efectos producidos por ambos agroquímicos, para saber si hay diferencias estadísticamente significativas entre los efectos observados. De ser así, sugiere que la repercusión a la exposición aguda a ambos es distinta y por tanto conlleva distinta peligrosidad. Estos son datos de asociaciones estadísticas que no implican necesariamente mecanismos de acción distintos. Puede tratarse de un mismo mecanismo de acción que en un caso su efecto es más pronunciado al otro. Las comparaciones que efectuamos usando test de t de Student para los valores promedio de las curvas Dosis Respuesta, comprenden: a) Comparación del efecto inotrópico negativo entre carbofurano y azinfosmetil b) Comparación del efecto cronotrópico negativo entre carbofurano y azinfosmetil c) Comparación entre los efectos inotrópico y cronotrópico negativo, para cada uno de estos agroquímicos.

IV.3.A - Comparación del efecto inotrópico negativo entre carbofurano y azinfosmetil.

En la tabla I se observa el resultado del test de t aplicado a los valores promedio de las curvas dosis respuesta para el inotropismo negativo de carbofurano y azinfosmetil.

Normality Test:		Passed (P = 0.473)			
Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 27	9	1	0.625	0.375	0.133
Col 28	9	1	0.357	0.348	0.123
Difference	9	1	0.268	0.149	0.0526

t = 5.089 with 7 degrees of freedom. (P = 0.001)
95 percent confidence interval for difference of means: 0.143 to 0.392

The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change (P = 0.001)

Tabla I – Test de t para valores promedio de respuesta inotrópica para cada dosis molar equivalente de carbofurano o azinfosmetil. El análisis estadístico efectuado para n=9 valores promedio entre el efecto inotrópico negativo de ambos agroquímicos, es estadísticamente diferente y significativo con $p = 0.001$, siendo el carbofurano significativamente más potente que el azinfosmetil.

Este resultado puede explicarse por el hecho de que la variedad azinfosmetil empleada necesita de un paso de metabolización hepática que potencia su efecto. De todos modos, debe remarcarse, que a pesar de no contar con esta potenciación hepática, el azinfosmetil mantiene a valores cercanos a 100 uM efectos cardíacos deletéreos.

IV.3.B - Comparación del efecto cronotrópico negativo entre carbofurano y azinfosmetil.

En la tabla II se observa el resultado del test de t aplicado a los valores promedio de las curvas dosis respuesta para el cronotropismo negativo de carbofurano y azinfosmetil.

Normality Test:		Passed (P = 0.066)			
Treatment Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 39	9	1	0.471	0.399	0.141
Col 40	9	1	0.607	0.280	0.0989
Difference	9	1	-0.136	0.132	0.0465

t = -2.912 with 7 degrees of freedom. (P = 0.023)
95 percent confidence interval for difference of means: -0.246 to -0.0255

The change that occurred with the treatment is greater than would be expected by chance; there is a statistically significant change (P = 0.023)

Tabla II – Test de t para valores promedio de respuesta cronotrópica para cada dosis molar equivalente de carbofurano o azinfosmetil. El análisis estadístico efectuado para n=9 valores promedio entre el efecto cronotrópico negativo de ambos agroquímicos, es estadísticamente diferente y significativo con $p = 0.023$, siendo el carbofurano significativamente más potente que el azinfosmetil.

Al igual que para la Tabla I, este resultado puede explicarse por el hecho de que la variedad azinfosmetil empleada necesita de un paso de metabolización hepática que potencia su efecto. Si bien aquí no efectuamos un análisis estadístico para trastornos del ritmo, fue posible observar que carbofurano conduce a dosis más bajas a estas alteraciones del ritmo cardíaco, siendo posible observar alternancias, como se muestra en la Fig.1. Las alternancias con carbofurano son muy relevantes dado que están indicando un proceso patológico de fondo que implica un desbalance de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. No observamos alternancias con AzinfosMetil.

IV.3.C - Comparación del efecto inotrópico y cronotrópico negativo para cada uno de los agroquímicos estudiados.

Este test estadístico es relevante, dado que puede sugerir si hay elementos comunes, que puedan explicar los efectos negativos observados en funciones cardíacas diferentes, para cada uno de los agroquímicos. Si no hay diferencias significativas entre ambos efectos, podría ser debido a que se compromete como base por ambos agroquímicos, un elemento estructural-funcional como blanco común para lograr estas alteraciones de funciones cardíacas distintas.

CARBOFURANO					
Group	N	Missing	Median	25%	75%
Col 42	9	1	0.205	0.1000	0.615
Col 43	9	1	0.330	0.165	0.820
The difference in the median values between the two groups is not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0.574)					
Correlation coefficient r=0.987					
Both variables are statistically linked or associated.					
AZINFOSMETIL					
Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Col 45	9	1	0.625	0.375	0.133
Col 46	9	1	0.607	0.280	0.0989
The difference in the mean values of the two groups is not great enough to reject the possibility that the difference is due to random sampling variability. There is not a statistically significant difference between the input groups (P = 0.914).					
Correlation coefficient r=0.981					
Both variables are statistically linked or associated.					

Tabla III – Test de t y análisis de correlación de Pearson para la comparación de valores promedio de respuesta ino y cronotrópica para cada dosis molar equivalente de carbofurano o azinfosmetil. El análisis estadístico efectuado para n=9 valores promedio entre el efecto ino y cronotrópico negativo de ambos agroquímicos, es estadísticamente indistinguible y no significativo. Para ambos agroquímicos hay una dramática asociación entre las variables crono e inotrópica de la función cardíaca.

Este test estadístico es relevante e indica que cuando se afecta el inotropismo, hay una asociación estadísticamente significativa, respecto a que se afecte también el cronotropismo. Esto se evidenció de mejor forma efectuando un análisis de correlación estadística de Pearson entre ambas variables (r aprox. 1). Ello sugiere que como base de dicha asociación, puede existir un elemento estructural/funcional común para ambos. Realizar un análisis estadístico a los experimentos de isquemia e injuria por reperusión no se consideró necesario, dado que las diferencias son marcadamente visibles en todos los casos. Por otro lado, realizar los mismos no es metodológicamente sencillo, dado que existió una variación en el rango de 1 a 2 minutos para las isquemias y reperfusiones realizadas. De todos modos, todos estos experimentos implicaron la

mantención de isquemia por un período de 5 a 10 minutos, para no provocar daños irreversibles en el corazón aislado.

V. DISCUSION, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados experimentales en esta monografía, muestran que los agroquímicos pesticidas ORPFs y carbamatos, caracterizados por la inhibición de la actividad anticolinesterasa, son capaces de ejercer efectos en corazón aislado denervado, independientemente de su acción anticolinesterasa. Este hecho es relevante dado que ante exposiciones agudas (como por ejemplo intentos de autoeliminación), se puede dar este tipo de situación, que necesitará en su tratamiento no solo de la reactivación de la actividad anticolinesterasa vía Oximas [52], sino que también tratamientos alternativos que surgen de este diagnóstico toxicológico molecular. Ambos alteran la capacidad cardíaca contráctil, la frecuencia y ritmo cardíacos disminuyendo su reserva y capacidad funcional.

Otro hallazgo relevante es que carbofurano produce mayores alteraciones a nivel cardíaco a dosis bajas, que la variedad semiactiva no metabolizada de azinfosmetil. El carbofurano es bastante más severo que el azinfosmetil respecto a la generación de arritmias, produciendo alternancias mecánico-eléctricas. Está bien establecido que las alternancias mecánico-eléctricas son un preámbulo de situaciones más graves, que conducen a la muerte, como ser la fibrilación ventricular [53, 54].

Respecto a la isquemia e injuria por reperusión, se producen resultados similares que los observados para los corazones aislados en situación basal. Carbofurano agrava los fenómenos observados por la isquemia y la reperusión, en tanto que con azinfosmetil dichos fenómenos son minimizados. El agravamiento de los fenómenos de isquemia y reperusión por carbofurano, sugiere un sinergismo o adición entre los mecanismos de producción de daño por isquemia y reperusión, con los de carbofurano.

Todos los fenómenos resultaron similares, pero con una potencia significativamente mayor para el carbofurano respecto del azinfosmetil, esto quizá es debido a que el azinfosmetil se encuentra en su estado semi-activo. En la estructura organofosforada del azinfosmetil semi-activa, igual se generan trastornos cardíacos similares, pero a una dosis mayor.

El hecho de que los fenómenos ino y cronotrópicos estén asociados para cada uno de los agroquímicos con alto coeficiente de correlación, sugiere un mecanismo de base común. A nivel de la frecuencia cardíaca en el nodo, el canal de Ca^{2+} L, es uno de sus factores determinantes [8]. Un bloqueo de dicho canal conduce a un cronotropismo negativo. A nivel del miocardio contráctil, dicho canal es también central para el acoplamiento excitación contracción cardíaco [7]. Si se bloquea dicho canal, se obtiene un inotropismo negativo y posibles alteraciones del ritmo como alternancias debido a un desbalance de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular. De esta forma, es

posible que ambos agroquímicos impacten de manera común, al menos sobre este canal a nivel cardíaco, pudiendo explicarse así la gran asociación de los fenómenos observados.

Las estructuras de carbofurano y azinfosmetil se muestran en la Fig.10. Ambos

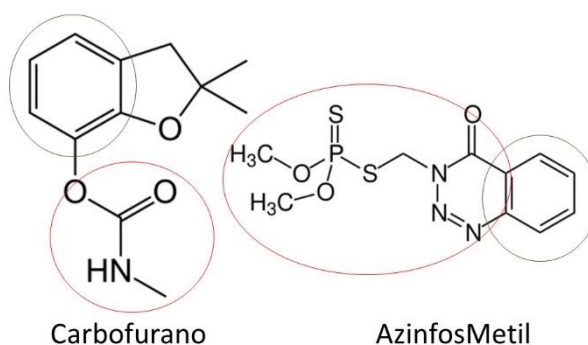


Fig 10. Comparación de estructuras de Carbofurano y AzinfosMetil. Ambos agroquímicos tienen un sector aromático hidrofóbico (círculo oscuro) y un sector polar (círculo rojo).

agroquímicos presentan un sector aromático hidrófobo y un sector polar, lo que puede explicar la similitud de su mecanismo de acción y también de toxicidad (ya sea inhibición anticolinesterasa o promoción de cambios cardíacos directos). Es interesante observar que las drogas bloqueantes de canal de Ca^{2+} L, tienen generalmente una estructura similar a estos dos agroquímicos.

Como perspectivas futuras que ya están en curso en el Laboratorio de Canales Iónicos, se está explorando el efecto directo de estos agroquímicos en las corrientes por el canal de Ca^{2+} L. También se explorarán otros elementos relacionados a la homeostasis de Ca^{2+} intracelular como ser el receptor de Ryanodina Tipo 2 y la bomba de Ca^{2+} SERCA del RS. Estas son las perspectivas desde el punto de vista básico. Desde el punto de vista clínico, se plantea el seguimiento adecuado de la función cardíaca en intoxicaciones agudas producidas por estos agroquímicos con falla cardíaca, planteando posibles tratamientos con agonistas del canal de Ca^{2+} L en estos casos.

VI. AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Canales Iónicos, por su asistencia en la realización de experimentos, en especial Carlos Costa y Mariana Alonso. Deseamos agradecer el apoyo brindado al Dr. Ferreira en su Proyecto CSIC I+D 146, quien es el investigador responsable que ha ideado dicho proyecto, en el cual se inscribe esta monografía como subpunto de las investigaciones que activamente realiza el Laboratorio de Canales Iónicos en el marco de dicho Proyecto. Los resultados aquí presentados son elaboración intelectual de dicho Laboratorio,

VII. REFERENCIAS

1. Tang, W., et al., *Independent Prognostic Factors for Acute Organophosphorus Pesticide Poisoning*. Respir Care, 2016.
2. Timofeeva, O.A., et al., *Persistent cognitive alterations in rats after early postnatal exposure to low doses of the organophosphate pesticide, diazinon*. Neurotoxicol Teratol, 2008. **30**(1): p. 38-45.
3. Taghavian, F., et al., *Comparative Toxicological Study between Exposed and Non-Exposed Farmers to Organophosphorus Pesticides*. Cell J, 2016. **18**(1): p. 89-96.
4. Phatake, R., et al., *Posterior reversible encephalopathy syndrome in a patient of organophosphate poisoning*. Indian J Crit Care Med, 2014. **18**(4): p. 250-2.
5. Galper, J., W. Klein, and W. Catterall, *Muscarinic acetylcholine receptors in developing chick heart*. Journal of Biological Chemistry, 1977. **252**(23): p. 8692-8699.
6. Panda, S., et al., *Glycemic Status in Organophosphorus Poisoning*. J Nepal Health Res Counc, 2015. **13**(31): p. 214-9.
7. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
8. Katz, A.M., *Physiology of the Heart*. 2010: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins Health.
9. Katz, A.M., *Contractile proteins of the heart*. Physiological Reviews, 2016. **50**(1): p. 63-158.
10. Kibos, A.S., et al., *Cardiac Arrhythmias: From Basic Mechanism to State-of-the-Art Management*. 2013: Springer London.
11. Borstnar, C.R. and F.C. López, *Farreras-Rozman. Medicina Interna + acceso online*. 2012: Elsevier Health Sciences Spain.
12. Wald, E.B. and T.R. Harrison, *Harrison: principios de medicina interna*. 1989: Interamericana-McGraw-Hill.
13. Dubin, D., *Rapid Interpretation of EKG's: An Interactive Course*. 2000: Cover Publishing Company.
14. Surawicz, B. and C. Fisch, *Cardiac alternans: diverse mechanisms and clinical manifestations*. J Am Coll Cardiol, 1992. **20**(2): p. 483-99.
15. Laurita, K.R. and D.S. Rosenbaum, *Cellular mechanisms of arrhythmogenic cardiac alternans*. Progress in biophysics and molecular biology, 2008. **97**(2): p. 332-347.
16. Laurita, K.R. and D.S. Rosenbaum, *Cellular mechanisms of arrhythmogenic*

- cardiac alternans*. Prog Biophys Mol Biol, 2008. **97**(2-3): p. 332-47.
17. Edwards, J.N. and L.A. Blatter, *Cardiac alternans and intracellular calcium cycling*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2014. **41**(7): p. 524-532.
 18. Kumar, V., *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. 2010: Elsevier.
 19. Férrez, S., R.O. Sánchez, and M.F. Márquez, *Daño miocárdico por reperfusión*. Archivos de Cardiología de México, 2001. **71**: p. 45-50.
 20. de Jesús García-Rivas, G., *Canales mitocondriales de potasio sensibles a ATP y cardioprotección*. Revista de Educación Bioquímica, 2006. **25**(1): p. 20-25.
 21. Garcia-Dorado, D., et al., *Protección contra el daño miocárdico por isquemia-reperfusión en la práctica clínica*. Revista Española de Cardiología, 2014. **67**(5): p. 394-404.
 22. Jivraj, N., F. Liew, and M. Marber, *Ischaemic postconditioning: cardiac protection after the event*. Anaesthesia, 2015. **70**(5): p. 598-612.
 23. Skyschally, A., et al., *Ischemic postconditioning: experimental models and protocol algorithms*. Basic research in cardiology, 2009. **104**(5): p. 469-483.
 24. Fernández Avilés, F., *Cardiopatía isquémica (II). Mecanismos fisiopatológicos de la isquemia y la reperfusión miocárdica*. Revista Espanola de Cardiologia, 1988. **41**(2): p. 109-119.
 25. Luna-Ortiz, P., M. El-hafidi, and M. Martínez-Rosas, *La función mitocondrial y la cardioprotección*. Revista Mexicana de Anestesiología, 2013. **36**(4): p. 294-305.
 26. Bell, R., et al., *9th Hatter Biannual Meeting: position document on ischaemia/reperfusion injury, conditioning and the ten commandments of cardioprotection*. Basic research in cardiology, 2016. **111**(4): p. 1-13.
 27. Quin, L.D., *A Guide to Organophosphorus Chemistry*. 2000: Wiley.
 28. Hou, R., Y. Xu, and Z. Wang, *Review of OPFRs in animals and humans: Absorption, bioaccumulation, metabolism, and internal exposure research*. Chemosphere, 2016. **153**: p. 78-90.
 29. Marklund, A., B. Andersson, and P. Haglund, *Screening of organophosphorus compounds and their distribution in various indoor environments*. Chemosphere, 2003. **53**(9): p. 1137-1146.
 30. Eddleston, M., et al., *Management of acute organophosphorus pesticide poisoning*. The Lancet, 2008. **371**(9612): p. 597-607.
 31. Rudnicki, C.A.M., et al., *Gills of juvenile fish *Piaractus mesopotamicus* as histological biomarkers for experimental sub-lethal contamination with the organophosphorus Azodrin® 400*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2009. **52**(6): p. 1431-1441.
 32. Sundkvist, A.M., U. Olofsson, and P. Haglund, *Organophosphorus flame retardants and plasticizers in marine and fresh water biota and in human milk*. Journal of Environmental Monitoring, 2010. **12**(4): p. 943-951.
 33. Eulaers, I., et al., *Brominated and phosphorus flame retardants in White-tailed Eagle *Haliaeetus albicilla* nestlings: bioaccumulation and associations with dietary proxies ($\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$ and $\delta^{34}S$)*. Science of the Total Environment, 2014. **478**: p. 48-57.
 34. Mercado-Borrayo, B.M., et al., *Organophosphorus and Organochlorine Pesticides Bioaccumulation by *Eichhornia crassipes* in Irrigation Canals in an Urban Agricultural System*. Int J Phytoremediation, 2015. **17**(7): p. 701-8.
 35. Meyer, J. and K. Bester, *Organophosphate flame retardants and plasticisers in*

- wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Monitoring*, 2004. **6**(7): p. 599-605.
36. Gomes, J., et al., *Hepatic injury and disturbed amino acid metabolism in mice following prolonged exposure to organophosphorus pesticides*. *Human & experimental toxicology*, 1999. **18**(1): p. 33-37.
 37. Bradway, D.E., T.M. Shafik, and E.M. Lores, *Comparison of cholinesterase activity, residue levels, and urinary metabolite excretion of rats exposed to organophosphorus pesticides*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 1977. **25**(6): p. 1353-1358.
 38. Nomeir, A., S. Kato, and H. Matthews, *The metabolism and disposition of tris (1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate (Fyrol FR-2) in the rat*. *Toxicology and applied pharmacology*, 1981. **57**(3): p. 401-413.
 39. Brunton, L., B. Chabner, and B. Knollman, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition*. 2011: McGraw-Hill Education.
 40. Høyer, A.P., et al., *Organochlorine exposure and risk of breast cancer*. *The Lancet*, 1998. **352**(9143): p. 1816-1820.
 41. Bowers, W.J., et al., *Early developmental neurotoxicity of a PCB/organochlorine mixture in rodents after gestational and lactational exposure*. *Toxicological Sciences*, 2004. **77**(1): p. 51-62.
 42. Telang, S., C. Tong, and G. Williams, *Epigenetic membrane effects of a possible tumor promoting type on cultured liver cells by the non-genotoxic organochlorine pesticides chlordane and heptachlor*. *Carcinogenesis*, 1982. **3**(10): p. 1175-1178.
 43. Meeker, J.D., *Exposure to environmental endocrine disrupting compounds and men's health*. *Maturitas*, 2010. **66**(3): p. 236-41.
 44. Meeker, J.D. and H.M. Stapleton, *House dust concentrations of organophosphate flame retardants in relation to hormone levels and semen quality parameters*. *Environmental health perspectives*, 2010. **118**(3): p. 318.
 45. Joshi, P., et al., *Acute myocardial infarction: can it be a complication of acute organophosphorus compound poisoning?* *J Postgrad Med*, 2013. **59**(2): p. 142-4.
 46. Tonomura, Y., et al., *Evaluation of the usefulness of biomarkers for cardiac and skeletal myotoxicity in rats*. *Toxicology*, 2009. **266**(1-3): p. 48-54.
 47. Hung, D.Z., et al., *The Long-Term Effects of Organophosphates Poisoning as a Risk Factor of CVDs: A Nationwide Population-Based Cohort Study*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0137632.
 48. Costa, C., et al., *Chemical cardiomyopathies: Functional consequences of the application of chloroquine to guinea-pig isolated hearts*. *AnFaMed*, 2014. **1**(1): p. 65-79.
 49. Costa, C., et al., *Cardiomiopatías químicas: Repercusión funcional de la cloroquina en corazón aislado*. *AnFaMed*, 2014. **1**(1).
 50. Motulsky, H. and A. Christopoulos, *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*. 2004: Oxford University Press, USA.
 51. Watt, T.A., R.H. McCleery, and T. Hart, *Introduction to Statistics for Biology, Third Edition*. 2007: CRC Press.
 52. Brunton, L., B. Chabner, and B. Knollman, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition*. 2010: McGraw-Hill Education.

53. Zang, Y.L. and L. Xia, *Cellular mechanism of cardiac alternans: an unresolved chicken or egg problem*. J Zhejiang Univ Sci B, 2014. **15**(3): p. 201-11.
54. Madias, J.E., *T-wave alternans and risk of sudden cardiac death in community-dwelling elderly subjects*. J Electrocardiol, 2010. **43**(5): p. 463.