



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

Departamento de Fisiología y Farmacología

“Daño Hepático y Alteraciones de la Coagulación Sanguínea producidas por el MALATIÓN-Efecto del *Ginkgo biloba*”

Tesis para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA

Que presenta la
Lic. En Farmacia Esther M^a Camacho Ramírez

Directores de Tesis:

DR. Fernando Jaramillo Juárez
DR. Francisco A. Posadas del Río

Aguascalientes, Ags., abril de 2009

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

Departamento de Fisiología y Farmacología

“Daño Hepático y Alteraciones de la Coagulación Sanguínea producidas por el MALATIÓN-Efecto del *Ginkgo biloba*”

Tesis para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA

Que presenta la

Lic. En Farmacia Esther M^a Camacho Ramírez

DR. Fernando Jaramillo Juárez

Director de Tesis

DR. Francisco A. Posadas Del Río

Codirector

DR. Martín Gerardo Rodríguez

Asesor

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

Centro de Ciencias Básicas

L. F. ESTHER MARÍA CAMACHO RAMÍREZ
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA
TOXICOLOGÍA,
P R E S E N T E .

Estimado (a) Sr. (ta): Camacho:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis titulada **“Daño hepático y alteraciones de la coagulación sanguínea producidas por el malatión-Efecto del Ginkgo biloba”**, de acuerdo con su contenido y para dar cumplimiento a los establecido en el Artículo 162 (Fracciones I, II y III) y Artículo 175 (Fracciones I y II) del Reglamento de docencia de la U.A.A., me permito comunicarle que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 5 de marzo de 2009
“SE LUMEN PROFERRE”
EL DECANO

DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ



c. c. p.- Archivo

FJAR,mjda



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
PRESENTE.

De mi mayor consideración:

Por este conducto, me permito comunicarle que el trabajo de tesis "*Daño hepático y alteraciones de la coagulación sanguínea producidas por el malati6n-Efecto del Ginkgo biloba*" realizado por la L. F. Esther María Camacho Ramírez, estudiante de la Séptima Generaci6n del programa de Maestría en Ciencias-Área Toxicología, ha sido revisado y corregido por los miembros de su Comité Tutorial, quienes est6n de acuerdo con su contenido. Por ello, y para dar cumplimiento a lo establecido en el Artículo 162 (Fracciones I, II y III) y Artículo 175 (Fracciones I y II) del Reglamento General de Docencia de la UAA, mucho he de agradecerle autorizar a la persona antes citada inicie los trámites administrativos para que se le fije fecha de examen de grado.

Aprovecho este conducto para saludarlo cordialmente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 2 de Marzo del 2009.

"SE LUMEN PROFERRE"


DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ
Secretario Técnico-Maestría en Ciencias

c.c.p.- Archivo.



DEDICATORIA

Dedico este trabajo al gran amor de mi vida. Siento la mayor admiración y orgullo por mi marido porque jamás se rinde ante las adversidades de la vida y muestra un valor desmedido ante ella. Decidí luchar junto a él y pasar el resto de mis días a su lado.

Dedico también mi trabajo, a mi madre y a mi tía, personas a las que les agradezco con todo mi corazón la mujer que soy hoy y, que siempre me mostraron el gran amor y comprensión que sienten por mí.

A mi gran amiga Licha, le dedico mi trabajo porque es una mujer excepcional y con un gran corazón. Con todo mi cariño y gratitud, por tu apoyo y amistad en momentos difíciles, te dedico el fruto de mi trabajo.

Por último, dedico este trabajo a todas las personas que se proponen luchar por sus sueños porque con toda seguridad, convicción y fe sé que lograrán hacerlos realidad en el camino que elijan.

Lucha siempre por lo que más quieres.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco con mucho cariño, admiración y respeto a:

Dr. Fernando Jaramillo Juárez, por su infinita ayuda y las enseñanzas que me brindó, así como la dedicación que siempre mostró.

Dr. Francisco A. Posadas Del Río, por el gran apoyo que siempre me ofreció y por todos los conocimientos que compartió conmigo.

Dra. M^a Consolación Martínez Saldaña, por su ayuda y excelente profesionalismo.

Mis amigas, Cristina y Emilia, por su valiosa amistad, por su gran ayuda y compañía en las horas de trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	<i>Pág.</i>
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Plaguicidas	1
1.2. Problemática de la exposición a plaguicidas	2
1.3. Intoxicaciones agudas y crónicas	4
1.4. Participación del hígado en la homeostasis corporal	6
1.5. Coagulación sanguínea	7
1.6. Organofosforados	15
II. ANTECEDENTES	18
2.1. Malatión	18
2.1.1. Mecanismo de toxicidad	19
2.2. Aspectos toxicocinéticos	22
2.2.1. Paso de los xenobióticos a través de las membranas de las célula	23
2.2.2. Absorción de xenobióticos	25
2.2.3. Distribución de xenobióticos	26
2.2.4. Biotransformación y eliminación de xenobióticos	27
2.3. Aspectos toxicodinámicos	30
2.3.1. Alteraciones de organofosforados sobre el sistema nervioso	30
2.3.2. Alteraciones de organofosforados sobre la coagulación sanguínea	36
2.3.3. Alteraciones de Organofosforados sobre el hígado	36
2.4. Estrés oxidativo	37
2.4.1. Aspectos generales	37

2.4.2. Especies reactivas de oxígeno (ERO)	38
2.4.3. Peroxidación lipídica	40
2.4.4. Xenobióticos y producción de radicales libres	41
2.4.5. Participación del malatión en el estrés oxidativo (daño celular)	42
2.4.6. Mecanismos antioxidantes de las células (GSH)	42
2.4.7. Extracto de <i>ginkgo biloba</i>	44

III. JUSTIFICACIÓN	51
IV. HIPÓTESIS	52
V. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	53
VI. METODOLOGÍA	55
VII. RESULTADOS	63
Parámetros fisiológicos	63
Evaluación estructural	73
VIII. DISCUSIÓN	75
IX. CONCLUSIONES	88
X. BIBLIOGRAFÍA	89

RESUMEN

El malatión es un plaguicida organofosforado utilizado para destruir las plagas o mitigar sus efectos nocivos. En los humanos su ingreso al organismo es por las vías dérmica, respiratoria y digestiva. Se distribuye ampliamente en los tejidos corporales y es biotransformado fundamentalmente en el hígado generando un metabolito tóxico (malaoxon) que puede dañar la estructura y función de este órgano. La toxicidad producida por los plaguicidas organofosforados se debe principalmente a la inhibición de la acetilcolinesterasa, lo que produce acumulación de acetilcolina en las sinapsis colinérgicas. Otros de los efectos conocidos de los plaguicidas organofosforados es el daño que pueden producir sobre la coagulación sanguínea alterando el proceso de la hemostasia, ya que se modifica el tiempo de coagulación; además, en años recientes se ha encontrado que las manifestaciones tóxicas inducidas por estos plaguicidas pueden estar asociadas con un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. En este contexto, el extracto de hojas del *ginkgo biloba* (EGb) contiene flavonoides antioxidantes que podrían contrarrestar los efectos tóxicos del malatión.

El objetivo de este trabajo fue analizar el posible efecto protector del Ginkgo biloba (EGb) sobre el daño hepático y las alteraciones de la coagulación sanguínea, producidas por la exposición a dosis bajas del malatión. Para ello, ratas Wistar machos de 230 g fueron divididos en tres grupos: A) Controles, B) Tratados malatión y C) Tratados con malatión+EGb. El malatión se administró a dosis de 25 mg/kg/día disuelto en aceite de maíz durante 20 días, vía oral. Los animales del grupo C, además de recibir el malatión, se les administró EGb a una dosis de 4 mg/kg/3 veces semana/20 días, vía ip. Concluido el tratamiento, se obtuvo sangre de la arteria caudal de las ratas para cuantificar las actividades séricas de GOT y de GPT

(Schlebusch, et al., 1974), malondialdehído (Jentsch et al., 1996) y pruebas generales de coagulación de la sangre RP, TS, TPT, TP (Laposata et al., 1989). Posteriormente, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de hígado para cuantificar las concentraciones de glutatión reducido (GSH, Cohn y Lyle, 1966), ATP (Adams, 1963) y la actividad hepática de la transferasa de glutatión (GST, Habig, 1974). Los resultados obtenidos fueron analizados con las pruebas de ANOVA y de Tukey-Kramer.

Con relación a los valores medios de los animales controles: 1) el tiempo de protrombina aumentó 121% en animales tratados con malatión+EGb a los 5 días de tratamiento; 2) el tiempo parcial de tromboplastina aumentó 179% en las ratas que recibieron malatión+EGb a los 5 días de tratamiento; 3) el grupo de animales tratados con el insecticida malatión mostró una disminución en el porcentaje de actividad de los factores II y X, así como el grupo tratado con malatión+EGb; 4) las actividades séricas de GOT y GPT aumentaron 2324% y 1472%, respectivamente, en los animales tratados con malatión a los 10 días de tratamiento, mientras que en las ratas tratadas con malatión + EGb estos incrementos fueron de 220% para la GOT y 44% para GPT a los 10 días de tratamiento; 5) las concentraciones hepáticas de ATP de los animales tratados con malatión disminuyeron significativamente, 70.3%. El grupo de animales tratados con malatión+EGb mostró un aumento estadísticamente significativo en comparación con el grupo intoxicado con el malatión, 85%; 6) el tejido hepático de las ratas tratadas con malatión presentó hepatocitos con un aumento de acidofilia, el núcleo de los mismos disminuyó de tamaño y, además, se observó un aumento en el patrón de tinción en comparación de las células del grupo control y el tejido hepático de las ratas tratadas con malatión+EGb mostró que los hepatocitos no presentaban daño celular.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Plaguicidas.

Los plaguicidas son productos químicos diseñados para combatir a las plagas que afectan a los cultivos agrícolas y, algunos de ellos, cumplen una función importante en sanidad pública controlando enfermedades transmitidas por vectores, como el mosquito del paludismo (Waliszewki y Pardío, 1992). Al respecto, en las últimas décadas, la lucha contra las plagas que afectan a los cultivos agrícolas se ha basado esencialmente en el uso masivo de plaguicidas sintéticos. Por ello, los promedios mundiales de producción y consumo de plaguicidas han venido incrementándose de manera importante desde la década de 1940 (UNEP, 1987). Los principales agentes de intoxicación entre los plaguicidas son los insecticidas, los cuales químicamente se pueden clasificar en los siguientes grupos: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides (Lombera, 1994).

Es importante mencionar que el uso de plaguicidas en campañas de salud pública ha reducido la morbilidad y la mortalidad en humanos a causa de enfermedades transmitidas por diferentes vectores. Además, los plaguicidas han sido un factor importante en el incremento de la productividad agrícola en muchas partes del mundo. Sin embargo, el hecho de que estos productos químicos tengan un papel trascendental en el desarrollo económico mundial, no quiere decir que sean inocuos. Aún cuando se utilicen debidamente, los plaguicidas producen efectos secundarios inevitables. Su uso continuado y a gran escala puede ocasionar daños a corto y a largo plazo en la salud de la población expuesta, conduce a la aparición y proliferación de plagas resistentes; causa problemas ambientales tales como la contaminación de suelos y de aguas, favorece la extinción de insectos útiles, de aves y de otras especies y causa

contaminación de las cadenas alimentarias (Henao y Corey, 1991).

• **Usos de los plaguicidas.**

- Protección de los cultivos del ataque de plagas.
- Protección de la salud del hombre.
- Protección de la salud de animales domésticos.
- Mejorar las condiciones sanitarias en centros recreacionales.

• **Ventajas e Inconvenientes de su uso:**

Cuadro 1-1. Ventajas e inconvenientes del uso de plaguicidas.

Ventajas	Inconvenientes
Acción o efecto rápido	Desequilibrio biológico
Alta eficacia	Resurgencia
Acción independiente del medio	Aparición de nuevas plagas
Fácil aplicación	Desarrollo de resistencia
Amplia disponibilidad	Contaminación del ambiente
Buena rentabilidad	Presencia de residuos tóxicos en los alimentos

1.2. Problemática de la exposición a plaguicidas.

Los seres vivos se encuentran expuestos constantemente a una gran variedad de sustancias, de origen natural y/o antropogénico, presentes en el ambiente que, bajo ciertas circunstancias, pueden alterar la homeostasis del organismo. Tales circunstancias representan riesgos para la salud y están determinadas por dos factores principales: el potencial toxicológico de las sustancias mismas y su destino en el ambiente y en los organismos (Karam et al., 2004).

Es conveniente recordar que por definición todo plaguicida es una sustancia tóxica diseñada para interferir o modificar mecanismos fisiológicos fundamentales de los insectos, pero que también son compartidos por otros animales, incluido el ser humano, y que en determinadas circunstancias puede ocasionarle la muerte. El esquema cualitativo del uso de plaguicidas se ha modificado sustancialmente desde la Segunda Guerra Mundial. En un inicio, los insecticidas organoclorados tuvieron preferencia; más tarde fueron reemplazados por los organofosforados y los carbamatos, junto con los piretroides. Tales modificaciones y el interés otorgado a estas sustancias se deben a que los plaguicidas han sido un factor importante en el incremento de la productividad agrícola en muchas partes del mundo (Karam et al., 2004).

De las más de 70 mil sustancias químicas que se encuentran en el mercado, los plaguicidas sintéticos han ocupado un lugar destacado desde 1940 como la principal estrategia para el control de las plagas. El uso excesivo de plaguicidas en la agricultura y en el sector pecuario, la recolección de los productos sin esperar el intervalo de seguridad, la contaminación durante el almacenamiento, el transporte, la preparación de los alimentos, el ordeño y sacrificio del ganado sin cumplir con el tiempo mínimo recomendado desde la última aplicación, son factores que ocasionan una elevada contaminación con residuos de plaguicidas de los alimentos de origen vegetal y animal, lo cual puede repercutir de alguna manera en la salud de las poblaciones. Lo anterior ha ocasionado a menudo enormes pérdidas económicas, derivadas del rechazo por parte de las naciones desarrolladas a las exportaciones de alimentos que hacen los países en vía de desarrollo. Con frecuencia estos alimentos son rechazados por no cumplir con las normas sanitarias de comercio internacional en cuanto al contenido de residuos de ciertos plaguicidas, muchos de los cuales han sido paradójicamente cancelados o restringidos por los mismos países, pero exportados a los países en desarrollo (Karam et al., 2004).

Si bien el propósito del uso de plaguicidas es matar organismos no deseados, aquellos que dañan cultivos y transmiten enfermedades a los animales y al ser humano, otros seres vivos, incluyendo el ser humano, tienen funciones fisiológicas o bioquímicas similares a las de especies que interesa eliminar y, por lo tanto, son susceptibles, en diversos grados, a los efectos tóxicos de los plaguicidas. Teniendo en cuenta los millones de kilogramos de ingredientes activos que anualmente son usados, su toxicidad aguda, subaguda y a largo plazo, la forma como se producen, transportan, almacenan y aplican, estas sustancias se han convertido en un gran problema de salud pública (Karam et al., 2004).

Cabe mencionar, que los niveles de morbi-mortalidad por intoxicaciones que se presentan en una comunidad no son sólo el reflejo de una relación simple entre el agente y la persona expuesta; esos niveles reflejan, además, el efecto y la interacción de numerosos factores, tales como el tiempo de exposición, susceptibilidad de los individuos, estado nutricional de la población afectada, condiciones de la exposición y factores educacionales, culturales, sociales y económicos (Karam et al., 2004).

La contaminación del hombre por los plaguicidas se presenta de forma directa o indirecta. La primera es consecuencia de la exposición de los trabajadores de las industrias que sintetizan estos compuestos o del manejo de esas sustancias por las personas que las aplican (agricultores, jardineros, fumigadores y operadores de campañas de salud pública). La forma indirecta resulta de la exposición de la población a los plaguicidas por diferentes circunstancias: accidentes, contaminación del medio ambiente y de alimentos, aplicaciones indiscriminadas de plaguicidas, etc. (Almeida, 1986).

1.3. Intoxicaciones agudas y crónicas.

Se pueden distinguir dos tipos de intoxicaciones: la aguda y la crónica. Existe una necesidad práctica de distinguir una de la otra, ya que la situación clínica de la intoxicación aguda causada por cierta sustancia, no es

necesariamente igual que la de una intoxicación crónica causada por la misma sustancia (Niesink et al., 1996).

Intoxicación aguda

Se caracteriza por la exposición de un individuo a dosis altas de una sustancia en tiempos cortos. Esto puede ocurrir, por ejemplo, después de ingerir cantidades excesivas de fármacos, productos caseros (agentes de limpieza) o pesticidas, así como luego de accidentes como fugas de gas o incendios. Los síntomas aparecen por lo general poco después de la exposición y usualmente son severos. Según sea el caso, el paciente requiere de atención médica inmediata. Dentro del término “intoxicación aguda” es necesario hacer distinción entre la intoxicación accidental (el grupo más afectado suele ser el de los niños) y la autointoxicación (deliberada o suicidio) o con fines homicidas.

Respecto a la toxicidad subaguda, se debe señalar que algunos compuestos organofosforados producen efectos neuropáticos retardados en los seres humanos, de 3 a 4 semanas después de una intoxicación aguda (Doherty, 2006). Los primeros síntomas son sensoriales (sensación de hormigueo y quemadura) y luego aparecen debilidad y ataxia en miembros inferiores, pudiendo progresar a parálisis acentuada y, en casos graves, comprometer los miembros superiores. La recuperación es lenta en los adultos, aunque los niños presentan un cuadro clínico menos grave (UNEP, 1987). Con relación a la coagulación de la sangre, ha sido reportado que en los trabajadores expuestos a insecticidas organofosforados aparecen tiempos de protrombina prolongados (Holmes, 1956; Murray, 1994); además, la exposición de ratas al diazinón o al malatión altera el proceso de la hemostasia, ya que se modifica el tiempo de coagulación (Lox, 1983 y 1985).

Intoxicación crónica

Un individuo puede sufrir intoxicación crónica después de repetidas

exposiciones a cantidades pequeñas de una sustancia. La duración de la exposición puede variar de unos pocos días a muchos años; el nivel de exposición en la intoxicación crónica es más bajo que en la aguda. Por lo general, los síntomas se desarrollan de manera gradual. Esto sucede, por ejemplo, en el ambiente laboral (exposición ocupacional).

Con relación a la toxicidad crónica producida por los plaguicidas se ha encontrado que la frecuencia de aberraciones cromosómicas aumenta significativamente en los trabajadores agrícolas expuestos de manera prolongada a estas sustancias. Así, en un estudio realizado con 61 trabajadores de campos de algodón que rociaban regularmente compuestos como el DDT, BCH, endosulfán, malatión, metil-paratión, fosfamidón, dimetoate y cipermetrina, se encontraron datos significativos relacionados con alteraciones en los cromosomas de los linfocitos periféricos (Lombera, 1994).

1.4. Participación del hígado en la homeostasis corporal.

El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano. Se encuentra ubicado en la porción superior de la cavidad abdominal, justo por debajo del diafragma y cubierto en su mayor parte por las costillas. Ocupa la totalidad del hipocondrio derecho y se extiende cruzando al epigastrio hasta el hipocondrio izquierdo. En el sujeto sano tiene un color marrón rojizo y es muy blando y delicado.

Clásicamente, el hígado se ha dividido en lobulillos hexagonales de 1 a 2 mm de diámetro orientados alrededor de las porciones terminales de la vena hepática (vénuclas hepáticas terminales o venas centrales); además cuentan con un sistema biliar para el transporte de sustancias secretadas por los hepatocitos. El modelo del lóbulo hexagonal describe la relación entre hepatocitos, sistema vascular y biliar. El lóbulo se divide en zona periportal, zona media y zona centrilobular, que rodea a la vénula hepática terminal.

La unidad funcional del hígado se denomina *acino hepático*. Se trata

de una masa parenquimatosa irregular en forma y talla, organizada alrededor de un eje: la triada portal, vasos linfáticos y nervios. El acino se encuentra entre dos o más vénulas hepáticas terminales cuyos ejes vasculares y biliares se intercomunican. No existe separación física entre dos acinos. El parénquima del acino hepático se divide en tres zonas, siendo la zona 1 la más cercana al aporte sanguíneo, la zona 3 colindante con la vénula hepática terminal y la zona 2 intermedia. Esta división es metabólicamente importante debido a la existencia de un gradiente lobulillar de actividad para muchas enzimas hepáticas.

El hígado se encarga de mantener la homeostasis metabólica del organismo. Esto abarca el procesamiento de aminoácidos, carbohidratos, lípidos y vitaminas de la dieta; la fagocitosis de materiales fragmentados en la circulación esplénica; la síntesis de proteínas séricas; la biotransformación de metabolitos circulantes y la detoxificación y excreción hacia la bilis de productos de desecho endógenos y contaminantes xenobióticos. Los trastornos hepáticos, por consiguiente, tienen consecuencias de gran alcance (Cotran et al., 1999, Guengerich, 2005; Oakley, 2005).

1.5. Coagulación sanguínea.

La sangre constituye el principal sistema de transporte del organismo, de modo que todas las funciones que se le atribuyen son enteramente dependientes de su circulación, lo que significa que estas funciones están estrechamente relacionadas con el sistema circulatorio. Debido a la función de transporte que tiene la sangre, participa de forma directa o indirecta en todas las funciones del cuerpo, entre ellas encontramos:

a) Función respiratoria.

La sangre transporta los gases respiratorios, oxígeno y dióxido de carbono entre los capilares de la circulación pulmonar y los tejidos corporales.

b) Función nutritiva.

La sangre transporta los nutrientes necesarios para la vida celular que obtiene del aparato digestivo y cede al líquido intersticial.

c) Función excretora.

La sangre transporta las sustancias de desecho metabólico que deben ser eliminadas del organismo hacia los órganos de excreción.

d) Función inmunitaria.

La sangre transporta los anticuerpos que forman parte del sistema de defensa del organismo contra la invasión de agentes extraños.

e) Función de correlación humoral.

La sangre transporta hormonas

f) Función de regulación térmica.

Por la rápida circulación de la sangre, distribuye el calor y tiende a igualar las temperaturas de las distintas partes del cuerpo.

g) Función amortiguadora de pH.

La sangre posee importantes sistemas amortiguadores del pH que contribuyen a mantener constante la concentración de hidrogeniones en los líquidos corporales.

1.5.1. Composición de la sangre.

La sangre se compone de un líquido denominado **plasma** y de elementos celulares, entre los cuales se encuentran leucocitos, plaquetas y eritrocitos.

Un adulto normal posee aproximadamente 6 litros de este líquido vital, el cual representa de 7-8% del peso corporal total.

- **Plasma:** constituye casi un 55% del volumen sanguíneo
- **Eritrocitos:** constituye el 45%. Contienen una proteína vital, denominada hemoglobina, la cual se encarga del transporte de oxígeno y dióxido de carbono entre los pulmones y los tejidos corporales.
- **Leucocitos y trombocitos:** 1%

El componente más importante del plasma es el agua, la cual contiene iones disueltos (calcio, sodio potasio, cloro, magnesio e hidrógeno), proteínas, carbohidratos, grasas, hormonas, vitaminas y enzimas. La proteína principal que constituye el plasma es la albúmina, la cual es el componente más importante para conservar la presión osmótica.

Glóbulos Rojos o Hematíes.

Son las células sanguíneas más numerosas y la hemoglobina que contienen es la responsable de su color rojo. Se forman en la médula ósea, que se halla dentro de los huesos del esqueleto, desde donde son liberados hacia el torrente sanguíneo. Su función es transportar el oxígeno desde los pulmones a los diferentes tejidos del cuerpo para que las células respiren, y también eliminan los residuos producidos por el metabolismo celular (anhídrido carbónico).

Glóbulos Blancos o Leucocitos.

Son los encargados de proteger al organismo contra los diferentes tipos de microbios. Cuando hay una infección aumentan su número para mejorar las defensas. Unos se forman en la médula ósea y otros en el sistema linfático

(bazo, ganglios, etc).

Plaquetas.

Son las células sanguíneas más pequeñas. Se producen también en la médula ósea y su vida media es de 6-7 días. Las plaquetas intervienen cuando se produce una lesión en alguno de los vasos sanguíneos. Se adhieren rápidamente al lugar de ruptura para que cese la hemorragia, dando tiempo a la formación del coágulo definitivo.

El Plasma.

Es un líquido compuesto de agua, proteínas, sales minerales y otras sustancias necesarias para el funcionamiento normal del organismo y en donde se encuentran "nadando" las células sanguíneas. Entre las sustancias de importancia que transporta el plasma están las siguientes.

- **Albúmina:** es una proteína que ayuda a mantener el agua del plasma en una proporción equilibrada.
- **Las Globulinas:** son los anticuerpos encargados de la defensa de nuestro organismo frente a las infecciones. Su disminución acarreará una bajada de defensas.
- **Factores de Coagulación:** son proteínas imprescindibles para evitar las hemorragias. La ausencia de algún factor de coagulación puede ocasionar trastornos hemorrágicos ya que se dificulta la formación del coágulo.
- **Otras proteínas:** transportan sustancias necesarias para el funcionamiento normal de las células (grasas, azúcares, etc...).

1.5.2. Coagulación sanguínea.

La coagulación es el conjunto de reacciones que conducen a la formación de

fibrina, proteína insoluble que evita la pérdida de sangre cuando se lesiona un vaso. Según su función, estas reacciones se pueden clasificar en: a) *procoagulantes*, que conducen a la formación de la fibrina, evitando la pérdida de sangre; b) *anticoagulantes*, que regulan o controlan la coagulación e impiden que los factores activados generados en el punto de hemorragia extiendan su acción y se produzca una coagulación generalizada, y c) *fibrinolíticas*, que son las encargadas de eliminar la fibrina cuando ya no es necesaria para evitar la pérdida de sangre, restableciendo el flujo sanguíneo.

Cuando en el organismo se produce una lesión capaz de producir una hemorragia, el sistema de la hemostasia se encarga de reparar las alteraciones producidas. Inicialmente la formación de un tapón o trombo plaquetario es parte fundamental de la hemostasia primaria, que proporcionan de manera provisional un sustrato anatómico capaz de detener la hemorragia tras el daño sufrido. Su formación depende en gran parte de las plaquetas, del endotelio vascular y de la interacción de las células sanguíneas con la pared vascular. Por tanto, el correcto desarrollo de todas las etapas hasta su formación está en función de la integridad y buen funcionamiento de todos sus componentes. Se produce hemostasia secundaria cuando las proteínas plasmáticas solubles, llamadas factores de coagulación, interactúan en una serie de reacciones enzimáticas complejas para convertir a la proteína soluble fibrinógeno en fibrina insoluble. Las reacciones se realizan a manera de cascada, mediante las cuales los factores de coagulación inactivos y circulantes (zimógenos) se transforman en enzimas activas mediante un proceso de activación secuencial. En la Figura 1-1 se muestra un esquema que muestra las dos vías de la coagulación sanguínea:

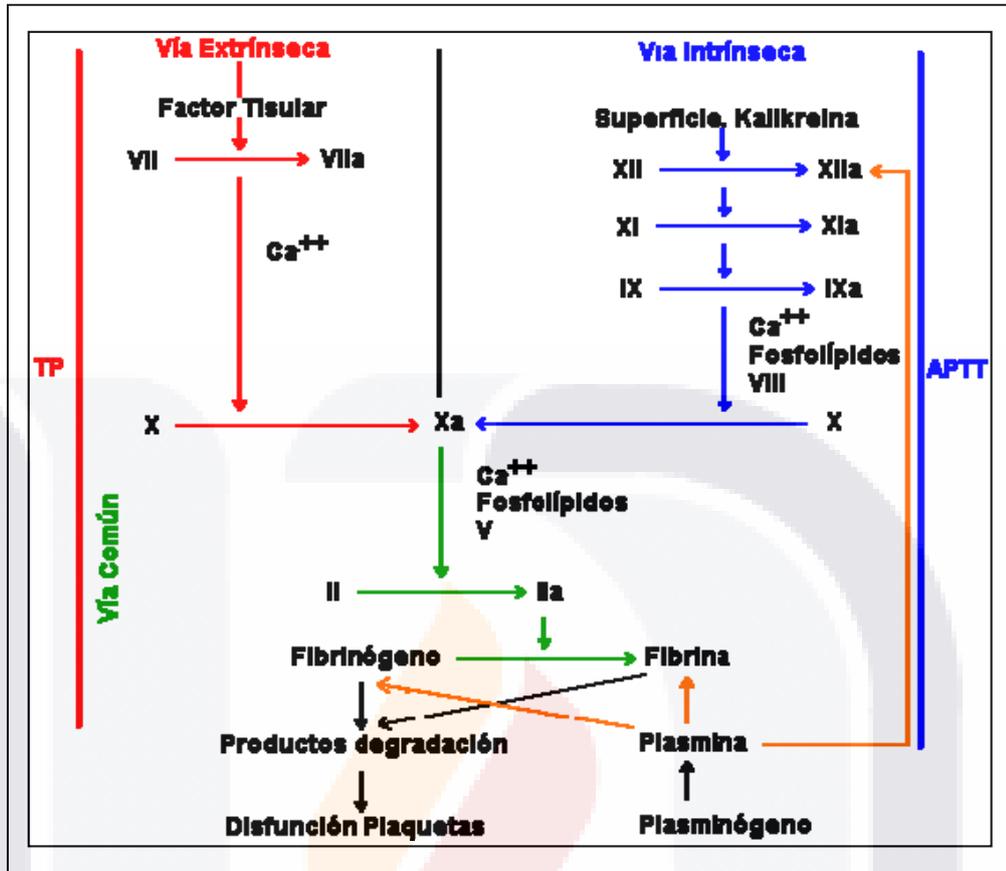


Figura 1-1. Vías de la coagulación sanguínea

1.5.2.1. Factores de la Coagulación.

Los factores de la coagulación se han designado con números romanos del I al XIII, de acuerdo con el orden de su descubrimiento y no de la secuencia en la cascada de reacción. Cuando un factor se activa, tiene actividad enzimática y la letra “a” acompaña al número romano de la designación (por ejemplo, el factor X activado es el factor X_a).

Los factores de la coagulación fueron descubiertos cuando los pacientes con larga historia de problemas hemorrágicos fueron atendidos médicamente. Los estudios de la sangre de los pacientes afectados revelaron que ciertas proteínas eran funcionalmente deficientes. La mayor parte de estas proteínas han sido aisladas y caracterizadas en lo referente a

su composición y función bioquímica.

Los factores de la coagulación son sintetizados en el hígado. En la enfermedad hepática grave estas proteínas pueden estar notablemente disminuidas y originar diátesis hemorrágica. Los factores de coagulación se pueden dividir en tres grupos según sus propiedades físicas: grupo de la protrombina, grupo del fibrinógeno y grupo de contacto.

a) Grupo de protrombina.

El grupo de la protrombina incluye a los factores II, V, VII y X. Estos factores tienen una masa molecular que se extiende de 50000 a 100000 Unidades Dalton y migran en la electroforesis con las globulinas alfa o beta. Son necesarios iones de calcio para el enlace de los factores de la protrombina a una superficie fosfolipídica ácida en la cual se produce la activación de la enzima.

La vitamina K desempeña una función importante en la síntesis de los factores funcionales de este grupo. Por tanto, los factores del grupo protrombina también se conocen como factores dependientes de la vitamina K, la cual se encuentra en algunos aceites vegetales y en plantas de hojas verdes, y también se sintetiza en el intestino por la acción de varias bacterias. Esta vitamina liposoluble sólo se absorbe en vías gastrointestinales en presencia de sales biliares. Por tanto, en ausencia de vitamina K disminuye la actividad sérica de estos factores.

b) Grupo del fibrinógeno.

El grupo del fibrinógeno incluye a los factores I, V, VIII y XIII. Este grupo de factores también se conoce como el grupo consumible ya que se consumen durante la formación de la fibrina y por tanto, están ausentes en el suero. Los factores I, V y XIII tienen masas moleculares de 300000 a 340000 daltones.

El factor VIII es un complejo macromolecular con una masa de aproximadamente 1200000 daltones. El grupo del fibrinógeno migra con las globulinas alfa o beta en la electroforesis.

c) Grupo de contacto.

El grupo de contacto incluye a los factores XI, XII, así como a las proteínas del plasma, precalicreína, y a los cininógenos de alto peso molecular. Estos factores están implicados en la activación inicial de la vía intrínseca de la coagulación y requieren del contacto con una superficie cargada negativamente para su actividad. Con excepción del factor XI, los factores de contacto no parecen desempeñar una función esencial en la hemostasia *in vivo*. Este grupo de factores está vinculado con otros sistemas biológicos, los cuales incluyen a los sistemas fibrinolítico, de la cinina y del complemento.

En el cuadro 1-2 se presenta la clasificación de las proteínas de la coagulación sanguínea:

Proteínas de la Coagulación	Forma Activa
I-fibrinógeno	Sustrato
II-Protrombina	Proteasa de serina
Factor tisular (FT) III-tromboplastina	Cofactor
IV-Ca	Ca ionizado
V-proacelerina	Cofactor
VII-proconvertina	Proteasa de serina
VIII-antihemofílico	Cofactor
IX-componente de la tromboplastina plasmática	Proteasa de serina
X-factor de Stuart	Proteasa de serina
XI-antecedente de tromboplastina plasmática	Proteasa de serina
XII-factor de Hageman	Proteasa de serina
XIII-Factor estabilizador de la fibrina	Transglutaminasa
Precalicroína	Proteasa de serina
Cininógeno de alto peso molecular (APM)	Proteasa de serina

Cuadro 1-2. Clasificación de las proteínas de la coagulación (Anderson C, 1995).

1.6. Organofosforados.

Antes de la Segunda Guerra Mundial, sólo se conocían en general los agentes anti-colinesterásicos “reversibles”, cuyo ejemplo más sobresaliente es la fisostigmina. Poco antes de la Segunda Guerra Mundial, y durante la misma, Schrader de I.G. Farbenindustrie, desarrolló una clase relativamente nueva de productos químicos muy tóxicos, los organofosforados, primero como insecticidas agrícolas y más tarde como agentes potenciales de la

guerra química. La toxicidad extrema de estos compuestos se debe a la inactivación “irreversible” de la enzima acetilcolinesterasa, lo que dio como resultado actividad inhibidora duradera (Jaramillo, 2006).

Los plaguicidas organofosforados constituyen un amplísimo grupo de compuestos de síntesis, en general altamente tóxicos, con un precedente en los gases de guerra, a menudo conocidos bajo el apelativo de ‘gases nerviosos’, entre los que se encuentran el sarin, tabun y soman, y que se desarrollaron de manera especial a partir de la Segunda Guerra Mundial. Las propiedades de estos compuestos como insecticidas fueron el motivo de investigación de síntesis químicas y para el año de 1959 se produjeron alrededor de 50.000 moléculas, las cuales actualmente forman parte de muchos formulados comerciales como ingredientes activos, solos o combinados, para obtener una mayor eficacia (Carod, 2002).

En general, se trata de compuestos marcadamente apolares, lo que significa que desde el punto de vista químico la mayoría son escasamente solubles en agua, aunque con grandes diferencias de un compuesto a otro, y desde el punto de vista biológico tienden a disolverse en grasas. Por tal motivo, la piel, donde se encuentra una importante capa de tejido con elevado contenido en lípidos, puede constituirse en una importante vía de entrada. La estabilidad de los organofosforados depende del pH del medio; a pH fuertemente alcalino se descomponen, lo que puede ser utilizado para destruirlos (Carod, 2002).

Vías de exposición: en el ámbito laboral, la exposición puede tener lugar por las tres vías clásicas: **digestiva, inhalatoria y dérmica**. La vía digestiva directa se suele considerar como accidental (ingestión de una solución por error o con fines suicidas, o de alimentos contaminados). Deberá, por tanto, evitarse en todo momento el contacto de alimentos (y su almacenamiento) con tales productos, así como comer, beber o fumar

durante su manipulación o sin lavarse previamente las manos y la cara. La vida media de los organofosforados y sus productos es relativamente corta (de horas a días). Se biotransforman mediante enzimas oxidasas, hidrolasas y transferasas, principalmente hepáticas. Se eliminan por la orina y en menor cantidad por heces y aire expelido. El primer efecto bioquímico asociado con la toxicidad de los organofosforados es la inhibición de la acetilcolinesterasa (Carod, 2002).

Los compuestos organofosforados cruzan la placenta y se acumulan en los tejidos fetales. Al respecto, se ha descrito que estos compuestos disminuyen la actividad de la acetilcolinesterasa de la corteza cerebral de embriones obtenidos de ratas tratadas con diisopropilfosfofluoridato (DFP), paratión etílico y metilparatión (Fish, 1966). Además, también se ha reportado una disminución en la actividad de la ATPasa de magnesio de la corteza renal en ratas que estuvieron en contacto con el paratión etílico, durante su vida intrauterina, sin que existan cambios en las actividades de otras enzimas, como las carboxilesterasas y las transferasas de glutatión (Jaramillo Juárez et al, 1989).

II. ANTECEDENTES

2.1. MALATIÓN.

El malatión es un plaguicida organofosforado cuyo nombre químico es dietil (dimetoxitiofosforiltio) succinato o S-1,2-bis(etoxicarbonil)etil O,O-dimetil fosforoditioato.

Es muy soluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Puede ser absorbido por las vías oral, respiratoria y dérmica. La dosis letal cincuenta por vía oral en ratas macho adultas es de 1375 mg/kg (Repetto, 1995). La participación de este plaguicida en el estrés oxidativo y el daño celular ha sido reportada por algunos autores. En efecto, Akhgari y colaboradores (2003) señalan que la exposición subcrónica de ratas Wistar al malatión (100-1500 ppm), durante cuatro semanas, aumenta las actividades de la catalasa y de la superóxido dismutasa, así como la concentración de malondialdehído en el hígado y en los eritrocitos. También se ha reportado que en ratas Wistar machos expuestos a dosis crecientes de malatión (25-150 mg/Kg), durante 28 días, se genera daño oxidativo en el sistema nervioso central al término del tratamiento (Fortunato et al, 2006). En el cuadro 2-1 se describen las propiedades fisicoquímicas del malatión.

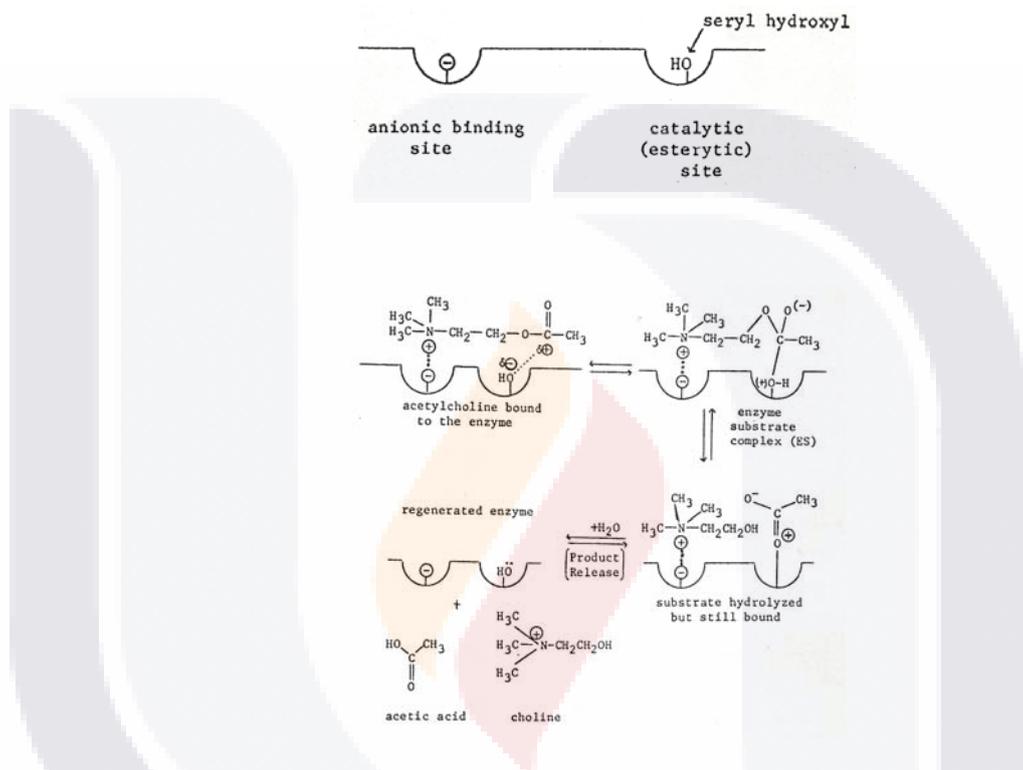
COMPOSICIÓN	GRADO TÉCNICO 95% PUREZA
Peso molecular	330.3
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂
Estado físico	Grado técnico es un líquido claro
Punto de ebullición	156-157 °C/0.7 mmHg
Presión de vapor	5.3 mPa (30 °C)
Densidad	1.23 unidades (25 °C)
Coefficiente de partición	^{de} LogP = 2.75
Solubilidad	Más soluble en solventes orgánicos, alcoholes, ésteres, cetonas, éteres, hidrocarburos aromáticos. Poco soluble en éter de petróleo y algunos tipos de aceite mineral.

Cuadro 2-1. Propiedades fisicoquímicas del malatión.

2.1.1. Mecanismo de toxicidad.

Los insecticidas organofosforados inhiben a la enzima acetilcolinesterasa (AChE), una esterasa que contiene en su centro activo un residuo de serina (Ser), además de histidina (His) y glutamato (Glu), aminoácidos que cooperan en la catálisis para hidrolizar la acetilcolina. El enlace-H tiene lugar entre el grupo carboxilato del Glu y el N-1 del anillo imidazol de la His, fomentando la capacidad del N-3 de la His para actuar como una base y extraer el H del grupo hidroxilo de la Ser. Esta cooperación hace que el oxígeno de la Ser sea un nucleófilo más fuerte que ataca fácilmente al carbono del grupo carbonilo de la acetilcolina. Esta reacción produce la formación de un intermediario tetrahédrico que probablemente es estabilizado por el enlace-H en un "hueco oxianión" (Fig 2-1). Este enlace más estable del intermediario tetrahédrico que el de la acetilcolina en sí, con el centro activo de la enzima, es la razón principal por la que el AChE es

capaz de catalizar esta reacción. La destrucción del intermediario tetrahédrico y la liberación de la colina dejan atrás la acil enzima. La acil enzima es atacada por una molécula de agua dando lugar a la liberación del acetato (p.e. por hidrólisis) y la regeneración del centro activo Ser que queda ahora listo para otro ciclo catalítico.



Resumiendo, los insecticidas organofosforados (p.e. paration y malation) actúan inhibiendo la actividad de la AChE. Lo hacen actuando como pseudosustratos y formando un compuesto covalente con el centro activo (Ser). Esto tiene como resultado la acumulación de la acetilcolina en las sinápsis colinérgicas sobreestimulando los receptores de la acetilcolina (muscarínicos y nicotínicos) y produciendo finalmente la muerte por fallo respiratorio. El paratión y el malatión se convierten en inhibidores de la AChE mucho más potentes después de ser oxidados en una reacción catalizada por las monooxigenasas del citocromo P450 (Figura 2-2). Es más, la

sensibilidad de un organismo a los compuestos organofosforados se ve ampliamente determinada por las proporciones relativas de transformación oxidativa y la conversión hidrolítica hacia especies menos tóxicas. Se cree que el metabolismo diferencial es la base de una menor sensibilidad de los mamíferos al malatión. El metabolismo oxidativo sustituye al azufre por el oxígeno que es más electronegativo. Esto aumenta la carga positiva sobre el átomo de fósforo y lo hace más reactivo hacia la Ser de la AChE. Es más, la velocidad de hidrólisis de la enzima fosforilada es generalmente tan lento que probablemente la AChE será degradada y sustituida por una enzima nueva sintetizada antes de que tenga lugar la liberación del fosfato. La sustitución de la AChE puede darse con un tiempo de vida medio de 10-30 días por lo que exposiciones repetidas a dosis subtóxicas de organofosfatos puede producir una respuesta acumulativa.

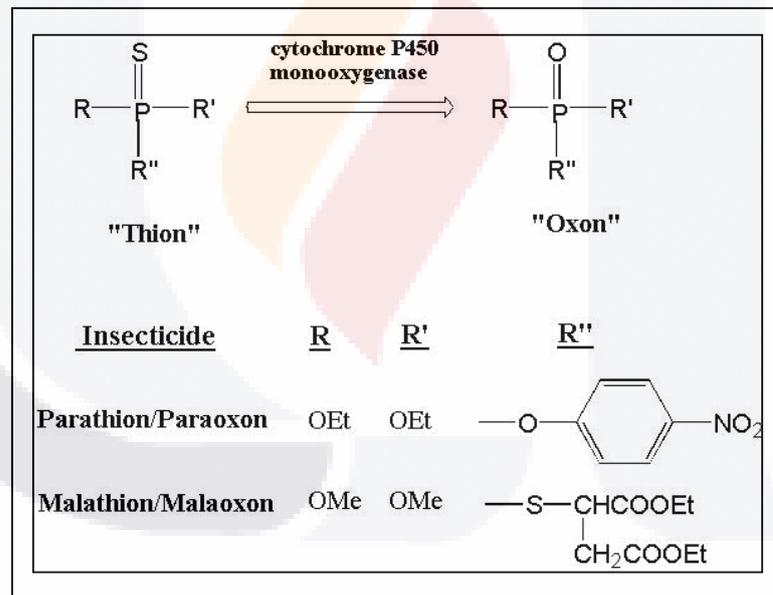


Figura 2-2. Conversión del Malatión y Paratión en oxianiones.

En general, la toxicidad de la forma "tiono" es inferior a la de la forma "oxo", como se expresa en el cuadro 2-2:

LD-50 oral aguda en mg/Kg		
	Forma "oxo"	Forma "tiono"
Pyraoxon-Pyrazotion	4.0	36.0
Acetoxon-Acetotion	214.0	1280.0
Paraoxon-Paration	3.0	6.4
Malaoxon-Malation	87.0	1200.0

Cuadro 2-2. Dosis letales medias de plaguicidas organofosforados.

Entendemos como forma "oxo" cuando existe el enlace P=O y "tiono" la que corresponde al enlace P=S (Barberá C., 1989).

2.2. Aspectos toxicocinéticos.

El problema de la exposición de los seres vivos a los xenobióticos aumentó con el inicio de la Revolución Industrial y los avances de la química, que permitieron la síntesis de un gran número de compuestos. Por fortuna, los mamíferos se protegen de las acciones nocivas de los xenobióticos por diversos mecanismos, entre ellos, la modificación enzimática de la estructura de esas sustancias, su neutralización y los procesos de excreción. Sin embargo, cuando se rebasa la capacidad protectora de estos mecanismos aparecen los efectos adversos de los xenobióticos. De esta manera, la magnitud del efecto tóxico de una sustancia química depende de la cantidad que ingresa en el organismo; este fenómeno se relaciona con la concentración que alcanza la sustancia en su sitio de acción. Para ello, los agentes tóxicos deben cruzar una o varias barreras biológicas que permiten el paso de algunas sustancias y bloquean o disminuyen el acceso de otras. Actualmente se sabe que la concentración y la persistencia de los xenobióticos en un órgano blanco y en otros tejidos, dependen de las características toxicocinéticas de estas sustancias. La toxicocinética analiza

los procesos de absorción, distribución, biotransformación y eliminación de los xenobióticos. En la Figura 2-3 se describen las fases de la acción tóxica de los xenobióticos (Jaramillo y Acevedo, 2006).

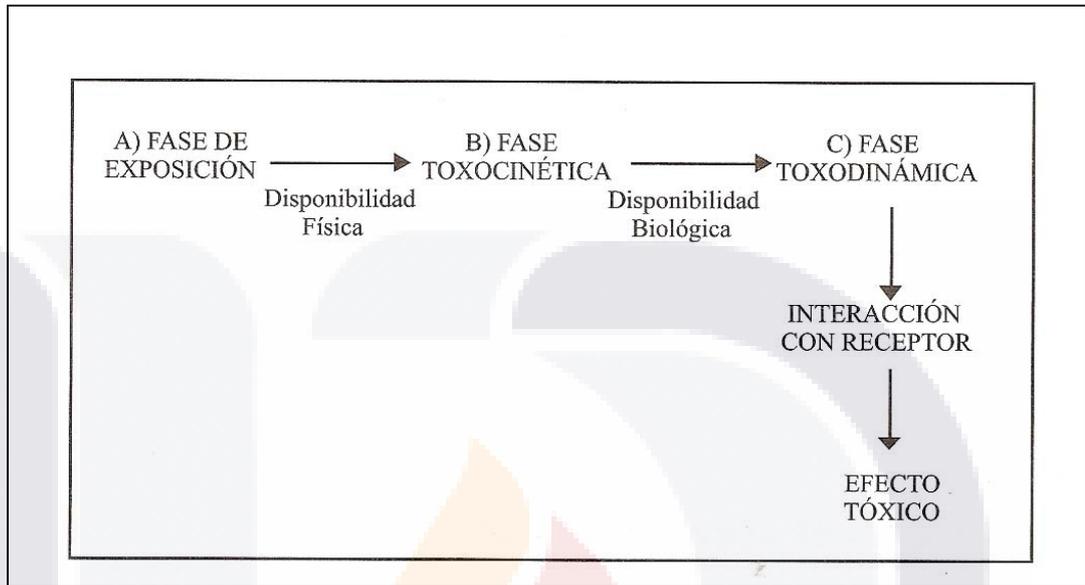


Figura 2-3. Fases de la acción tóxica de los xenobióticos.

- A) Fase de exposición: involucra el conjunto de factores que favorecen el ingreso de los agentes tóxicos en el organismo.
- B) Fase toxicocinética: analiza los procesos involucrados desde el ingreso de las sustancias tóxicas hasta su eliminación.
- C) Fase toxicodinámica: estudia las interacciones entre las moléculas de los toxones y los receptores celulares, por las cuales se induce el efecto tóxico.

2.2.1. Paso de los xenobióticos a través de las membranas de las células.

Los agentes tóxicos de acción sistémica deben cruzar varias barreras biológicas para ingresar al organismo. Estas barreras son estructuras relativamente gruesas, como la piel, o muy delgadas, como las membranas de los pulmones. Además, para ejercer sus acciones nocivas, los toxones

deben trasladarse hasta los tejidos en donde van a actuar, cruzando para ello un gran número de células que funcionan como barreras que se oponen a su movimiento. Es decir, las membranas de las células actúan como barreras de permeabilidad selectiva permitiendo que algunos xenobióticos pasen con facilidad, otros con dificultad e impidiendo el paso de algunos de ellos. La selectividad en el paso de las sustancias químicas a través de las membranas celulares es consecuencia de las propiedades fisicoquímicas y de la configuración estructural tanto de los componentes de las membranas como de los xenobióticos (Jaramillo y Acevedo, 2006).

Experimentalmente, se ha encontrado que las membranas de las células presentan una composición semejante. En efecto, los estudios bioquímicos y morfológicos señalan que estas membranas están constituidas por fosfolípidos y proteínas. Los fosfolípidos forman una bicapa de ácidos grasos con los grupos polares (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina) orientados hacia las superficies externas e internas de las membranas, mientras que sus cadenas hidrocarbonadas se localizan en la parte interna constituyendo la región no polar. Los lípidos de la membrana son casi líquidos a temperaturas fisiológicas debido a la estructura y a la abundancia relativa de ácidos grasos no saturados, lo que facilita el paso transmembranal de las sustancias liposolubles. A su vez, las proteínas se insertan en los lípidos y algunas las cruzan permitiendo la formación de poros. Muchas de las proteínas que cruzan las membranas son estructuras que acarrean sustancias a través de las mismas, por transporte activo o facilitado. La naturaleza anfipática de la membrana dificulta la libre difusión de los compuestos polares. Los mecanismos que permiten el paso de los xenobióticos a través de las membranas de las células son los mismos que transportan cualquier sustancia en estas barreras biológicas. La difusión simple y el transporte activo son los sistemas de transporte utilizados con mayor frecuencia por los xenobióticos para cruzar estas membranas (Jaramillo y Acevedo, 2006).

2.2.2. Absorción de xenobióticos.

La piel, los pulmones y el tubo digestivo son las principales barreras que separan a los mamíferos de un ambiente contaminado por las sustancias químicas. Por ello, para que una sustancia llegue a su sitio de acción requiere primeramente ser absorbida, es decir, el xenobiótico debe cruzar diversas membranas celulares para alcanzar el torrente sanguíneo y luego ser distribuido por este fluido en los tejidos corporales hasta alcanzar su sitio de acción. Por lo tanto, la absorción de un xenobiótico se define como el paso de una sustancia desde el sitio en que entra en contacto con el organismo hasta que alcanza la sangre (Jaramillo y Acevedo, 2006).

Es importante mencionar que durante este proceso, el xenobiótico absorbido es retirado constantemente por la sangre y transportado hacia los tejidos corporales, por lo que no llega a alcanzarse un equilibrio de difusión y el proceso continúa hasta que la absorción es completa (Jaramillo y Acevedo, 2006).

La velocidad de absorción de los xenobióticos depende de los siguientes factores:

- a) propiedades fisicoquímicas de la sustancia (peso molecular, coeficiente de participación lípido/agua, naturaleza ácida o alcalina y grado de ionización);
- b) características del sitio de la absorción (superficie y espesor de las membranas, flujo sanguíneo regional y, cuando la sustancia es absorbida en el tracto gastrointestinal, pH del medio y motilidad del tubo digestivo).

Cuando los xenobióticos son ingeridos por vía oral (contaminación de alimentos y agua, etc.), la absorción se lleva a cabo en los diferentes trayectos del tracto gastrointestinal, aunque las propiedades fisicoquímicas de las sustancias determinan si se absorben en el medio fuertemente ácido del estómago o en el medio casi neutro del intestino. Además, la absorción

intestinal es favorecida por la enorme superficie de las vellosidades intestinales y por la gran irrigación sanguínea (Jaramillo y Acevedo, 2006).

Resumiendo, los factores que rigen la absorción de los xenobióticos en la luz del tracto gastrointestinal son los mismos que rigen el paso de estas sustancias a través de las membranas celulares. Es decir, la absorción rápida se favorece por la baja ionización del compuesto, por el valor alto del coeficiente de partición lípido/agua de las formas no ionizadas y por el pequeño radio atómico o molecular de las sustancias hidrosolubles (Jaramillo y Acevedo, 2006).

2.2.3. Distribución de xenobióticos.

Luego de entrar en la sangre, mediante el proceso de absorción o la administración intravenosa, los xenobióticos son distribuidos en los diferentes tejidos corporales, lo que les permite llegar a su sitio de acción. De manera semejante a la absorción, el proceso de distribución está determinado por las características propias de las sustancias químicas y del organismo. Estas características condicionan el acceso de los xenobióticos hasta el sitio donde van a ejercer su acción. Por ello, cuando cambia alguno o algunos de estos factores se modifican también la amplitud del proceso de distribución, lo que a su vez modifica la magnitud del efecto biológico.

Factores involucrados en el proceso de distribución.

En el organismo de los mamíferos hay tres compartimentos acuosos en donde los xenobióticos se pueden distribuir: plasma sanguíneo, líquido extracelular y líquido intracelular. La distribución de las sustancias químicas en estos compartimentos generalmente no es uniforme. La amplitud del proceso de distribución se rige por la capacidad de los xenobióticos para cruzar las membranas de las células que separan a estos compartimentos.

El volumen de distribución de los xenobióticos se regula por los siguientes factores que rigen su libre difusión transcelular:

- Coeficiente de partición lípido/agua.
- Grado de ionización (pK_a).
- Fijación de los xenobióticos a las proteínas plasmáticas y tisulares.
- Barrera placentaria y hematoencefálica.
- Flujo sanguíneo regional y permeabilidad capilar.

El conocimiento de estos factores es importante, ya que de su interrelación depende la concentración del xenobiótico en su sitio de acción y de ésta, la magnitud del efecto tóxico.

2.2.4. Biotransformación y eliminación de xenobióticos.

Los humanos y los animales están expuestos continuamente en su ambiente a una gran variedad de xenobióticos. Muchos de estos compuestos son lipofílicos y se absorben fácilmente por la piel, los pulmones o el tracto gastrointestinal. La exposición constante o intermitente a esos xenobióticos puede resultar en su acumulación en el organismo; sin embargo, los seres vivos cuentan con rutas de eliminación efectivas. En efecto, los químicos pueden excretarse sin cambio alguno o en forma de metabolitos por la orina, bilis, heces fecales, leche materna, a través de los pulmones y por transpiración. Los compuestos lipofílicos tienden a difundir en las membranas celulares y son reabsorbidos, mientras que los compuestos hidrosolubles son excretados. Los xenobióticos lipofílicos pueden acumularse en el cuerpo debido a que son fácilmente absorbidos y pobremente excretados. Por fortuna, los animales han desarrollado procesos bioquímicos que convierten a los compuestos lipofílicos en metabolitos hidrofílicos. Tales procesos reciben en conjunto el nombre de

biotransformación e involucran la participación de enzimas. Los metabolitos formados a través de estos procesos son químicamente diferentes del compuesto original y más hidrofílicos. De este modo, se restringe la distribución del compuesto hacia los diferentes tejidos, se disminuye la reabsorción de metabolitos en los túbulos renales y en el intestino y, finalmente, se promueve la excreción de tales compuestos a través de las rutas urinaria y biliar-fecal (Klaassen, Amdur y Doull, 1986).

Muchas enzimas de los animales son capaces de biotransformar xenobióticos liposolubles en compuestos hidrosolubles. Estas reacciones enzimáticas son de dos tipos: **fase I**, involucran reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, y **fase II** que consisten en reacciones de conjugación y síntesis (Figura 2-4). La función principal de las reacciones de fase I es la adición de grupos $-OH$, $-SH$, $-NH_2$ y $-COOH$. La adición de estos grupos funcionales permite que se lleven a cabo las reacciones de la fase II, en las cuales, los metabolitos generados en la fase I se unen a moléculas endógenas (ejemplo, ácido glucurónico, radicales sulfato, aminoácidos, etc.) dando origen a un conjugado. Estas moléculas endógenas confieren a los metabolitos o al xenobiótico lipofílico mayor hidrosolubilidad y la capacidad de ionización a pH fisiológico (Figura 2-4). Los conjugados formados durante la fase II utilizan mecanismos de transporte presentes en las membranas de células renales, hepáticas e intestinales para ser excretados (Klaassen, Amdur y Doull, 1986).

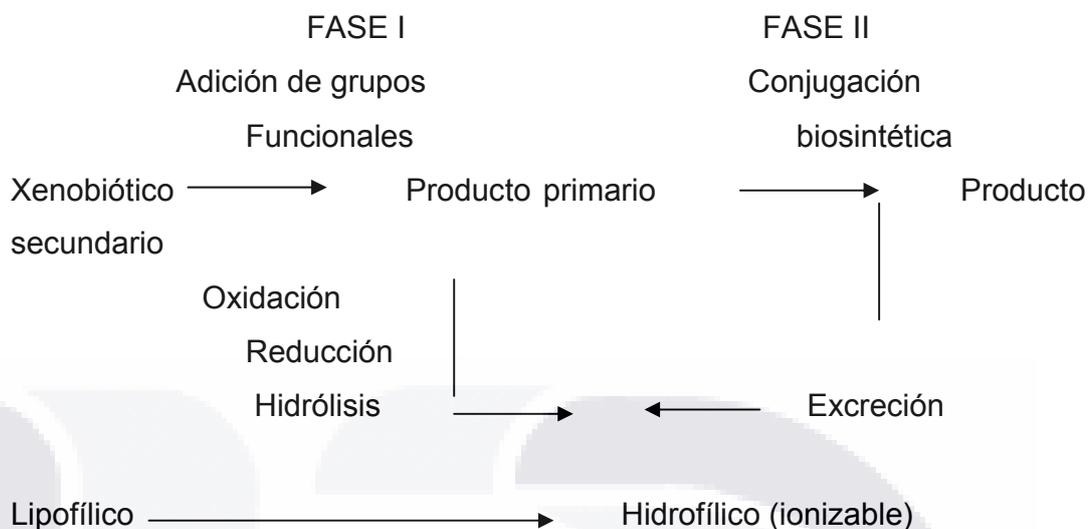


Figura 2-4. Integración de las reacciones de biotransformación de fase I y II (Tomado de Plaa, 1995). Sistema de monooxigenasas de función mixta

Las monooxigenasas dependientes del citocromo P450 (CYP 450) son un sistema enzimático acoplado y constituido fundamentalmente por: la Nicotin adenin dinucleótido-citocromo P450 reductasa (NADPH-CYP 450 reductasa) y la hemoproteína CYP 450. Estas enzimas se localizan en la matriz fosfolipídica de la membrana del retículo endoplásmico liso, lo que facilita las interacciones funcionales de estas moléculas. La flavoproteína NADPH-CYP 450 reductasa contiene cantidades equimolares de flavin mononucleótido (FMN) y flavin adenin dinucleótido (FAD). Esta enzima cataliza la transferencia de uno o dos electrones del NADPH a la hemoproteína CYP 450, precisamente la que tiene función de oxidasa terminal. Sin embargo, al contrario de la reductasa, existe una gran diversidad de formas del CYP 450, las que a su vez poseen una amplia afinidad por diversos sustratos.

Las monooxigenasas utilizan el oxígeno molecular (O_2) para la biotransformación de un sustrato. Estas reacciones catalíticas incorporan un átomo de oxígeno al producto y el otro es reducido a agua. El par de

electrones extra, requeridos para la reducción completa del oxígeno en agua, pueden provenir tanto del mismo sustrato como del NADPH, como se muestra en la siguiente reacción:



Debido a este requerimiento paradójico de un reductor y del oxígeno, estas enzimas son llamadas también oxidasas de función mixta. Los xenobióticos metabolizados por el CYP 450 son convertidos en metabolitos más polares, los cuales pueden ser fácilmente excretados o bien conjugados y eliminados del organismo. En general, este mecanismo permite la detoxificación de estos compuestos, sin embargo, su transformación a intermediarios más electrofílicos y reactivos los hace capaces de reaccionar también con macromoléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos.

2.3. Aspectos toxicodinámicos.

2.3.1. Alteraciones de organofosforados sobre el sistema nervioso.

El sistema nervioso está constituido por dos grandes divisiones: la división periférica (SNP) y la división central (SNC). El SNP contiene los nervios craneales, los nervios espinales y todas las ramificaciones que de ellos derivan. El SNC está compuesto por el encéfalo y la médula espinal; el encéfalo contiene al cerebro, al cerebelo y al tallo cerebral (Castillo L., 2006).

Histológicamente, el sistema nervioso está formado por dos tipos de células: las células nerviosas (neuronas) y las células gliales, de las que hay tres subtipos principales: los astrocitos, la microglia y los oligodendrocitos; y en el SNP, las células de Schwann, que tienen función semejante a la de los oligodendrocitos en el SNC. La neurona es considerada como la unidad

estructural y funcional del sistema nervioso. La neurona está constituida por un cuerpo o soma, una prolongación de mayor diámetro que emerge del soma, denominada axón, y varias ramificaciones que también emergen del soma, denominadas dendritas (Castillo L., 2006).

En el cerebro de los mamíferos, la información entre las neuronas se transmite a través de sustancias químicas denominadas neurotransmisores, que se liberan en las sinapsis como respuesta a un estímulo específico. El neurotransmisor secretado actúa en sitios receptores especializados y altamente selectivos, que se localizan en la célula postsináptica, lo que provoca cambios en el metabolismo de ésta, los cuales modifican su actividad celular. Uno de los neurotransmisores involucrados en este proceso es la acetilcolina (ACh). Se calcula que de 5% a 10% de las sinapsis en el sistema nervioso central (SNC) son de tipo colinérgico (Figura 2-5).

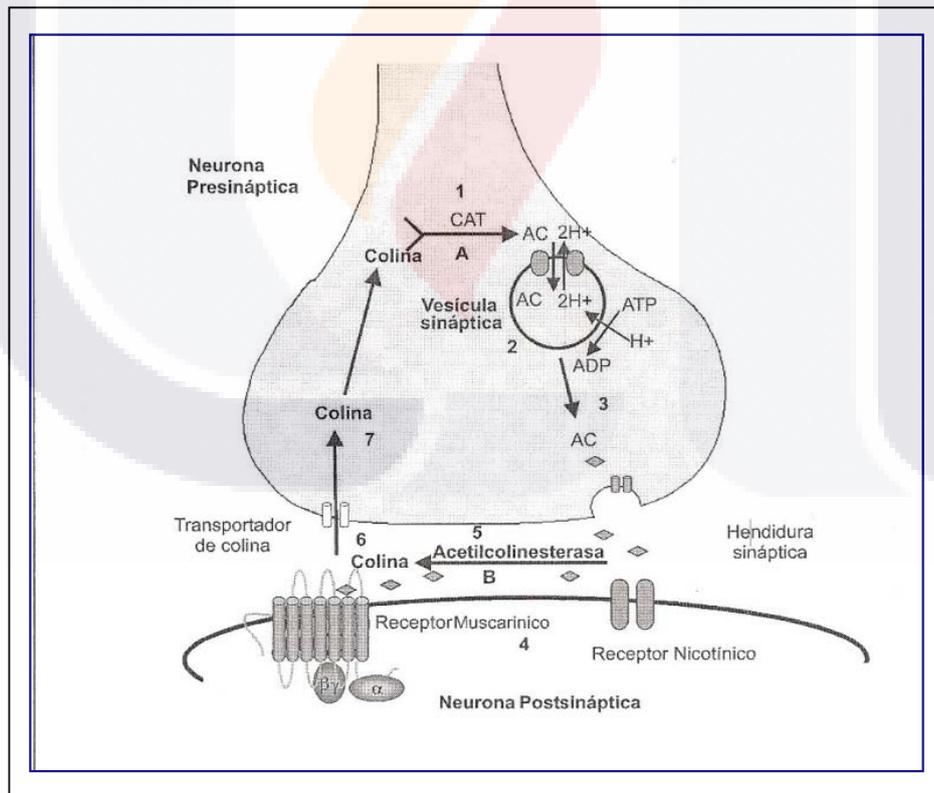


Figura 2-5. Sinapsis colinérgica.

La AC se sintetiza a partir de la colina, que se acumula en las neuronas colinérgicas mediante una reacción con la acetil CoA y bajo la influencia enzimática de la colina acetiltransferasa (CAT).

En las terminales colinérgicas el neurotransmisor es sintetizado en el citoplasma, de donde puede ser liberado directamente al espacio sináptico, o bien, ser transportada al interior de las vesículas sinápticas para ser liberada por exocitosis. En este proceso, la acetilcolina contenida en vesículas es liberada al exterior al fusionarse la membrana vesicular con la membrana de la terminal presináptica (Figura 2-6).

En el cerebro de los mamíferos, el efecto fisiológico más importante de la acetilcolina es una reducción de la permeabilidad a K^+ , de tal forma que las neuronas sensibles a la acetilcolina son más susceptibles a otras influencias excitatorias. Todas las regiones de la corteza cerebral están inervadas por acetilcolina, por lo que no es de extrañar que la función cortical esté fuertemente influida por la acetilcolina. Por ello, varios grupos neuronales están relacionados esencialmente con fenómenos de activación cortical, el paso de sueño a vigilia y también con la memoria. Así, la actividad colinérgica es esencial para mantener el ritmo hipocampal.

La acetilcolina es hidrolizada rápidamente mediante la enzima acetilcolinesterasa. Esta enzima existe en dos clases generales de formas moleculares: oligómeros homoméricos simples de subunidades catalíticas y asociaciones heteroméricas de subunidades catalíticas con subunidades estructurales (Massoulié y col., 1993; Taylor y Radic, 1994). Las formas homoméricas se encuentran como especies solubles en la célula, destinadas posiblemente a la exportación, o relacionadas con la forma exterior de la célula por medio de la secuencia de aminoácidos hidrófobos intrínseca o de un glucosfosfolípido unido. Una forma heteróloga es un tetrámero de subunidades catalíticas enlazado con disulfuro a una subunidad enlazada a lípidos de 20000 Da y, al igual que la forma glucosfosfolídica unida, se

encuentra en la superficie exterior de la membrana. La otra está constituida por tetrámeros de subunidades catalíticas, enlazados con disulfuro a cada una de tres bandas de una subunidad estructural del tipo de la colágena (Massoulié y col., 1993; Taylor y Radic, 1994).

La estructura tridimensional de la acetilcolinesterasa manifiesta un centro activo que es casi centrosimétrico en relación con cada subunidad, y que reside en la base de una garganta estrecha de cerca de 20 Å de profundidad (Sussman y col., 1991). En la base de esta garganta se encuentran los residuos de la tríada catalítica: serina 203, histidina 407 y glutamato 334 (Figura 2-6).

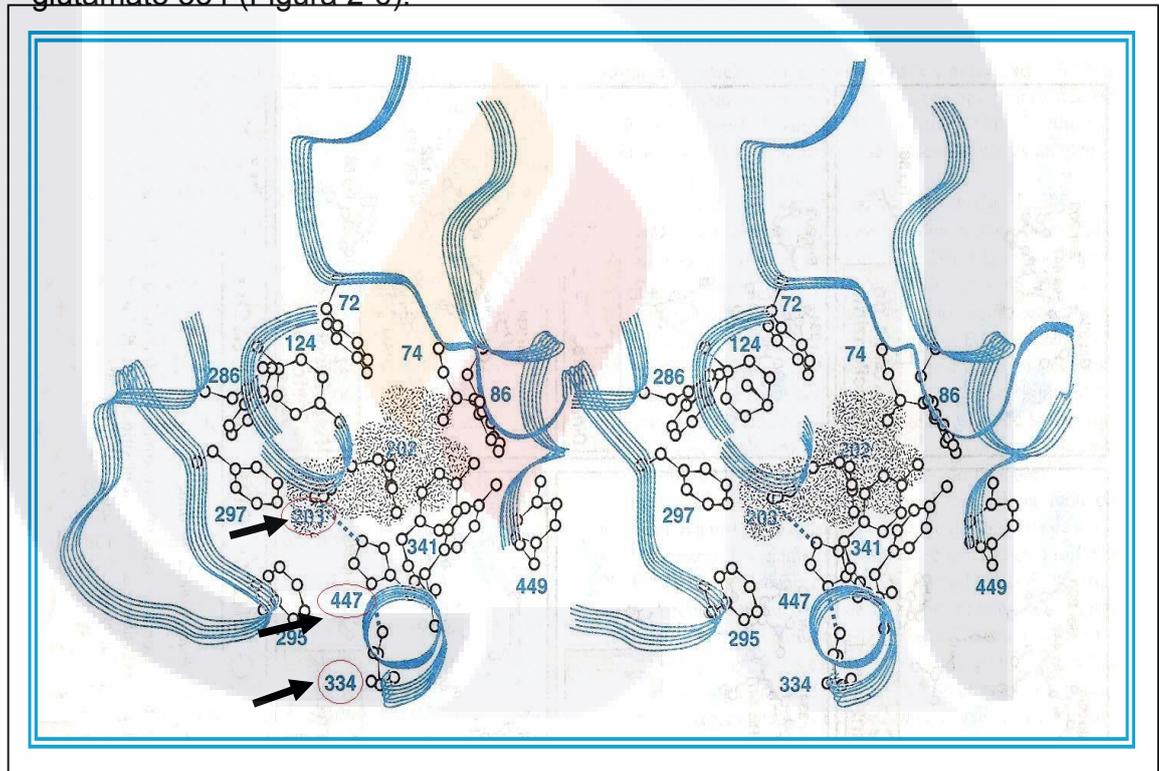


Figura 2-6. Estructura tridimensional de la enzima acetilcolinesterasa. Se muestra el centro activo formado por los aminoácidos serina, histidina y glutamato.

En los mamíferos, la toxicidad producida por los plaguicidas organofosforados se debe principalmente a la inhibición de la

acetilcolinesterasa. La transmisión de los impulsos nerviosos entre dos neuronas tiene lugar en la sinapsis o conexión entre ambas. Esta sinapsis está formada por la membrana presináptica, la hendidura sináptica y la membrana postsináptica. El impulso nervioso se transmite de la siguiente manera:

- 1) La llegada de un potencial de acción despolariza la membrana presináptica, lo que provoca la apertura de canales iónicos.
- 2) El Ca^{2+} entra y el aumento de su concentración hace que las vesículas de neurotransmisor se unan a la membrana y liberen, por exocitosis, acetilcolina en la hendidura sináptica.
- 3) En la membrana postsináptica están los receptores de acetilcolina a los que se une la molécula neurotransmisora lo que provoca la apertura de los canales iónicos en esta membrana.
- 4) La acetilcolina después de actuar es rápidamente inactivada por la enzima acetilcolinesterasa para que pueda repolarizarse la membrana y pueda transmitir sucesivamente sus nuevos impulsos nerviosos.

La acetilcolinesterasa hidroliza rápidamente a la acetilcolina, lo que conlleva la repolarización de la membrana o de la placa basal y las prepara para la llegada de un nuevo impulso. Así pues la función normal de la acetilcolina depende de su rápida hidrólisis por la acetilcolinesterasa, que permite la brevedad y unidad de los impulsos propagados sincrónicamente. El ácido acético liberado pasa a la sangre, mientras que la colina es recuperada por las neuronas para la síntesis de nuevas moléculas de neurotransmisor.

La inhibición de la acetilcolinesterasa provoca acumulación de la acetilcolina en la unión sináptica y la interrupción de la transmisión normal de los impulsos nerviosos. Este proceso involucra la fosforilación del grupo hidroxilo de la serina localizada en el sitio activo de las colinesterasas, lo que establece un enlace covalente entre la molécula del insecticida y estas

enzimas (Wilson, 1966).



Debido a ello, el funcionamiento de glándulas, músculos y del sistema nervioso son afectados. Los efectos generales resultantes de la acumulación de acetilcolina son: a) potenciación de la actividad parasimpática postganglionar, b) despolarización persistente del músculo esquelético y c) estimulación inicial de las células del sistema nervioso central, seguida por depresión de las mismas (Taylor, 1991; Kramer y Ho, 2002). En las intoxicaciones agudas, las acciones y efectos nocivos se clasifican en función del tipo de receptor que es estimulado por la acetilcolina (muscarínico y nicotínico) (Figura 2-7).

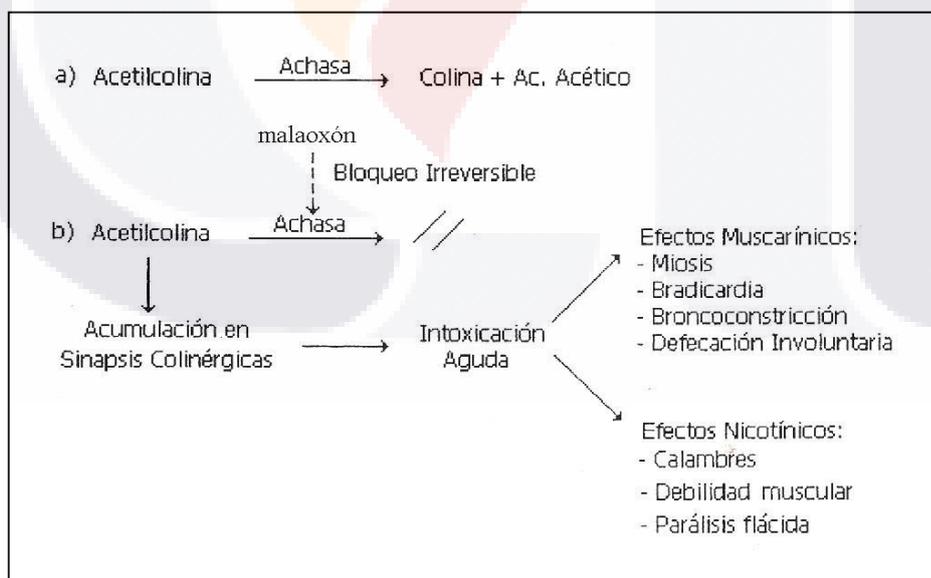


Figura 2-7. Inhibición de la acetilcolinesterasa por plaguicidas organofosforados y efectos tóxicos.

La muerte ocurre por paro respiratorio, el cual es la consecuencia del bloqueo del centro respiratorio, el broncoespasmo y la parálisis de los músculos respiratorios (Chang, 1991; Eyer et al, 2003).

2.3.2. Alteraciones de organofosforados sobre la coagulación sanguínea.

Con relación a la coagulación de la sangre, ha sido reportado que en los trabajadores expuestos a insecticidas organofosforados aparecen tiempos de protrombina prolongados (Holmes, 1956; Murray, 1994); además, la exposición de ratas al diazinón o al malatión altera el proceso de la hemostasia, ya que se modifica el tiempo de coagulación (Lox, 1983 y 1985).

2.3.3. Alteraciones de Organofosforados sobre el hígado.

El hígado ejecuta un gran número de funciones y entre las más importantes están el almacenamiento y biotransformación de las sustancias que recibe por medio del torrente circulatorio y el sistema portal. Normalmente biotransforma y acumula sustancias útiles en el organismo tales como la glucosa, en forma de glucógeno, aminoácidos, grasas y vitamina A y vitamina B₁₂.

El hígado está muy propenso a sufrir daños por la exposición a tóxicos debido a que la sangre puede llevar hasta al hígado sustancias tóxicas o que se vuelven tóxicas con las transformaciones que tienen lugar en este órgano (bioactivación).

Algunas de las reacciones que sufren los tóxicos en el hígado de hecho los convierten en sustancias menos tóxicas o no tóxicas y más fáciles de excretar, en este caso se dice que el hígado hizo una detoxificación.

Para realizar sus funciones, el hígado cuenta con una gran cantidad

de enzimas con funciones oxidativas y reductivas, entre las cuales se encuentran el sistema del citocromo de la proteína 450 (P-450), flavin-monooxigenasas, peroxidasas, hidroxilasas, esterasas y amidasas. Otras enzimas también presentes son las glucuroniltransferasas, las sulfotransferasas, metilasas, acetiltransferasas, tioltransferasas. Todas estas enzimas tienen gran importancia en las biotransformaciones de los tóxicos.

Las alteraciones que los plaguicidas pueden producir en el hígado son de gran importancia toxicológica. Recientemente se ha reportado que en las ratas expuestas al diazinón, insecticida organofosforado, aumenta la glucogenólisis y se incrementa la liberación de glucosa hepática como un mecanismo de acción no colinérgico (Teimouri et al, 2006). Al respecto, la vulnerabilidad del hígado a los agentes tóxicos se explica por su estratégica localización anatómica y su gran capacidad para biotransformar xenobióticos. El acceso de los tóxicos a las células hepáticas por ingestión oral y otras vías de exposición, aunado a la concentración alta de enzimas metabolizantes en el hepatocito, genera una tasa elevada de conversión a metabolitos inactivos (detoxicación); sin embargo, también se producen metabolitos tóxicos (bioactivación), los cuales pueden dañar o conducir a la muerte de las células hepáticas (Siller, 2006).

2.4. Estrés oxidativo

2.4.1. Aspectos generales.

Los radicales libres son especies químicas con uno o más electrones desapareados, lo que ocasiona que estas especies sean altamente reactivas. Esta situación es energéticamente inestable y logran su estabilidad removiendo electrones de otras moléculas y, por lo tanto, oxidándolas. Las interacciones anteriores pueden ser de tipo covalente y no covalente. Los radicales libres que reaccionan de manera covalente son llamados

compuestos electrofílicos y forman aductos con macromoléculas de las células como las proteínas. Las especies reactivas de oxígeno establecen enlaces no covalentes con las estructuras celulares, lo que puede originar reacciones en cadena de tipo redox que producen la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Hinson y Roberts, 1992).

Para neutralizar a los radicales libres y evitar daño a las células, los organismos aeróbicos han desarrollado mecanismos de protección que funcionan como atrapadores de esas sustancias (mecanismos antioxidantes). En efecto, en condiciones fisiológicas, los radicales libres son destoxificados en las células a través de los mecanismos antioxidantes, de tal forma que existe un equilibrio entre los fenómenos pro-oxidantes y los antioxidantes. Sin embargo, bajo diversas circunstancias este equilibrio puede ser alterado, por ejemplo cuando se producen en exceso las especies reactivas de oxígeno. Esta situación particular se denomina *estrés oxidativo* (Maxwell, 1995).

2.4.2. Especies reactivas de oxígeno (ERO).

Especies reactivas del oxígeno (ERO) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales (Avello y Suwalsky, 2006).

Cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el **estrés oxidativo**, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Avello y Suwalsky, 2006).

El oxígeno es una molécula básicamente oxidante, hasta el punto que en las células que lo utilizan para su metabolismo es el principal responsable de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Sin embargo, no todas las especies oxidantes tienen un origen endógeno; la existencia de factores exógenos, como la radiación solar, toxinas fúngicas, pesticidas o xenobióticos, pueden incrementar su nivel. En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno (O_2) con la formación de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mientras que un pequeño porcentaje (en torno al 5%) forman tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son literalmente radicales libres (el anión superóxido y el hidroxilo). En situaciones en las que exista una mayor actividad metabólica (etapas del crecimiento, desarrollos activos o procesos inflamatorios) ocurre una mayor demanda tisular de O_2 y parte de él se metaboliza, generándose un alto número de sustancias oxidantes. La segunda gran fuente de ERO también es endógena y está constituida por el metabolismo de las células defensivas tales como los polimorfonucleares, los monocitos sensibilizados, los macrófagos y los eosinófilos. Para que éstas puedan cumplir su misión, están dotadas de diversas proteínas así como de vías metabólicas que generan varias especies químicamente agresivas como peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo, cuyo fin último es lesionar y destruir elementos extraños.

En condiciones normales estas especies reactivas son producidas y utilizadas en compartimentos celulares como los lisosomas que, aunque en el interior de los fagocitos, no tienen por qué dañar a las células siempre y cuando los mecanismos antioxidantes de éstas funcionen adecuadamente. Los oxidantes pueden también proceder del exterior, bien sea directamente o como consecuencia del metabolismo de ciertas sustancias. Algunos ejemplos lo constituyen la contaminación ambiental, la luz solar, las radiaciones ionizantes, una concentración de oxígeno demasiado elevada, los pesticidas, metales pesados, la acción de ciertos xenobióticos (cloroformo, paracetamol,

etanol, tetracloruro de carbono, violeta de genciana) o el humo de tabaco. Sin embargo el papel de los radicales libres no ha de ser abordado sólo desde una perspectiva negativa o patológica. Estos compuestos cumplen también una función fisiológica al participar, en condiciones normales, en la defensa frente a las infecciones, en el metabolismo normal, en la fagocitosis e inflamación (Avello y Suwalsky, 2006).

2.4.3. Peroxidación lipídica.

Todas las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular. La membrana celular contiene proteínas que juegan papeles vitales en la interacción de la célula con otras células, hormonas y agentes reguladores del líquido extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva (Goodam, 1998). Éstas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libres que traen como consecuencia la peroxidación lipídica. Ésta es generalmente inducida por un radical hidroxilo que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado, lo que genera una cadena de reacciones oxidativas. Los antioxidantes, pueden formar complejos estables impidiendo la acción catabólica de los radicales libres en la membrana celular. Los mecanismos homeostáticos con que el organismo enfrenta el daño oxidativo que habitualmente causan estas especies son numerosos y diversos, reflejando la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas, como también los numerosos compartimientos donde actúan en el organismo y las propiedades físicas de éstos (Avello y Suwalsky, 2006).

Para neutralizar a los radicales libres y evitar daño a las células, los organismos aeróbicos han desarrollado mecanismos de protección que funcionan como atrapadores de esas sustancias. En efecto, en condiciones

fisiológicas normales, los radicales libres son detoxificados en las células a través de los mecanismos antioxidantes, de tal forma que existe un equilibrio entre los fenómenos pro-oxidantes y los antioxidantes.

En años recientes se ha encontrado que los agentes anticolinesterásicos (plaguicidas organofosforados y carbamatos) pueden dañar a las células generando estrés oxidativo y alterando el sistema antioxidante. Al respecto, ha sido publicado que estos plaguicidas incrementan la formación excesiva de isoprostanos F_2 y de neuroprostanos F_4 (biomarcadores in vivo de la peroxidación lipídica y de la generación de especies reactivas de oxígeno), así como de citrulina, un marcador de la generación de óxido nítrico y de especies reactivas nitrogenadas; además, durante el curso de estos procesos puede incrementarse el consumo de ATP e inhibirse la fosforilación oxidativa, lo que compromete la capacidad de las células para mantener sus niveles energéticos (Gupta et al, 2005; Milatovic et al, 2006; Giordano et al, 2007).

2.4.4. Xenobióticos y producción de radicales libres.

Aunque, en general, las reacciones de biotransformación que sufren los xenobióticos conducen a su inactivación, en ciertos casos, la biotransformación genera metabolitos con actividad biológica. Cuando esto sucede, la sustancia que ingresa al organismo es inactiva o poco activa, de manera que los efectos producidos deben ser atribuidos a la actividad del metabolito o de los metabolitos formados a partir de ella. En este caso se habla del proceso de bioactivación o de biotoxificación cuando los productos del metabolismo son tóxicos. Los metabolitos activos sufren una segunda reacción de biotransformación (conjugación) mediante la cual las transferasas introducen en sus moléculas un sustrato endógeno como el glutatión, el ácido glucurónico, el radical sulfato, etc. Los productos finales son sustancias hidrófilas que se eliminan con mayor facilidad en la orina.

2.4.5. Participación del malatión en el estrés oxidativo (daño celular).

El malatión es uno de los insecticidas organofosforados más usados en la agricultura. El malatión es bioactivado en el organismo a un metabolito denominado malaoxon. Diversos estudios indican que existen otros órganos blanco, además del efecto que producen sobre la enzima acetilcolinesterasa, que pueden ser afectados por la exposición a los insecticidas organofosforados. La naturaleza lipofílica de los organofosforados facilita la interacción con la membrana celular y la perturbación en la estructura de la bicapa lipídica. La toxicidad de los organofosforados puede ser debida a la formación de especies reactivas de oxígeno, dando lugar a lipoperoxidación, la cual es valorada por el incremento en los niveles de ácido tiobarbitúrico. Diversos estudios indican que la exposición a malatión provocó estrés oxidativo, el cual fue medido mediante los niveles de ácido tiobarbitúrico en eritrocitos, en hígado y en el cerebro de ratas. La toxicidad del malatión mediante la producción del estrés oxidativo puede ser debido a:

- a) La actividad redox (los organofosforados aceptan un electrón de los radicales libres y luego lo transfieren al oxígeno generando aniones superóxido y peróxido de hidrogeno).
- b) Generando radicales libres debido a la alteración en la homeostasis del organismo dando lugar a estrés oxidativo y provocando la disminución de los mecanismos antioxidantes.

Además, los organofosforados son transformados en oxones mediante un sistema de enzimas pertenecientes al citocromo P450. Los oxones son componentes altamente tóxicos (Fortunato et al., 2006).

2.4.6. Mecanismos antioxidantes de las células (GSH).

Como ya se señaló, para neutralizar a los radicales libres y evitar daño a las

células los organismos aeróbicos han desarrollado mecanismos de protección que funcionan como atrapadores de esas sustancias (mecanismos antioxidantes). Los mecanismos protectores contra los radicales libres del oxígeno incluyen: a) antioxidantes preventivos (transferrina, ceruloplasmina), b) enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa de glutatión) y c) sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, grupos tiol, tocoferol, ácido úrico y β -caroteno). A su vez, los mecanismos protectores contra los compuestos electrófilos incluyen: a) conjugación con el glutatión (reacción catalizada por la transferasa de glutatión) y b) mecanismos reparadores (polimerasa de ADN, proteasas y lipasas) (Niesink, 1996).

La forma reducida del glutatión (GSH) destoxifica a una gran cantidad de metabolitos reactivos ya sea por conjugación espontánea o mediante una reacción catalizada por las transferasas de glutatión (GST), enzimas que se localizan principalmente en el citoplasma de las células y, en menor cantidad, en la membrana del retículo endoplásmico. El hígado, los riñones, los testículos, el intestino y las glándulas suprarrenales son los órganos con mayor actividad de estas enzimas (Glenn y Jay, 1986). Las GST son una familia de enzimas involucradas en la dextoxificación de xenobióticos y de sustancias reactivas endógenas, mientras que el glutatión (GSH) es un tripéptido (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) sintetizado en el hígado a partir de la γ -glutamilcisteína y la glicina (Koppele y Mulder, 1991) (Figura 2-8). Las GST neutralizan a los radicales libres catalizando la reacción de estas sustancias con el grupo tiol (-SH) del glutatión reducido; con ello, se neutralizan los sitios electrófilos de los radicales libres y se incrementa la hidrosolubilidad. Los epóxidos, los hidroperóxidos orgánicos y los metabolitos oxidados son los sustratos de las GST. La transferencia del GSH a compuestos electrofílicos es el mecanismo principal de destoxificación de los intermediarios reactivos generados por el sistema de monooxigenasas (Reed, 1990). Por lo tanto, las GST son un mecanismo de protección de las

células que se encarga de destoxificar a una gran variedad de xenobióticos y de sustancias electrofílicas endógenas (Fang et al., 2002).

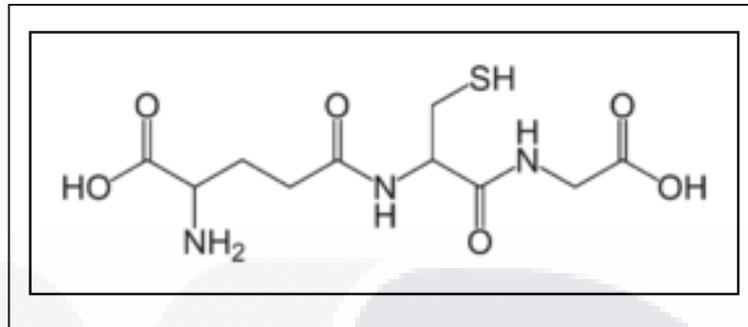


Figura 2-8. Estructura química de la molécula de glutatión.

La síntesis del GSH es catalizada secuencialmente por dos enzimas citosólicas: la γ -glutamilcisteina sintetasa (GCS) y la sintetasa de GSH. El GSH es el tiol de peso molecular bajo que más abunda en las células animales (0.5-10 mmol/L). la mayor parte del GSH (85-90%) se encuentra en citosol y el resto se localiza en los organelos, incluyendo la mitocondria, matriz nuclear y peroxisomas (Lu, 2000). El GSH participa en muchas reacciones celulares importantes: actúa como atrapador eficiente de radicales libres y de especies reactivas de oxígeno.

2.4.7. Extracto de *ginkgo biloba*

Desde hace siglos los compuestos obtenidos de los vegetales han sido utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades. Por ello, han sido la fuente de importantes investigaciones farmacológicas y toxicológicas (Rodríguez y Jaramillo, 2006). Al respecto, el Ginkgo biloba (Gb), planta vascular que pertenece a la familia Ginkgoaceae, ha sido utilizado en la medicina china tradicional para el tratamiento contra el asma, la enuresis y la tos. Sin embargo, a partir de 1990, el extracto de las hojas de este árbol fue ampliamente conocido y consumido, una vez descubierta su capacidad potenciadora de la memoria (Zimmerman et al, 2002). Los efectos

antioxidantes del Gb se han corroborado por la reducción de la lipoperoxidación en diferentes tejidos animales (Pietri et al, 1997).

El árbol de Gb apareció en la tierra durante el Pérmico inferior en la era Paleozoica y, por tal motivo, es considerado como un fósil viviente (DeFeudis y Drieu, 2000). En China y Japón, ha sido cultivado con fines ornamentales y medicinales. En Asia es comúnmente llamado “árbol de pata de pato” por la forma de sus hojas (Figura 2-9).



Figura 2-9. Árbol de *Ginkgo biloba*, a la derecha en la parte superior, las hojas del árbol y los frutos.

En 1964 las compañías farmacéuticas Beaufour- Ipsen Pharma (Francia) y Willmar Schwabe (Alemania) fueron las primeras en obtener un extracto estandarizado de las hojas del *Ginkgo biloba* (EGb 761). Dicho extracto contiene 24% de glucósidos flavonoides, 6% de lactonas terpenos y menos de 5 ppm de ácido ginkgólico, un componente con propiedades alergénicas (Jacobs y Browner 2000). Algunas de las principales actividades farmacológicas y bioquímicas atribuidas al EGb 761 son: 1) actividad

atrapadora de radicales libres, lo que puede inhibir la lipoperoxidación de membranas celulares, 2) relajación del endotelio vascular, lo que aunado al efecto anterior, resulta en el mejoramiento de la circulación sanguínea en venas, arterias y capilares, 3) el componente bilobalide incrementa la respiración mitocondrial, lo que puede proteger contra el desacople de la fosforilación oxidativa e incrementar, por lo tanto, las concentraciones de ATP y 4) atenuación de la apoptosis en cultivos celulares (Roberfroid y Buc Calderón, 1995; Smith y Luo 2003; Sierpina, 2003). Lo antes expuesto sugiere la posibilidad de que el extracto del Ginkgo biloba pueda evitar o disminuir el daño oxidativo en el hígado y las alteraciones de la coagulación sanguínea producidos por el plaguicida organosforado malatión.

El extracto de G.B o alguno de sus componentes han sido extensamente estudiado en términos de sus efectos en el área cognitiva, fisiológica y psiquiátrica posteriores a secuelas de procesos vasculares y neurológicos. Las funciones y condiciones específicas incluyen: memoria de reconocimiento, poder de recordar, reflejos, atención, concentración, funciones psicomotrices, fatiga e información de velocidad de procesamiento de ideas.

2.4.7.1. Componentes bioactivos

Los efectos antioxidantes del Gb se han corroborado por la reducción de la lipoperoxidación en diferentes tejidos de animales de experimentación, e incluso en el humano (Pietri et al., 1997). Las dos fracciones principales del extracto de ginkgo biloba, terpenos y flavonoides, tienen propiedades diferentes lo que le da la sinergia farmacológica al EGb 761. Las lactonas terpenos están representadas por los ginkgólidos A, B, C, J y M y bilobalide. Los ginkgólidos son antagonistas del factor activador de plaquetas, son

capaces de reducir tanto la activación como la agregación de plaquetas, por lo cual, contribuyen a mejorar la circulación sanguínea. El compuesto bilobalide es una trilactona sesquiterpeno capaz de reducir el edema cerebral y zonas infartadas en la región cortical en ciertos tipos de apoplejía, reduciendo el daño por isquemia cerebral (DeFeudis, 2000).

Los flavonoides son compuestos derivados del fenilcromo. Pertenecen a un grupo de compuestos ampliamente distribuidos en las plantas vasculares (*Ginkgo biloba*). El grupo catecol de los flavonoides, en el anillo A confiere alta estabilidad sobre radicales aroxilo. La deslocalización de los electrones es asegurada por conjugación del anillo B con la estructura 4-oxo, mediante un 2, 3-doble enlace. La presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 3 potencia la capacidad antioxidante de los flavonoides (Roberfroid y Buc Calderón, 1995). Los flavonoides reaccionan con radicales hidroxilo actuando como “atrapadores” de los mismos. Además, los grupos hidroxilo fenólicos de los flavonoides, son los responsables de su acción quelante de metales pesados de transición prooxidantes (Fe^{+2}), inhibiendo, de esta manera, la formación de nuevos radicales hidroxilo (Gohil y Packer, 2002).

El Extracto de Gb (Egb 761), Ginkor, Rokan, Tanakan o Tebonin es un extracto estandarizado de las hojas del Gb y contiene aproximadamente: Glucósidos de lactónas: 24% (principalmente Quercetina, Kampferol e Isoramnetina), Terpeno lactónas 6% (2.8-3.4 % de Ginkgólidos_A, B y C y 2.6-3.2 % de Bilobalida), Proanticianidinas, glucosa, ramnosa, ácido D-glucárico y ácidos ginkgólidos (Anónimo, *Drugs R D*, 4: 188-193, 2003).

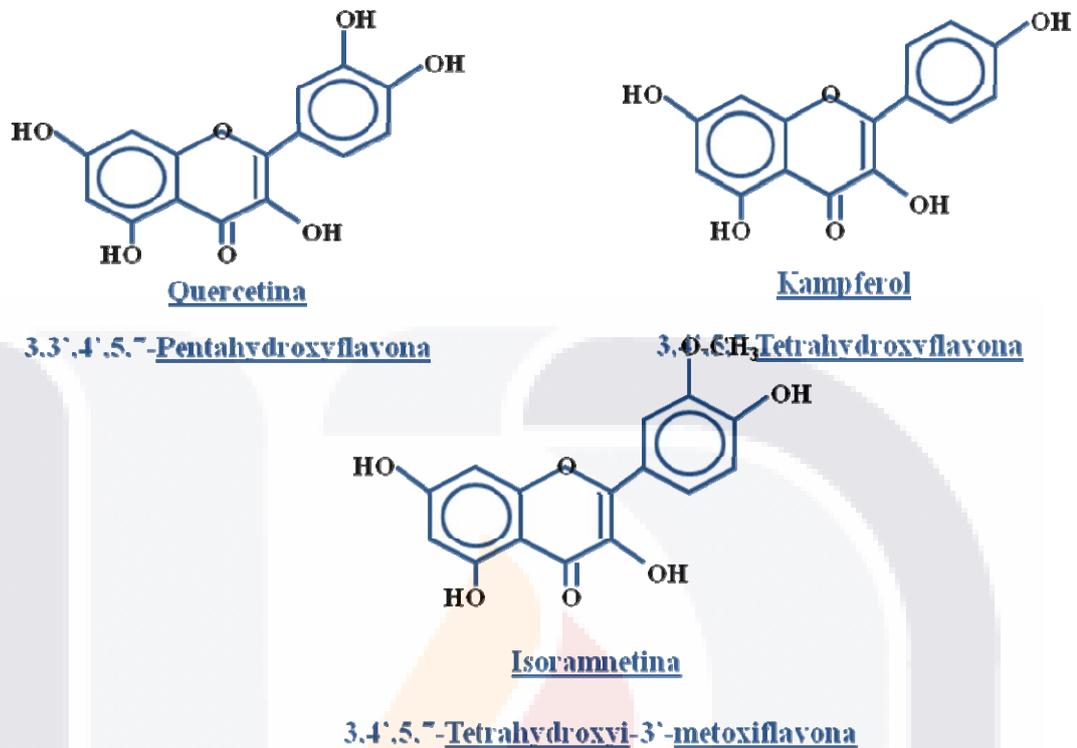


Figura 2.4.7.1. Estructuras químicas de los glucósidos de lactonas del EGb.

2.4.7.2. Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de un compuesto se basa en dos principios generales: su alta reactividad con radicales de diferente origen y la estabilidad relativamente alta del antioxidante. Los flavonoides son captadores potentes de radicales libres de oxígeno o quelantes de metales, previniendo de este modo la lipoperoxidación.

Los flavonoides polifenólicos inactivan enzimas, modifican algunas funciones celulares como la permeabilidad capilar, inhiben la inflamación, estimulan el metabolismo energético celular y aumentan la tolerancia a la hipoxia, lo que disminuye el riesgo de que aparezcan lesiones en la

membrana celular (Roberfroid y Buc Calderón, 1995; Soriano, 2003). Se postula que la producción de especies reactivas de oxígeno, a través del metabolismo aeróbico normal, es el principal factor que contribuye al proceso de envejecimiento y patologías clínicas. La fracción flavonoide del Ginkgo biloba tiene la capacidad de actuar como atrapadora de dichas especies reactivas. El efecto antioxidante de esta fracción puede lograrse por: la atenuación directa de las especies reactivas de oxígeno (Smith y Luo, 2003), mediante el aumento de la expresión de proteínas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, quelando iones prooxidantes transicionales e incrementando los metabolitos antioxidantes, como el glutatión (GSH) (Gohil y Packer, 2002).

2.4.7.3. Efectos terapéuticos

Efectos Periféricos:

- *Efectos Vasomoduladores:* El EGb ha demostrado ejercer, en modelos experimentales sobre conejos, efectos constrictivos o dilatadores sobre los vasos sanguíneos, dependiendo de diferentes situaciones, en especial si la vasculatura previamente se encontraba dilatada o constrictiva (Auguet y Clostre, 1983).

En estos ensayos se ha observado que el EGb potencia la acción de norepinefrina, la cual ejerce constricción Ca^{2+} dependiente sobre aorta y vena cava aisladas. Además de esta actividad estimulante simpática, en el efecto constrictor podría estar involucrada una disminución de la enzima Catecol-Oxi-Metil-Transferasa (COMT) y/o inhibición parcial de la recaptación (Borchardt y Huber, 1975).

En contraste con el efecto constrictor, la actividad vasodilatadora

parece ser de tipo endotelio-dependiente. Mecanismos alternativos podrían tener ingerencia tales como: inhibición de la MAO, liberación de PGI₂, agonismo beta-adrenérgico, incremento del secuestro intracelular de Ca²⁺, incremento de la actividad de la oxido-nítrico sintetasa o disminución de la peroxidación lipídica (De Feudis, 1991).

- *Efectos metabólicos*: El EGb ha demostrado incrementar la glucemia y la síntesis de glucógeno en células del músculo liso, de manera dosis-dependiente. En estudios sobre células endoteliales hipóxicas, se pudo comprobar que el EGb y el bilobalide (la fracción terpénica) pueden retrasar el inicio de la glicólisis hipóxica por prolongación de la generación de ATP. El mecanismo íntimo, sin embargo, no está del todo dilucidado (Janssens, 1995).

- *Inhibición de la Agregación Plaquetaria*: El EGb aparece como un agente inhibidor de la agregación plaquetaria. Los ginkgólidos son antagonistas del receptor del factor activador de plaquetas, (PAF), mecanismo que puede explicar el potencial hemorrágico del Gb a través de su efecto inhibidor de la agregación plaquetaria (Lamant et al., 1987). Esta actividad es importante dada la ingerencia del PAF en procesos de edema, inflamación y estados de hipercoagulabilidad (Janssens, 1995).

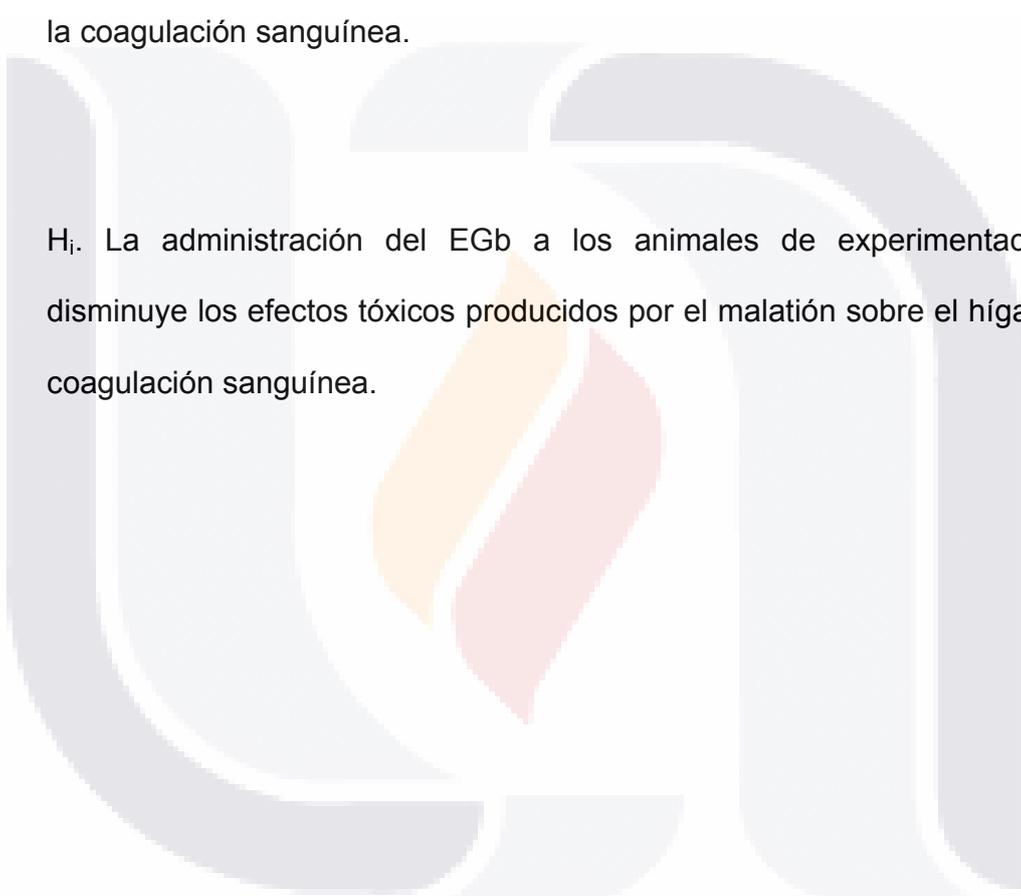
III. JUSTIFICACIÓN

La exposición ocupacional o ambiental a los plaguicidas produce daños a la salud de los seres humanos. Al respecto, la exposición al malatión afecta al sistema nervioso central, al hígado y los mecanismos de coagulación de la sangre. Dado que el hígado es un órgano que participa de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal, cuando es afectado por los xenobióticos pueden aparecer alteraciones fisiopatológicas serias que conducen a la disfunción de este órgano. Esto puede generar una calidad de vida baja o conducir a la muerte de los humanos. Por ello, consideramos importante investigar la capacidad del extracto del Ginkgo biloba para contrarrestar la toxicidad hepática y las alteraciones de la hemostasia producidas por el malatión.

IV. HIPÓTESIS

H₀. La administración del EGb a animales de experimentación disminuye la magnitud de los efectos tóxicos producidos por el malatión sobre el hígado y la coagulación sanguínea.

H_i. La administración del EGb a los animales de experimentación no disminuye los efectos tóxicos producidos por el malatión sobre el hígado y la coagulación sanguínea.



V. OBJETIVOS

a) General.

- Analizar el posible efecto protector del Ginkgo biloba (EGb) sobre el daño hepático y las alteraciones de la coagulación sanguínea, producidas por la exposición a dosis bajas del insecticida organofosforado malatión.

b) Específicos:

1. Valorar el efecto terapéutico del EGb sobre el daño hepático producido por el malatión, en ratas Wistar machos adultos, mediante el análisis de:
 - 1.1. Las actividades séricas de las transaminasas glutámico-pirúvica (GPT) y glutámicooxalacética (GOT).
 - 1.2. Las concentraciones de malondialdehído en la sangre y en el hígado.
 - 1.3) Las concentraciones hepáticas de glutatión reducido (GSH).
 - 1.4. La actividad de las transferasas de glutatión (GST) en el hígado.
 - 1.5. Las concentraciones hepáticas de ATP.
 - 1.6. El estudio histológico del hígado.
- 2 Valorar el efecto terapéutico del EGb sobre las alteraciones de coagulación de la sangre producidas por la exposición a dosis bajas de malatión, en ratas Wistar machos adultos, cuantificando:
 - 2.1) Tiempo de Sangrado (TS).
 - 2.2) Tiempo Parcial de Tromboplastina (TPT) y Tiempo de Protrombina

(TP).

- 2.3) Actividades de Factores Individuales de la Coagulación (FIC) relacionados con las pruebas TPT y TP que resulten alteradas.



VI. METODOLOGÍA

Estudios *in vivo*

Esta investigación se realizó en el laboratorio de Toxicología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. El estudio se llevó a cabo en ratas Wistar macho adultos con un peso aproximado de 200-250 g. Los animales se agruparon en 3 lotes de 10 ratas cada uno y fueron tratados de la siguiente manera para generar el daño hepático y las alteraciones en la coagulación de la sangre:

Testigos	Tratados Malatión	Tratados EGb+Malatión
<ul style="list-style-type: none"> ● Obtener muestras de sangre de arteria caudal y realizar las pruebas programadas con este fluido. ● Administrar aceite de maíz, por vía oral, durante 20 días. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Administrar malatión (25mg/Kg/día, oral) disuelto en aceite de maíz, durante 20 días. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Administrar EGb(4mg/Kg/3 veces semana/ vía ip) + Malatión (25mg/Kg/día, oral) disuelto en aceite de maíz, durante 20 días.
<ul style="list-style-type: none"> ● Obtener muestras de sangre de la arteria caudal a los 5, 10 y 20 días de tratamiento. ● Realizar las pruebas programadas con este fluido. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Obtener muestras de sangre de la arteria caudal a los 5, 10 y 20 días de tratamiento. ● Realizar las pruebas programadas con este fluido. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Obtener muestras de sangre de la arteria caudal a los 5, 10 y 20 días de tratamiento. ● Realizar las pruebas programadas con este fluido.
<ul style="list-style-type: none"> ● A los 20 días de tratamiento sacrificar a los animales y 	<ul style="list-style-type: none"> ● A los 20 días de tratamiento sacrificar a los animales y 	<ul style="list-style-type: none"> ● A los 20 días de tratamiento sacrificar a los animales y

Testigos	Tratados Malatión	Tratados EGb+Malatión
<p>determinar en el hígado:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Concentración de GSH, ATP y MDA. ● Actividad de GST ● Realizar estudio histológico del hígado. 	<p>determinar en el hígado:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Concentración de GSH, ATP y MDA. ● Actividad de GST ● Realizar estudio histológico del hígado. 	<p>determinar en el hígado:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Concentración de GSH, ATP y MDA. ● Actividad de GST ● Realizar estudio histológico del hígado.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos de los estudios anteriores fueron analizados estadísticamente mediante las pruebas de ANOVA y de Tukey-Kramer.

Los métodos llevados a cabo para realizar las diferentes pruebas se explican a continuación:

6.1. Tiempo de Coagulación

La prueba suministra un indicio aproximado de la eficacia global del mecanismo intrínseco de coagulación (sangre). El aumento del tiempo de coagulación indica una severa alteración del mecanismo de la coagulación. La anomalía puede deberse a: un defecto en una o varias de las fases de la coagulación; deficiencia de un factor específico, presencia de un anticoagulante en la sangre, etc.

6.2. Tiempo de Sangrado

Esta prueba proporciona una medida de la función de las plaquetas (in vivo). La prueba es útil para identificar alteraciones cualitativas de las plaquetas y la enfermedad de Von Willebrand.

6.3. Tiempo de protrombina (TP)

El tiempo de protrombina es el tiempo necesario para la coagulación de una muestra de plasma recalcificado en presencia de tromboplastina hística. Explora la vía extrínseca de la coagulación, es decir, los factores I, II, V y X. Al ser todos estos factores producidos en el hígado, su alteración es índice de insuficiencia hepática. El valor de TP suele ser de 11-15 segundos. Se consideran patológicos los valores que superan en 3-4 segundos al obtenido para el control.

La protrombina o factor II es una proteína estable del tipo de las globulinas α_2 (PM 63000) que contiene unos 18 aminoácidos, incluyendo los ácidos aminados que contienen azufre. Su concentración normal en la sangre es aproximadamente de 20 mg por 100 mL. En presencia de iones de calcio, se transforma en trombina por la acción enzimática de las tromplastinas extrínseca e íntinseca. Es producida por el hígado bajo la influencia de la vitamina liposoluble K. La protrombina está relacionada con el factor VII, también producido por el hígado.

Las enfermedades hepáticas graves disminuyen las concentraciones plasmáticas de protrombina porque la célula hepática enferma o dañada ya no puede utilizar la vitamina K para producir cantidades suficientes de protrombina.

6.4. Tiempo parcial de trombloplastina (TPT)

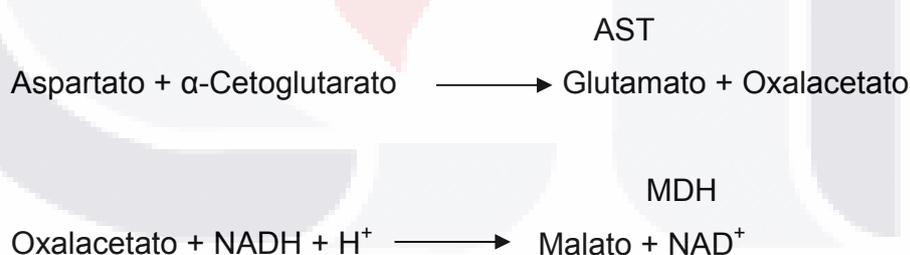
Explora deficiencias de las proteínas o factores de la coagulación que participan en la vía intrínseca (VIII, IX, XI, XII y precalicreína).

Los resultados siempre se expresan en segundos, considerando como valores normales 36-40 segundos. Se considera patológico un alargamiento de 8 a 10 segundos al obtenido para el control.

6.4.1. Actividad Determinación cuantitativa de aspartato aminotransferasa (GOT)

La aspartato aminotransferasa es una enzima bilocular (citoplasmática y mitocondrial) ampliamente difundida. Se encuentra en mayor proporción en hígado y corazón. Cualquier alteración de estos tejidos produce un aumento en los niveles de AST circulante.

La aspartato aminotransferasa cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenada y NADH.



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio es proporcional a la concentración catalítica de GOT en la muestra de ensayo. La GOT es utilizada para el diagnóstico de enfermedades hepáticas. Significado clínico: la AST es una enzima intracelular, se encuentra en niveles altos en el músculo del corazón, las células del hígado, las células del músculo esquelético y en menor cantidad en otros tejidos.

6.5. Determinación cuantitativa de alanina aminotransferasa (GPT)

La alanina aminotransferasa es una enzima unilocular (citoplasmática) cuya mayor actividad se localiza en el tejido hepático. La destrucción o cambio de permeabilidad de las membranas celulares provoca la liberación de ALT a la circulación sanguínea. Los mayores aumentos de actividad de ALT en el plasma se producen como consecuencia de alteraciones hepáticas.



6.6. Malondialdehído en sangre e hígado

La lipoperoxidación se inicia cuando las especies reactivas de oxígeno atacan un ácido graso poliinsaturado y le arrebatan un átomo de hidrógeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, para formar el radical libre acil-ácido graso. Rápidamente esta molécula adiciona oxígeno y se transforma en un radical libre peroxilo ácido graso que actúa como transportador de la reacción en cadena ya que ataca a otros ácidos grasos poliinsaturados e inicia nuevas reacciones. Los productos finales de la lipoperoxidación son lípidos peroxidados que al degradarse originan nuevos RL y una amplia variedad de compuestos citotóxicos como los aldehídos, entre ellos el malondialdehído (MDA) (Chihuailaf et al., 2002).

Determinación de Glutación Reducido (GSH) (método Hissin y Hilf, 1975).

La transferencia de GSH a compuestos electrofílicos representa el principal mecanismo de detoxificación de intermediarios reactivos generados por el

sistema de monooxigenasas y evita el ataque nucleofílico de estos compuestos sobre las estructuras celulares impidiendo el daño celular (Kaneo y col, 1994). La reducción de un 20% a 30% del total de GSH intracelular produce una marcada incapacidad de las células para amortiguar acciones de compuestos tóxicos (Reed, 1990).

6.7. Curva de calibración de Glutati3n reducido (GSH)

Se elabor3 una curva de calibraci3n de GSH utilizando el ortoftaldehido (OPT) como indicador de fluorescencia a concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 y 5.0 µg/mL.

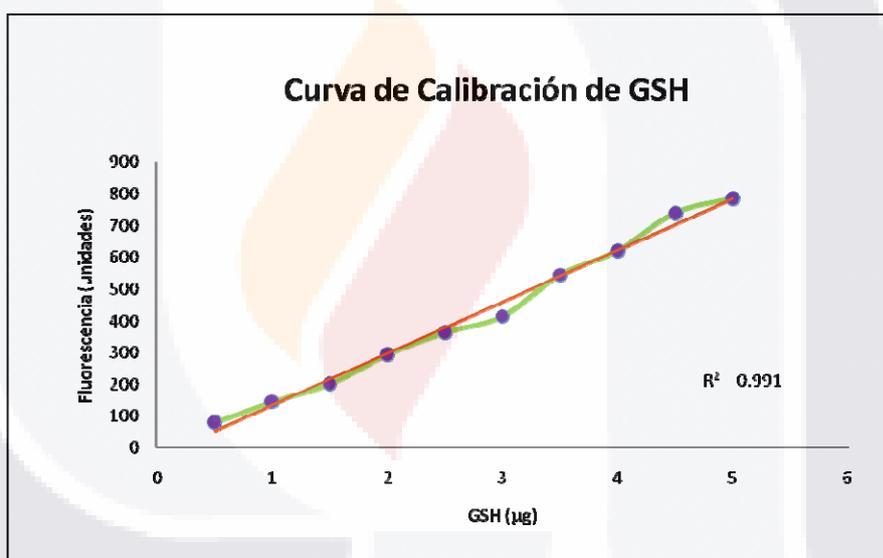


Figura 6.9. Curva de calibraci3n de glutati3n reducido (GSH).

6.8. Determinaci3n de la actividad de GST (Habig y col, 1974)

A nivel intracelular la actividad de estas enzimas se localiza principalmente en la fracci3n soluble del citosol y en menor proporci3n en la membrana del retículo endoplásmico. El hígado, los riñones, los testículos, el intestino y la glándula adrenal son los principales sitios con mayor actividad de GST_s (Glen

y Jay, 1986). La GST cataliza la reacción entre el sitio nucleofílico del grupo sulfidrilo del GSH con el sitio electrofílico de un átomo de carbono de un compuesto, formándose un enlace de tipo tioéster (Alin y col, 1989). Esta reacción representa el primer paso en la formación de N-acetilcisteína (ácido mercaptúrico) que es eliminado en la orina y en la bilis.

Para determinar la actividad de la GST, el compuesto comúnmente utilizado es el 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por su conjugación con el GSH. El CDNB reacciona rápidamente con el GSH en presencia de la GST como catalizador (120 U/g de hígado). (Akerboom y Sies, 1989). El GSH es convertido enzimáticamente a 2,4-dinitrofenil-S-conjugado (DNP-SG) por la Glutación-S-transferasa como lo muestra la reacción siguiente:



6.9. Curva de calibración de la Glutación-S-transferasa.

Se elaboró una curva de calibración de GST utilizando el CDNB a concentraciones de 1.0, 5.0, 10, 20 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

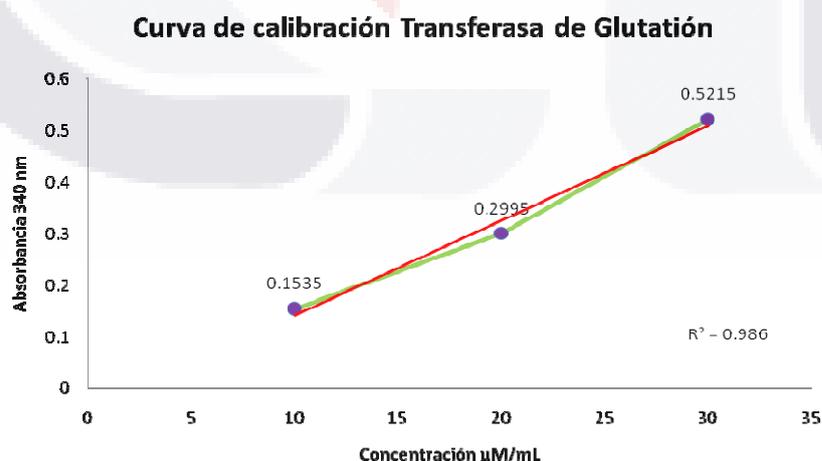
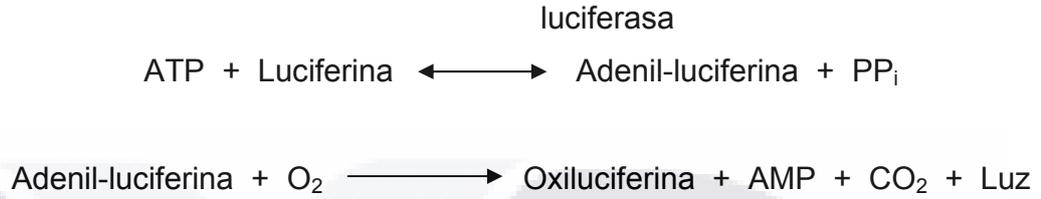


Figura 6.11. Curva de calibración de glutación-S-transferasa (GST).

6.10. Cuantificación de ATP.

El ATP fue cuantificado por bioluminiscencia. En la reacción, al consumirse el ATP se emite luz cuando la luciferasa (luciérnaga) cataliza la oxidación de la d-luciferina:



Las condiciones en el procedimiento fueron:

- Bioluminiscencia
- Filtro: S-Golay
- Slit: 5
- Voltaje: automático (ajustado por el equipo)

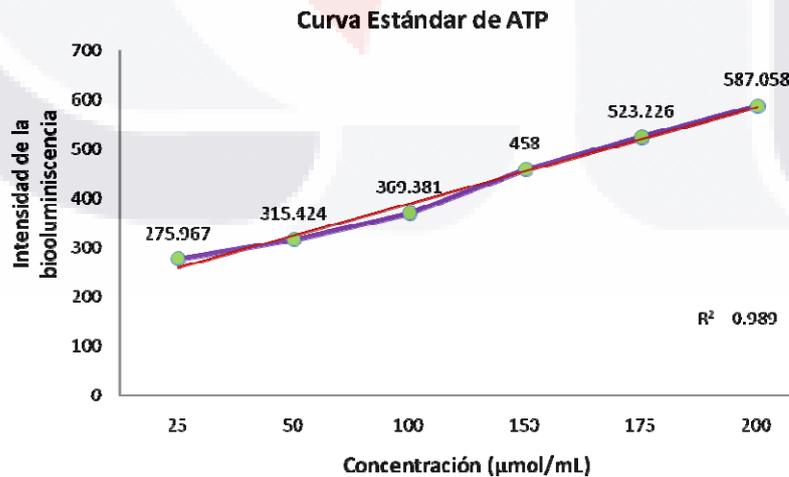


Figura 6.12. Curva de calibración de ATP.

VII. RESULTADOS

- **Parámetros fisiológicos**

7.1. Actividad de Transaminasas

En las figuras 7.1-1 y 7.1-2 se presenta los resultados obtenidos de las actividades enzimáticas en plasma de las transaminasas GOT y GPT. El grupo expuesto a malatión mostró una elevación significativa de las actividades plasmáticas de GOT y GPT, 2324% y 1472% respectivamente a los 10 días de tratamiento con respecto a los valores controles, mientras que a los 5 días de tratamiento la actividad enzimática aumentó 1487% para la actividad de GOT y 1763% para la actividad de GPT con respecto al grupo control, mientras que en las ratas tratadas con malatión + EGb estos incrementos fueron de 219.85% para la GOT y 43.66% para GPT a los 10 días de tratamiento.

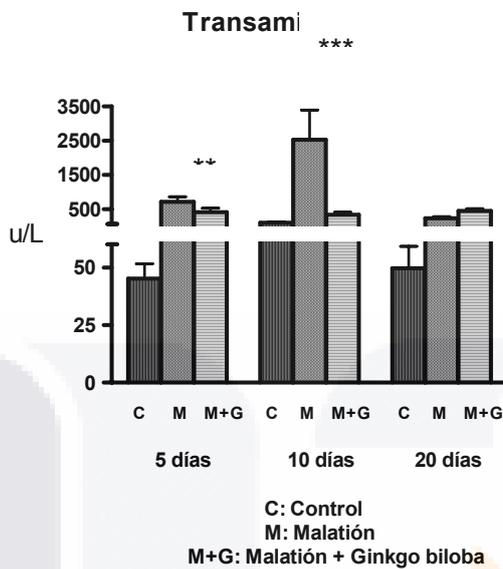


Figura 7.1-1. Actividad plasmática de GOT en ratas tratadas con Malatión (25mg/Kg/día, oral) v.o) y malatión+EGb (4mg/kg/3 veces/semana, i.p) **P<0.01 y ***P<0.001

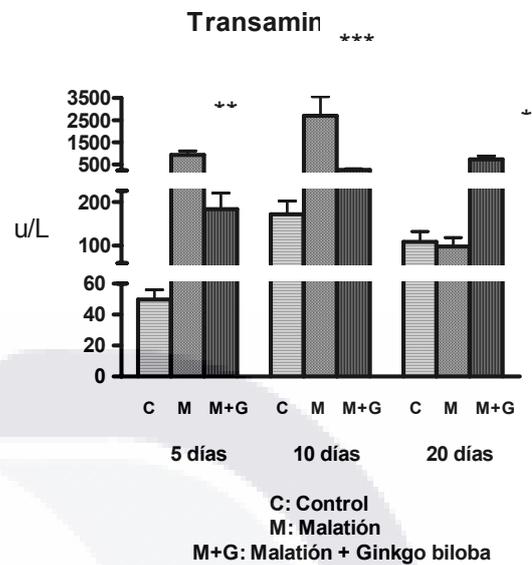


Figura 7.1-2. Actividad plasmática de GPT en ratas tratadas con Malatión(25mg/kg/día, v.o) y malatión+EGb (4mg/kg/3 veces/semana, ip) **P<0.01, ***P<0.001 y *P<0.05

7.2. Malondialdehido

En la figura 7.2 se muestran los resultados obtenidos de malondialdehido. Con relación a las ratas tratadas con malatión+EGb se obtuvo un aumento significativo, a los 20 días de tratamiento con respecto a las ratas control, 90.4%. En relación a los animales que recibieron malatión no se observaron diferencias significativas en comparación con el grupo control.

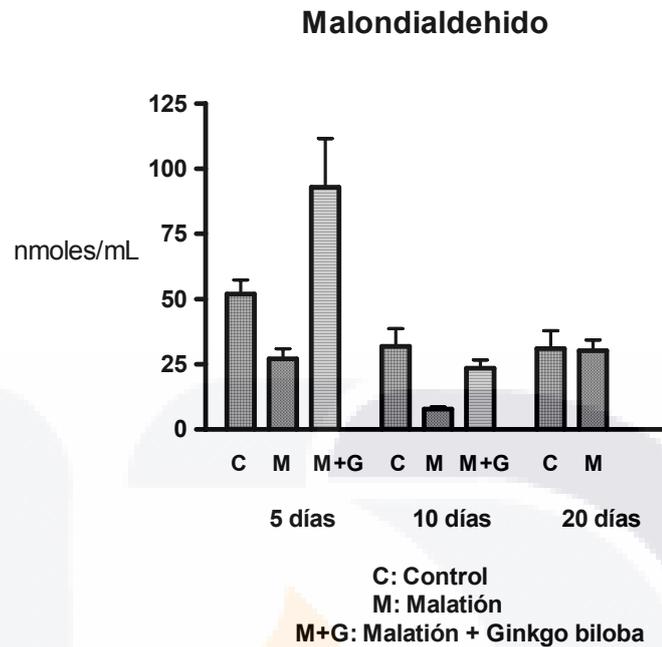


Figura 7.2. Concentraciones plasmáticas de MDA en ratas tratadas con Malatión (25mg/Kg/día, oral) malatión+EGb (4mg/kg/3 veces/semana, ip)

7.3. Transferasa de Glutación

En la figura 7.3 se presenta los resultados obtenidos con respecto a la enzima transferasa de glutatión. El grupo de animales tratados con el insecticida malatión mostró una disminución en la concentración de la enzima con respecto al grupo control, así como el grupo que recibió malatión+EGb mostró un descenso con respecto al control, 29.9% y 57.6% respectivamente.

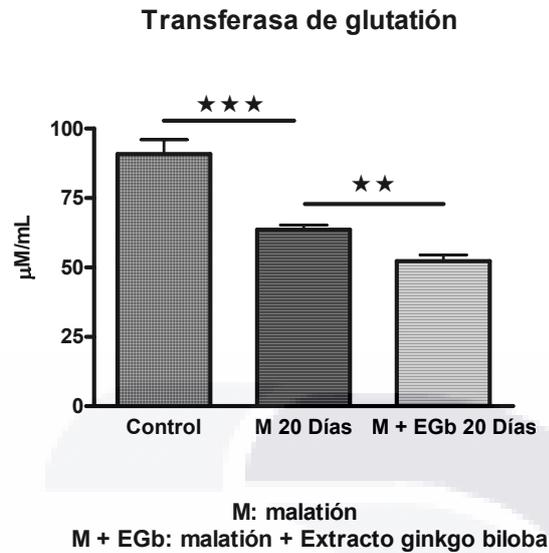


Figura 7.3. Concentraciones de transferasa de GSH en homogeneizado de hígado en ratas tratadas con Malatión (25mg/Kg/día, oral) malatión+EGb (4mg/kg/3 veces/semana, ip) ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$

7.4. Glutatión

En la figura 7.4 se muestran los resultados obtenidos de glutatión reducido. Las concentraciones de GSH en los homogeneizados de hígado aumentó en los animales expuestos a malatión+EGb, 38% en relación a los valores control. Sin embargo, el grupo que fue intoxicado con malatión no mostró ninguna diferencia con respecto al grupo de animales control.

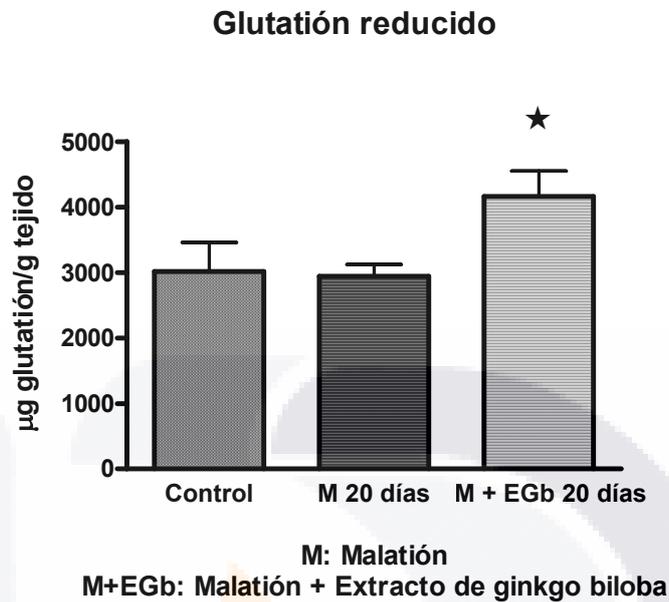


Figura 7.4. Concentraciones de GSH en homogeneizado de hígado en ratas tratadas con Malatión (25mg/Kg/día, oral) malatión+EGb (4mg/kg/3 veces/semana, ip) * $P < 0.05$

7.5. ATP

Con respecto a los valores control, las concentraciones de ATP de los homogeneizados de los animales tratados con malatión disminuyó significativamente, 70.3%. El grupo de animales tratados con malatión+EGb mostró un aumento estadísticamente significativo en comparación con el grupo intoxicado con el malatión, 85%.

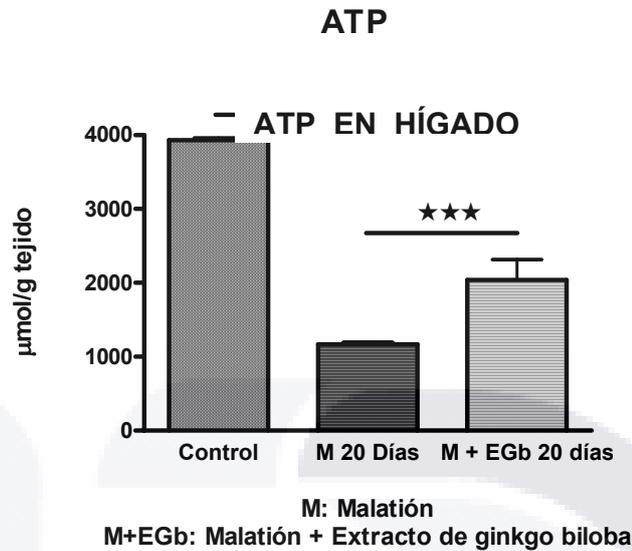
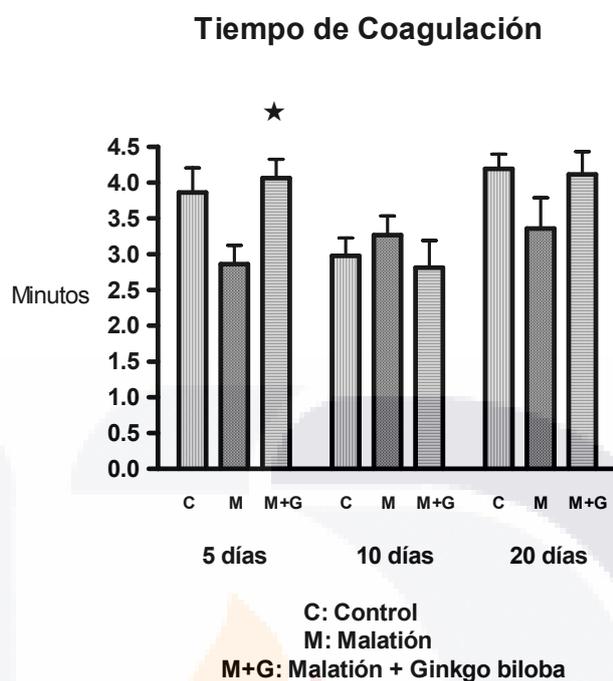


Figura 7.5. Concentraciones de ATP en homogeneizado de hígado en ratas tratadas con Malatión (25mg/Kg/día, oral) malatión+EGb (4mg/kg/3 veces/semana, ip) *** $P < 0.001$

7.6. Tiempo de coagulación

En la figura 7.6 se presenta el resultado obtenido del tiempo de coagulación. El grupo de animales tratados con el insecticida malatión mostró una disminución en el tiempo de la coagulación sanguínea con respecto al grupo control a los 5 y 20 días de tratamiento, 26% y 9% respectivamente. Así mismo, el grupo que recibió malatión+EGb mostró un incremento, 11.8%, con respecto al control a los 5 días de tratamiento.



*Figura 7.6. Curso temporal de las alteraciones de la coagulación sanguínea en ratas Wistar macho tratadas con Malatión (25mg/Kg/día, oral) y malatión+EGb(4mg/kg/3 veces/semana, i.p). *P<0.05*

7.7. Tiempo de sangrado

En la figura 7.7 se presenta el resultado obtenido del tiempo de sangrado. El grupo de animales tratados con el insecticida malatión mostró un incremento significativo en el tiempo de sangrado con respecto al grupo control a los 10 y 20 días de tratamiento, 90% y 190% respectivamente. Por otra parte, el grupo que recibió malatión+EGb mostró un incremento, 127% con respecto al control a los 10 días de tratamiento.

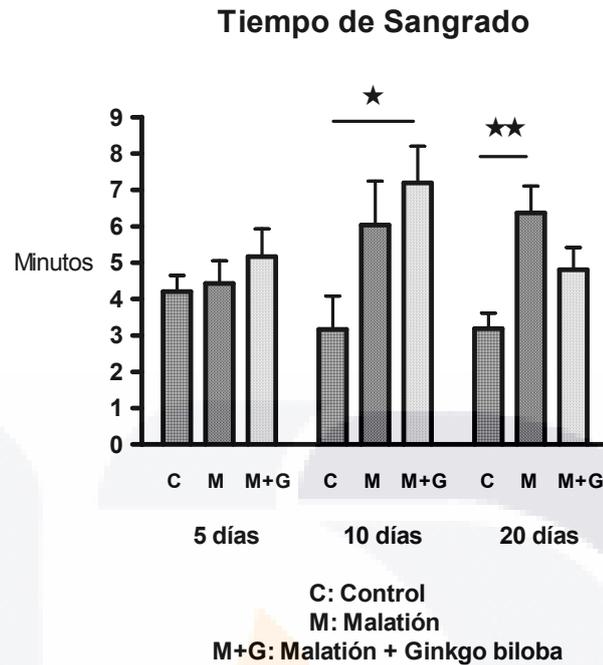


Figura 7.7. Curso temporal de las alteraciones del tiempo de sangrado en ratas Wistar macho tratadas con Malatión $P > 0.05$ (25mg/Kg/día, oral) y malatión+EGb(4mg/kg/3 veces/semana, i.p)

* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$

7.8. Tiempo de protrombina

En la figura 7.8 se muestran los resultados obtenidos del tiempo de protrombina. Con relación a las ratas tratadas con malatión se obtuvo un aumento, 27% a los 10 días de tratamiento con respecto a las ratas control, mientras que a los 5 días de tratamiento en animales tratados con malatión+EGb hubo un incremento en el tiempo de protrombina de 121% con respecto al grupo control.

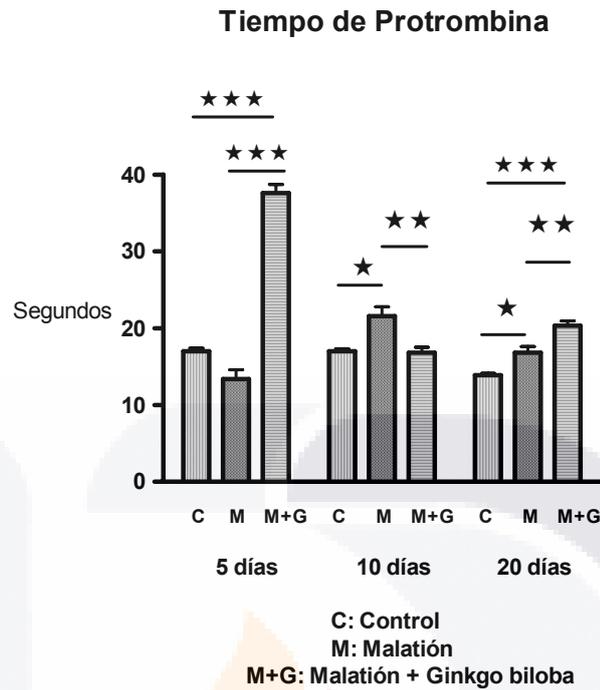


Figura 7.8. Curso temporal de las alteraciones del tiempo de protrombina en ratas Wistar tratadas con Malatión (25mg/Kg/día, oral) y malatión+EGb(4mg/kg/3 veces/semana, i.p).

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$

7.9. Tiempo parcial de tromboplastina

En la figura 7.9 se muestran los resultados obtenidos del tiempo parcial de tromboplastina. Con relación a las ratas tratadas con malatión se obtuvo un aumento, 46% a los 10 días de tratamiento con respecto a las ratas control, mientras que a los 5 días de tratamiento en animales tratados con malatión+EGb hubo un incremento en el tiempo parcial de tromboplastina de 179% con respecto al grupo control.

Tiempo parcial de Tromboplastina

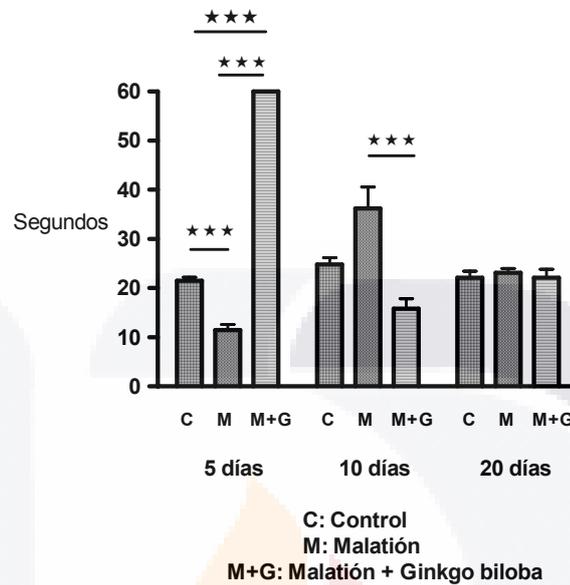


Figura 7.9. Curso temporal de las alteraciones del tiempo parcial de Tromboplastina en ratas Wistar tratadas con Malatión (25mg/Kg/día, oral) y malatión+EGb(4mg/kg/3 veces/semana, i.p).

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$

7.10. Factores de Coagulación (II, V, VII y X).

En la figura 7.10 se presenta el resultado obtenido del porcentaje de actividad de los factores de coagulación II, V, VII y X. El valor normal del porcentaje de actividad de los factores oscila entre 80-100%. El grupo de animales tratados con el insecticida malatión mostró una disminución en el porcentaje de actividad de los factores II y X, así como el grupo tratado con malatión+EGb.

Actividad Sérica de Factores de Coagulación

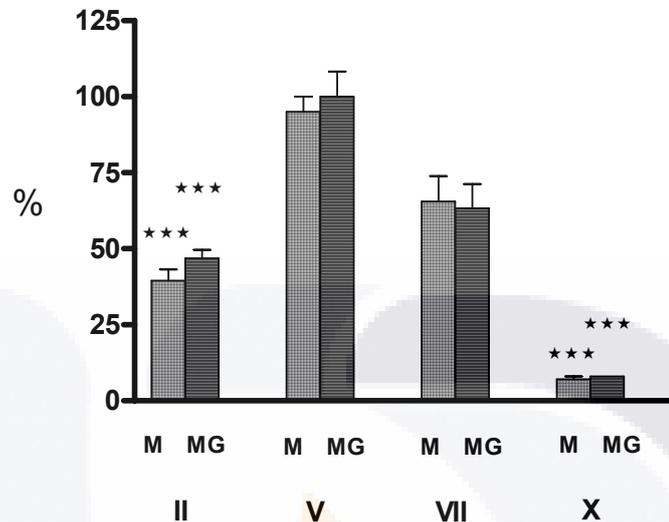


Figura 7.10. Porcentaje de actividad de los factores de coagulación II, V, VII y X en ratas tratadas con malatión (25mg/Kg/día, oral) malatión+EGb (4mg/kg/3 veces/semana, ip)

*** $P < 0.001$

7.11. Evaluación estructural.

En las figuras 7.11 y 7.11-3 puede apreciarse la organización hepática normal de uno de los animales del grupo control.

El tejido hepático de las ratas tratadas con malatión presenta algunos hepatocitos con citoplasma homogéneo y aumento de acidofilia con el núcleo picnótico (figuras 7.11-1 y 7.11-4).

El tejido hepático de las ratas tratadas con malatión+EGb mostró que los hepatocitos no presentaron daño celular (figuras 7.11-2 y 7.11-5).

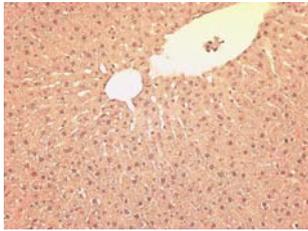


Figura 7.11. Hígado de rata Control. Arquitectura hepática Normal. Tinción H&E. 100 aumentos

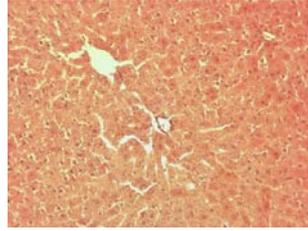


Figura 7.11-1. Hígado de rata tratada con malatión. Tinción H&E. 100 aumentos



Figura 7.11-2. Hígado de rata tratada con malatión+EGb. Tinción H&E. 100 aumentos.

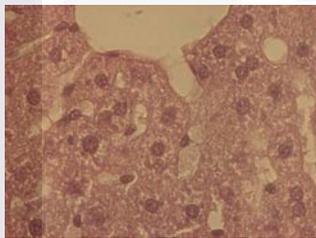


Figura 7.11-3 Hígado de rata Control. Arquitectura hepática Normal. Tinción H&E. Tinción H&E. 400 aumentos

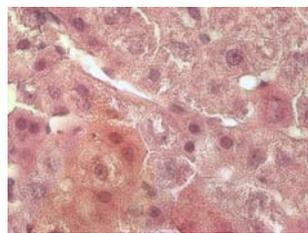


Figura 7.11-4. Hígado de rata tratada con malatión. Tinción H&E 400 aumentos

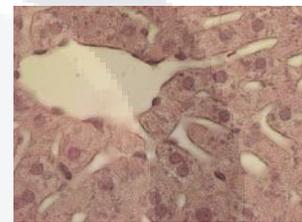


Figura 7.11-5. Hígado de rata tratada con malatión+EGb. 400 aumentos.

VII. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, la producción mundial de los plaguicidas ha crecido de manera acelerada y se ha llegado a situaciones de uso excesivo e indiscriminado de estos xenobióticos. Esto ha permitido su distribución amplia en el ambiente y la producción de efectos nocivos sobre los seres vivos. En los mamíferos, la toxicidad aguda de los plaguicidas organofosforados se debe a la inhibición de la acetilcolinesterasa, lo que permite la acumulación de la acetilcolina en las sinapsis colinérgicas (Taylor y Palmer, 1991).

Otros efectos generados por estos compuestos son el daño sobre el proceso de la hemostasia y el aumento en el estrés oxidativo de las células. Respecto a las alteraciones hemostáticas, Ziemen (1984) estudió la función de las plaquetas y algunos parámetros de la coagulación sanguínea, en nueve pacientes intoxicados con plaguicidas organofosforados; en cinco de ellos, se encontró una marcada tendencia a la aparición de hemorragias, además, la función de las plaquetas (agregación) fue irregular en todos los pacientes y las anomalías de la coagulación fueron más pronunciadas en los casos de intoxicaciones severas. Por otra parte, en años recientes, se ha encontrado que los plaguicidas organofosforados pueden aumentar la producción celular de especies reactivas de oxígeno (ROS). Entre las ROS, los aniones superóxido, los radicales hidroxilo y el peróxido de hidrógeno incrementan el estrés oxidativo e inducen lipoperoxidación en las membranas de las células (Ahmed et al, 2000; Yarsan et al, 1999).

En este contexto, la importante función ejercida por el hígado en el proceso de biotransformación del malatión, y en general de los plaguicidas organofosforados, lo hace particularmente susceptible al daño producido por estos compuestos. Sin embargo, el extracto estandarizado de las hojas del

Ginkgo biloba (EGb) contiene flavonoides antioxidantes que podrían contrarrestar algunos de los efectos tóxicos producidos por el malatión.

• **Efecto del EGb sobre el daño hepático producido por la administración subaguda de malatión. Actividades séricas de GOT y GPT**

En los mamíferos, la transaminasa glutámico-pirúvica (GPT) y la transaminasa glutámico-oxalacética (GOT) son enzimas que abundan en tejidos con actividad metabólica elevada, particularmente en el hígado; por ello, se han utilizado para diagnosticar alteraciones fisiopatológicas de este órgano, como la hepatitis y la cirrosis, así como el daño producido por los xenobióticos (Fischbach, 1989).

En este contexto, para valorar la posible existencia de daño hepático por la administración de malatión, se analizaron las actividades plasmáticas de GOT y de GPT. En comparación con el grupo control, las actividades plasmáticas de GOT y GPT mostraron un incremento significativo en el grupo intoxicado con malatión, a los 5 y 10 días de tratamiento; además, las actividades de estas enzimas, en general, fueron menores en los animales tratados con malatión+EGb que en las ratas que solamente recibieron malatión. Esto significa que el EGb tuvo un efecto protector contra el daño inducido por el malatión en las células hepáticas.

Como ya se señaló, las transaminasas son enzimas indicadoras de daño hepático ya que en condiciones normales su localización es citoplasmática, pero cuando los hepatocitos son destruidos (necrosis celular) estas enzimas se liberan a la circulación sanguínea en donde se pueden detectar aumentos importantes de su actividad (Recknagel et al, 1991; Esteller y Cordero, 2001). La necrosis celular se puede relacionar con el aumento del estrés oxidativo y la inducción de lipoperoxidación en las membranas de las células, producidos por los plaguicidas organofosforados (Ahmed et al, 2000; Yarsan et al, 1999). Además, la naturaleza lipofílica de

estos compuestos (malatión, paratión metílico, paratión etílico, etc) facilita su interacción con la membrana celular y conduce a la alteración de la estructura de la bicapa de fosfolípidos (Videira et al, 2001). Dado que el extracto de hojas de Ginkgo biloba contiene flavonoides antioxidantes que actúan como atrapadores de radicales libres, evitaron con ello el daño a las membranas de las células hepáticas (Smith y Luo, 2004).

Malondialdehído

La oxidación es un mecanismo químico utilizado por nuestro organismo para producir y degradar sustancias, pero está fundamentalmente ligado a la producción de energía. El oxígeno está involucrado en tales mecanismos de oxidación, los cuales son controlados celosamente por las células, especialmente por el sistema antioxidante, por lo que debe haber un balance oxidación/antioxidación. El desequilibrio entre los mecanismos oxidantes y los antioxidantes provoca estrés oxidativo, el cual da lugar a la lipoperoxidación de las membranas de las células. Los productos finales de la lipoperoxidación son lípidos oxidados que al degradarse originan nuevos RL y una amplia variedad de compuestos citotóxicos como los aldehídos, entre ellos el malondialdehído (MDA) (Chihuaílaf et al., 2002).

Con relación al grupo control, en el estudio realizado se encontró que la administración de malatión a las ratas no cambió significativamente la concentración de MDA en el plasma; sin embargo, paradójicamente, las ratas tratadas con malatión+Gb presentaron un incremento significativo en la concentración plasmática de malondialdehído, a los 20 días de tratamiento.

En contraposición a los hallazgos encontrados en el grupo tratado con malatión, Fortunato (2006) realizó un estudio en el cual la administración de malatión (25, 50 y 100 mg/kg) provocó estrés oxidativo, medido a través de MDA en eritrocitos, en hígado y en el cerebro de ratas. Además, Delgado y colaboradores (2006) reportaron que en ratas tratadas crónicamente con

malatión (25, 50, 100 y 150 mg/kg/28 días, ip) se generaron alteraciones en la respiración mitocondrial y estrés oxidativo, acompañadas de lipoperoxidación membranal, en alguna áreas del sistema nervioso central como el hipocampo, pero no en la corteza ni en el cerebelo.

Transferasas de glutatión

Las transferasas de glutatión (GST) son enzimas que se localizan principalmente en el citoplasma de las células y, en menor cantidad, en la membrana del retículo endoplásmico. El hígado, los riñones, los testículos, el intestino y las glándulas suprarrenales son los órganos con mayor actividad de estas enzimas (Glenn y Jay, 1986). Las GST son una familia de enzimas involucradas en la dextoxicación de xenobióticos y de sustancias reactivas endógenas (Koppele y Mulder, 1991). Las GST neutralizan a los radicales libres catalizando la reacción de estas sustancias con el grupo tiol (-SH) del glutatión reducido; con ello, se neutralizan los sitios electrófilos de los radicales libres y se incrementa su hidrosolubilidad.

En este trabajo se encontró que la concentración hepática de la TGS disminuyó en el grupo de ratas tratadas con malatión, en comparación con el grupo control; esto puede ser debido a la participación de la enzima en la destoxicación del malatión o al daño hepático producido por este plaguicida. Ha sido reportado que en ratas tratadas con plaguicidas organofosforados se presenta daño estructural del hígado, caracterizado por cambios en el contenido de cromatina del núcleo de los hepatocitos, aumento de la densidad del citoplasma y del contenido de lípidos, así como presencia notoria de vacuolas (Salim et al, 2004). En este contexto, el grupo tratado con malatión+EGb mostró una disminución de la concentración de la TGS, en comparación con el grupo control y con el grupo que recibió malatión, lo que significa que la administración de EGb no mejoró la síntesis de esta enzima en el hígado. Es pertinente señalar que en ausencia de xenobióticos

y de daño hepático, el EGb ha demostrado capacidad para incrementar la síntesis de la TGS en este órgano (Shinozuka et al, 2002; Sugiyama et al, 2004).

Concentración hepática de GSH

El GSH junto con las GST representa el principal mecanismo de protección antioxidante con el que cuentan las células para contrarrestar los daños provocados por los agentes tóxicos o sus metabolitos activos (Koppele y Mulder, 1991). El hígado es el principal órgano sintetizador de GSH, sin embargo, bajo ciertas circunstancias, las concentraciones celulares de glutatión se reducen en respuesta al estrés oxidativo y a la presencia de metabolitos tóxicos derivados de los xenobióticos (Griffith, 1999; Lu, 2000, 2002).

El grupo de ratas tratadas con malatión no mostró una variación en los niveles hepáticos de GSH, en comparación con el grupo control, lo que significa que las concentraciones celulares de GSH no fueron abatidas por la presencia del plaguicida, debido al proceso de síntesis de este antioxidante. Además, en las ratas tratadas con malatión+EGb, la concentración hepática de GSH aumentó, en comparación con el grupo control y el intoxicado con malatión. Esto puede ser explicado por la capacidad de los flavonoides presentes en el EGb para incrementar la síntesis de sustancias antioxidantes en el hígado, como el GSH (Gohil y Packer, 2002).

Concentración hepática de ATP

Con relación a las concentraciones de ATP en los homogeneizados de tejido hepático, éstas disminuyeron significativamente en el grupo tratado con malatión, en comparación con el grupo control. Al respecto, debe señalarse que el aumento del estrés oxidativo producido por el malatión afecta la cadena respiratoria de las mitocondrias y daña la membrana de estos

organelos, conduciendo a la disminución en la síntesis de ATP (Delgado et al, 2006). En efecto, Fortunato et al (2006) demostraron que el malatión es biotransformado en el organismo generando malaoxon (metabolito activo), el cual da lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno y, por tanto, a la lipoperoxidación lipídica causante de la disminución de ATP en las células. Además, la naturaleza lipofílica del malatión permite que interaccione con mayor facilidad con las membranas celulares y provoque perturbación en la estructura de la bicapa lipídica. Esa interacción también afecta la función de las mitocondrias (organelos donde se sintetiza el ATP) y contribuye a disminuir los niveles de ATP en las células.

Con respecto al grupo tratado con malatión+EGb, se observó un aumento en la concentración de ATP, en comparación con el grupo tratado solamente con malatión. Esto puede ser explicado porque el compuesto bilobalide del EGb tiene la capacidad de estimular el metabolismo energético de las células y la respiración mitocondrial, mientras que la fracción flavonoide ejerce su acción antioxidante, aumentando de esta manera los niveles de ATP en las células (DeFeudis y Drieu, 2000; Smith y Luo, 2003).

- **Efecto del EGb sobre las alteraciones de la coagulación sanguínea producidas por la administración subaguda de malatión.**

Para ubicar nuestros resultados en el proceso de la hemostasia, se puede afirmar que los mecanismos involucrados en la coagulación de la sangre incluyen: a) la contracción vascular, b) la formación de un tapón plaquetario y c) la activación de los factores de la cascada de la coagulación. Estos mecanismos normalmente son rápidos y localizados, aunque no están exentos de riesgos. Así, la hemostasia en exceso conduce a trombosis (con obstrucción vascular e isquemia) y la *hemostasia insuficiente* conduce a la hemorragia persistente. El tapón formado por las plaquetas durante el proceso de coagulación evita la pérdida de sangre y participa en el inicio y

mantenimiento de las reacciones enzimáticas de la cascada de la coagulación. A su vez, la activación de los factores involucrados en esta cascada conduce a la formación de hilos de fibrina, los cuales proporcionan solidez y apoyo estructural al tapón formado por las plaquetas (Ruiz Argüellez, 1998).

Tiempo de Coagulación

Los resultados obtenidos de este trabajo mostraron que el tiempo de coagulación sanguínea no resultó afectado de forma significativa en los grupos tratados con malatión, en comparación con el grupo control. Se observó un aumento en el grupo tratado con malatión+EGb, a los 5 días de tratamiento con respecto al grupo control.

Tiempo de sangrado

El tiempo de sangrado (TS) es una prueba empleada para detectar la función de las plaquetas en la sangre. La disminución del TS puede ser debido a la disminución en el número de plaquetas circulantes, o bien, a la disminución de su función. En este trabajo, el tiempo de sangrado aumentó de manera significativa en los animales tratados con malatión (10 y 20 días) y en las ratas tratadas con malatión+EGb (10 días), comparados con el grupo control.

Este fenómeno puede ser explicado por la capacidad de los plaguicidas organofosforados para bloquear los receptores del PAF (Factor Activador de las Plaquetas, por sus siglas en inglés), lo que evita la agregación de las plaquetas y aumenta o prolonga el tiempo de sangrado (Miller, 1998; Fugh-Berman, 2000). Debe señalarse que el PAF es un fosfolípido endógeno potente que participa en otras funciones biológicas importantes, como la inflamación (liberación de histamina y serotonina) y el shock. Los niveles séricos del PAF son regulados por las acetilhidrolasas de

PAF (PAF-AHs) enzimas que también pueden ser inhibidas por los plaguicidas organofosforados (Quistad et al, 2005). Al respecto, de acuerdo con lo reportado por Ziemen (1984), en cinco de nueve pacientes intoxicados con plaguicidas organofosforados se encontraron hemorragias marcadas y alteraciones pronunciadas en la agregación de las plaquetas.

En este contexto, el EGb no evitó el aumento del TS producido por el malatión. Es pertinente señalar que, en los trabajos científicos reportados sobre este problema, existe una discrepancia sobre la capacidad del EGb para alterar el proceso de coagulación de la sangre. En efecto, clínicamente se ha reportado que el consumo del EGb genera alteraciones en el proceso de la hemostasia caracterizadas por sangrados (Yagmur et al, 2005). Además, en estudios experimentales *in vitro* se ha encontrado que cuando el ginkgólido B (un componente de la fracción terpénica del Gb) se incubaba con las plaquetas, disminuye de manera importante la unión del PAF con sus receptores, lo que evita la agregación de las plaquetas (Janssens, 1995). Sin embargo, en estudios clínicos realizados con 50 hombres sanos (55 años de edad) se encontró que la administración del EGb, 120 mg/día/7 días, no alteró el proceso de coagulación de la sangre ni de la agregación de las plaquetas (Köler et al, 2004).

Por otra parte, y en relación con estas alteraciones, se han reportado varios defectos cualitativos de las plaquetas durante la falla aguda y crónica del hígado (Ordinas et al, 1978; Lane et al, 1984.). En efecto, en cuadros de hepatitis aguda de distinta etiología (infecciosa, tóxica o inducida por drogas), así como en la hepatitis crónica, se han descrito anormalidades en la función de las plaquetas, como la disminución de la adhesividad y la alteración de la agregación primaria y secundaria con ADP, adrenalina, trombina y ristocetina. Estas alteraciones producen aumento del tiempo de sangrado y retracción anormal del coágulo (Heinrich, 1994).

Tiempo de protrombina.

El tiempo de protrombina (TP) explora las actividades de los factores que participan en la vía extrínseca de la cascada de la coagulación de la sangre (factores II, V, VII y X). Al ser todos estos factores producidos en el hígado, su alteración es indicadora de daño hepático. Por lo general, un TP prolongado indica un nivel bajo de uno o más factores del sistema de coagulación extrínseco (Laposata et al, 1989).

Con relación al grupo control, en nuestro estudio se encontró que el TP aumentó de manera significativa, en las ratas tratadas con malatión (10 y 20 días de tratamiento). Al respecto, nuestros resultados coinciden con lo reportado por otros autores, ya que, ha sido publicado que en los trabajadores expuestos a insecticidas organofosforados aparecen tiempos de protrombina prolongados (Holmes, 1956; Murray, 1994). Debe señalarse que el malatión daña al hígado y, por lo tanto, afecta la coagulación de la sangre disminuyendo las actividades de uno o más factores agrupados en el TP ya que tienen residuos de serina en su sitio activo. Esto permite que interactúen de manera covalente con el malaoxón que es el metabolito activo del malatión (Hazarika et al, 2003), lo que se relaciona con el aumento en el TP.

A pesar de que existen reportes que indican que el EGb no altera la coagulación de la sangre ni la agregación de las plaquetas, en nuestro trabajo, el grupo tratado con malatión+EGb mostró un aumento muy significativo en el TP, comparado con los grupos control e intoxicado con malatión, a los 5 y 20 días de tratamiento. Esto significa que durante la fase inicial de la intoxicación, el EGb aumenta el efecto producido por el malatión sobre el TP.

Una de las posibles causas de este fenómeno puede relacionarse con la capacidad del EGb para inducir la síntesis del citocromo P450 (CYP-P450), enzima involucrada en la biotransformación del malatión. Así, al aumentar la velocidad de formación del malaoxón y su concentración en las

células hepáticas, aumenta la intensidad de la inhibición de uno o más de los factores II, V, VII o X, aumentando, por consiguiente, el TP. Al respecto, Sugiyama et al. (2004) reportaron que una semana después de tratar ratas con el EGb (0.5% en el alimento), aumentaron de manera importante el peso del hígado, el contenido total de CYP-P450, las actividades de seis subtipos de CYP-P450 y la actividad de las transferasas de glutatión (GST). Además, Shinozuka et al (2002) reportaron que en ratas tratadas con EGb (0.5% en el alimento, durante cuatro semanas) se incrementó el peso del hígado y la concentración de fosfolípidos, aumentando también el contenido de CYP-P450 y la actividad hepática de la TGS. Adicionalmente, el EGb indujo marcadamente los niveles de CYP2B1/2, CYP3A1 y CYP3A2 mRNA en el hígado.

Por otra parte, clínicamente ha sido reconocido que, en la enfermedad hepática aguda, la existencia y la severidad de las alteraciones de la coagulación se reflejan en el aumento del tiempo de protrombina. Este parámetro ha sido considerado como un factor pronóstico de mayor utilidad que las concentraciones séricas de bilirrubinas, transaminasas o de albúmina, para valorar la evolución de los pacientes.

Tiempo parcial de tromboplastina

El tiempo parcial de tromboplastina (TPT) explora la vía intrínseca de la coagulación, es decir, los factores XII, XI, IX y VIII. Al ser todos estos factores producidos en el hígado, su alteración es índice de insuficiencia hepática. En este trabajo se encontró que el TPT aumentó de manera no significativa, en las ratas tratadas con malatión, en comparación con el grupo control, a los 20 días de tratamiento. Conviene señalar que los factores IX, XI y XII tienen serina en su estructura molecular, lo que les permite interactuar de manera covalente con la molécula del malaoxón, metabolito activo del malatión (Hazarika et al, 2003), conduciendo así al incremento del TPT. En este

contexto, Sweeney y Lyon (1999) demostraron que la exposición a varias dosis de malatión, por vía intraperitoneal, aumenta el TPT de manera significativa. Además, Lox y Davis (1983) al administrar malatión a ratas Sprague-Dawley en el agua de bebida (1 ppm, durante 6 meses) encontraron que este plaguicida incrementó tanto el TPT como el TP.

A su vez, el grupo tratado con malatión+EGb presentó un aumento muy significativo en el TPT, comparado con el grupo intoxicado con malatión y con el grupo control, a los 5 días de tratamiento. De manera semejante a lo descrito para el TP, la causa probable de este fenómeno puede relacionarse con la capacidad del EGb para inducir la síntesis del citocromo P450 (CYP-P450), enzima involucrada en la biotransformación del malatión (Sugiyama et al. 2004). Así, al aumentar la velocidad de formación del malaoxón y su concentración celular, aumenta el grado de inhibición de los factores IX, XI y XII y, por consiguiente, aumenta el TPT.

Actividades de los factores de coagulación II, V, VII y X.

El porcentaje de actividad normal de los factores de la coagulación II, V, VII y X se encuentra entre 80-100%. En este trabajo, con relación al grupo control, la actividad de los factores II y X disminuyó significativamente tanto en el grupo tratado con malatión como en el grupo tratado con malatión+EGb, a los 20 días de tratamiento; además, la actividad de los factores V y VII también disminuyó pero de manera no significativa. Estos datos muestran que el EGb no revierte la inhibición de los factores afectados por el malatión. Al respecto, la disminución de las actividades de los factores II y X pudo haber sido producida por: a) la inhibición de estas enzimas por el malatión (malaoxón) y b) un posible daño del hígado producido por el tratamiento con malatión. Como ya se señaló, estos factores tienen residuos de serina en su sitio activo, lo que permite que interactúen de manera covalente con el

malaoxón (metabolito activo del malatión), lo que los inactiva e incrementa el TP.

En este contexto, experimentalmente se ha encontrado que el tratamiento de ratas con malatión (1950 ppm en el agua de beber, durante 14 días) altera significativamente las actividades de los factores II, VII, X y XII, lo que significa que este plaguicida tiene un gran efecto nocivo sobre el proceso de coagulación de la sangre (Lox, 1985). Finalmente, conviene señalar que el hígado sintetiza la mayoría de los factores de la coagulación de la sangre (excepto los factores VIII y el de von Willebrand), así como algunas proteínas que regulan el sistema de la coagulación (antitrombina III, proteína C, etc.) y componentes del sistema fibrinolítico (plasminógeno y alfa 2 antiplasmina). Por ello, en la enfermedad o daño hepático se presentan diversas anomalías hemostáticas como: la síntesis anormal de fibrinógeno, la alteración funcional de los factores de la coagulación dependientes de vitamina K, etc. (Heinrich, 1994).

Evaluación histológica del daño hepático

Morfológicamente, las lesiones hepáticas producidas por la exposición a malatión se manifestaron en algunas células con cambios morfológicos que se asocian a daño celular. La picnosis nuclear y los cambios citoplásmicos descritos corresponden a la morfología clásica de la necrosis celular. Los hallazgos observados con la administración de malatión (25mg/kg) son el resultado del daño celular inducido por estrés oxidativo (Cotran et al., 2004). Al respecto, Sabina (2003) realizó un trabajo con ratas Wistar, en el cual la exposición a 8 mg y 16 mg de malatión por vía oral provocó cambios histológicos en el hígado, caracterizados por la aparición de restos celulares producto del daño celular inducido por el malatión. Por otra parte, el grupo de ratas tratadas con malatión+EGb no mostró ningún daño en las células hepáticas. Como ya se mencionó, la fracción flavonoide del extracto de Gb

tiene la capacidad de atrapar radicales libres (Smith y Luo, 2003), lo que hace suponer que la propiedad antioxidante del extracto de Gb provocó que las células hepáticas no fueran dañadas por la exposición al malatión, evitó el daño oxidativo.



IX. CONCLUSIÓN

1. El EGb protege a las células hepáticas de la necrosis producida por el malatión, ya que en general, las actividades séricas de las transaminasas estudiadas (GOT y GP) fueron menores en los animales tratados con malatión+EGb que en las ratas tratadas solamente con este plaguicida.
2. La concentración hepática de GSH fue mayor en las ratas tratadas con malatión+EGb comparada con los grupos control y tratados con malatión. Esto sugiere una mayor capacidad de los hepatocitos para defenderse de las agresiones producidas por los xenobióticos.
3. Con relación al grupo control, la concentración hepática de ATP disminuyó tanto en los animales tratados con malatión como en las ratas tratadas malatión+EGb. Sin embargo, la concentración de ATP fue significativamente mayor en el grupo malatión+EGb, comparada con el grupo tratado solamente con malatión. Esto muestra que el EGb disminuyó la magnitud del daño producido por el malatión a nivel de las mitocondrias.
4. El Tiempo de Protrombina y Tiempo parcial de Tromboplastina aumentan significativamente en las ratas tratadas con malatión y malatión+EGb a los 5 días de tratamiento.

X. BIBLIOGRAFÍA

- * Ahmed RS, Seth V, Pash ST, Banerjee BD: Influence of dietary on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food Chem Toxicol*, 38: 443-450, 2000.
- * Adams H: Adenosine-5-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase. In *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer Ed.), Academic Press, pp 539-543, 1963.
- * Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O: Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Hum Exp Toxicol*, 22 (4): 205-211, 2003.
- * Almeida WF: Vigilancia sistemática del ambiente. Residuos de plaguicidas. En: Albert, LA (Ed.), *Plaguicidas Salud y Ambiente*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, México, 1986.
- * Anderson C. *Química Clínica*. Primera edición. Interamericana Mc Graw-Hill. 1993.
- * Auguet M.; Clostre F.: Effects of an extract of *G. biloba* and diverse substances on the phasic and tonic components of the contraction of isolated rabbit aorta. *Gen. Pharmacol.* 14: 277-80(1983).
- * Barberá C. *pesticidas Agrícolas*. Cuarta edición. Omega S.A. Barcelona. ESPAÑA. 1989.
- * Chang F: Neurophysiological concomitants of soman-induced respiratory depression in awake, behaving guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol*, 102: 309-314, 1991.
- * Chihuailaf R., Contreras P., Wittwer F. *Patogénesis del estrés oxidativo*. *Veterinaria México*. Vol 33, número 3. Universidad UNAM. 2002.
- * Cremlyn R: *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica*. Editorial Limusa, 1 a. Edición, México, 1985.

- * Cohn VH, Lyle J: A fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem*, 14: 434-440, 1966.
- * Cotran and Robbins. *Pathologic Basis of Disease*, 7^a. Edición, USA, 2004.
- * Delgado HB, Streck EL, Quevedo JL, Dal-Pizzol F: Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress alter chronic malathion exposure. *Neurochem Res*, 31: 1021-1025, 2006.
- * Deskin R et al.: Parathion toxicity in perinatal rats exposed in utero. *Toxicol Lett*, 3: 1114, 1979.
- * De Feudis F.: *G. biloba extract: pharmacological activities and clinical applications*. Paris. Elsevier(1991).
- * Duque Zambrone FA et al: ¿Defensivos Agrícolas o Agrotóxicos? *Ciencia Hoje*, 4 (22): 42-52, 1986.
- * Esteller PA, Cordero SM: *Fundamentos de Fisiopatología*. McGraw-Hill – Interamericana, España, pp. 295-311, 2001.
- * Eyer F et al: Human parathion poisoning. A toxicokinetic analysis. *Toxicol Rev*, 22 (3): 143-163,2003.
- * Fischbach FT: *Manual de pruebas diagnósticas*. Editorial Interamericana-Mc Graw Hill, Tercera Edición, pp 79-116, 1989.
- * Fish AS: Organophosphorus Cholinesterase Inhibitors and Fetal Development. *Am J Obstet Gynecol*, 96: 1148-1154, 1966.
- * Fortunato IJ, Agostinho FR, Reus GZ, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J: Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. *Neurotox Res*, 9 (1): 23-28, 2006.
- * Fortunato J. et al: Malathion-induced Oxidative Stress in Rat Brain Regions. *Neurochem Res* 31:671-678. Brasil. 2006.
- *Fugh-Berman A: Herb-drug interactions. *Lancet*, 355-134-138, 2000.

* Giordano G, Afsharinejad Z, Guizzetti M, Vitalone A, Kavanagh TJ, Costa LG:

Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic modelo of glutathione deficiency. *Toxicol Appl Pharmacol*, 219 (2-3): 181-189,2007.

* Glenn S II, Jay GA: General principles of toxicology. In *Toxicology, The Basic Science of Poisons* (Curtis & Doull Eds), MacMillan Publishing Company, NY, 1986.

* Gupta RC, Milatovic S, Montine TJ, Dettbarn WD, Milatovic D: Oxidative stress involvement in neurotoxicity of organophosphates and carbamates. *Toxicol Sci*, 84 (1-S): 204-205, 2005.

* Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB: Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249: 7130-7139, 1974.

*Hazarika A, Sarkar SN, Hajare S, Kataria M, Malik J: Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats-a biochemical interaction study. *Toxicology*, 185: 1-8, 2003.

* Heinrich J: Haemostatic abnormalities in liver disease. In Colman RW (ed), *Hemostasis and Thrombosis*, 3th. Ed, JB Lippincott Co, Filadelfia, pp 906-920, 1994.

* Hellegouarch A. et al.: Comparission of the contractile effects on an extract of *G. biloba* and some neurotransmitters on rabbit isolated vena cava. *Gen. Pharmacol.* 16: 129-32 (1985).

* Henao HS, Corey OG: *Plaguicidas Inhibidores de las Colinesterasas*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, México, pp. 1- 26, 1991.

- * Hinson AJ, Roberts WD: Role of covalent and noncovalent interactions in cell toxicityEffects on proteins. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 32: 471-510, 1992.
- * Holmes JH, Gaon MD: *Trans. Amer. Clin. Climat. Ass.* 68-86, 1956.
- * Jacobs BP, Browner WS: Ginkgo biloba-a living fossil. *Am J Med*, 108: 341-342,2000.
- * Janssens D. et al.: Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by G. biloba extract and bilobalide. *Biochem. Pharmacol.* 50: 991-9 (1995).
- * Jaramillo-Juárez F, Reyes JL: Intrauterine exposure to parathion increases its disposition rate in postnatallife. *Biol Neonate*, 57: 200-206, 1990.
- * Jaramillo-Juárez F, Posadas del Río FA, Reyes JL, Rodríguez ML, Sánchez IE, Cuellar LH: Effects of intrauterine exposure to parathion on the activity of renal A TPases in offspring. *Journal of Applied Toxicology*, 9 (6): 401-405, 1989.
- * Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK: Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Rad. Biol. Med.* 20:251-256. 1996.
- * Karam M., Ramírez G., Bustamante P., Galván J. Plaguicidas y salud de la población. *Ciencia Ergo Sum*, noviembre, año/vol. 11, número 003. pp: 246-254. Universidad Autónoma del Estado de Méxcio. Toluca, Méxcio.
- * Kaufer M: ¿Cómo Suelen Contaminarse los Alimentos? *Cuadernos de Nutrición*, 1, Enero-Febrero, 33-38, 1984.
- * Kehrer JP: Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Rev Toxicol*, 23: 21-48, 1993.

- * Koppele JM, Mulder GJ: Stereoselective glutathione conjugation by subcellular fractions and purified glutathione-S-transferases. *Drug Metab Rev*, 23: 331-354, 1991.
- * Köler S, Funk P, Kieser M: Influence of a 7-day treatment with Ginkgo biloba special extract EGb 761 on bleeding time and coagulation-a randomized, placebo-controlled, double-blind study in healthy volunteers. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 15(4): 303-309, 2004.
- * Kramer RE, Ho IK: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methyl parathion. *Chinese Medical Journal*, 65 (5): 187-199, 2002.
- * Lane D. A., Ireland H., Wolff S., Ranasinghe E., Dawes J. 1984. Detection of enhanced in vivo platelet alpha-granule release in different patient groups-comparison of beta-thromboglobulin, platelet factor 4 and thrombospondin assays. *Thrombosis and Haemostasis*, 52(2):183-187.
- * Laposata M et al.: *The Clinical Hemostasis Handbook*. Year Book Medical Publishers, Inc, First Edition, Chicago, pp 163-279, 1989.
- * Lombera González G: Los plaguicidas en México-Un Problema de Salud Pública. *Boletín de Morbilidad y Mortalidad (SSA)*, 1 (15): 1-5, 1994.
- * Lox CD: Effects of acute pesticide poisoning on blood clotting in the rat. *Ecotoxicol Environ Saf*, 7: 451-454, 1983.
- * Lox CD, Davis JR: The effects of long-term malathion or diazinon ingestion on the activity of hepatic synthesized clotting factors. *Ecotoxicol Environ Saf*, 7(6): 546-551, 1983.
- * Lox CD: Short term malathion ingestion and blood clotting in the rat. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 6: 51-55, 1985.
- * Maxwell RJ: Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 49: 345-361, 1995.

- * Milatovic D, Gupta RC, Aschner M: Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *Scientific World Journal*, 6: 295-310, 2006.
- * Miller LG: Herbal medicines. *Arch Intern Med*, 158(9): 2200-2211, 1998.
- * Murray JC: *Emerg Care*, 10: 289-290, 1994.
- * Organización Mundial de la Salud, International Programme on Chemical Safety: Organophosphorus Insecticides-A General Introduction. Geneva, Switzerland, Environmental Health Criteria, No. 63, 1986.
- * Ordinas A., Maragall S., Castillo R., Nurden A. T. 1978. A glycoprotein I defect in the platelets of three patients with severe cirrhosis of the liver. *Thrombosis Research*, 13(2):297-302.
- * Pietri S, Seguin J, d' Arbigny P, Drieu K, Culcasi M: Ginkgo biloba extract (EGb 761) pre-treatment limits free radicals-induced oxidative stress in patients undergoing coronary bypass surgery. *Cardiovasc Drugs Ther*, 11: 121-131, 1997.
- * Piña-Guzmán B, Solís-Heredia MJ, Rojas-García AE, Urióstegui-Acosta M, QuintanillaVega B: Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*, 216 (2): 216-224, 2006.
- * Quistad GB, Fisher KJ, Owen SC, Klintenberg R, Casida JE: Platelet-activating factor acetylhydrolase: selective inhibition by potent n-alkyl-methylphosphonofluoridates. *Toxicol Appl Pharmacol*, 205(2): 149-156, 2005.
- * Recknagel RO, Glender Jr EA, Britton RS: Free radical damage and lipid peroxidation. In Meeks RG (ed.), *Hepatotoxicology*. CRC Press, Florida, pp. 401-436, 1991.
- * Reed JD: Glutathione- Toxicological Implications. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 30: 603-631, 1990.

- * Reed JD: Chemical toxicity and glutathione regulation. Crisp Data Base (NIOH), 1994.
- * Repetto M, Martínez M, Sanz P: Actualización de la Toxicología de los Plaguicidas. En Toxicología Avanzada (M. Repetto Editor), Editorial Díaz de Santos, Primera Edición, Cap. 14, pp 557-601, 1995.
- * Roberfroid M, Buc Calderón P: Antioxidants and radical scavengers. In free radicals and oxidation phenomena in biological systems. First edition. Marcel Dekker, Inc, Chapter 5, pp 207-223, 1995.
- * Rodríguez ML, Jaramillo Juárez F: Introducción al Estudio de la Toxicología. En Toxicología Básica (Jaramillo-Juárez F, Rincón-Sánchez AR y Posadas del Río FA, Eds), Primera Edición, UAA-U de G-UJED, Serie Textos Universitarios, Cap 1, pp 11-20,2006.
- * Satar S, Satar D, Tap MD, Kseoglu Z, Kaya M: Ultraestructural changes in rat liver treated with prolidoxime following acute organophosphate poisoning. M Sinai J Med, 71(6): 405-410, 2004.
- * Schlebusch H, Rick W, Lang H, Knedel M: Dtsc. Med. Wschr, 99: 765, 1974.
- * Shinozuka K, Umegaki K, Kubota Y, Tanaka N, Mizuno H, yamauchi J, nakamura K, Kunitomo M: Feeding of Ginkgo biloba extract (EGb) enhances gene expresión of hepatic cytochrome P-450 and attenuates the hypotensive effect of nicardipine in rats. Life sci, 70(23): 2783-2792, 2002.
- * Sierpina VS: Ginkgo boloba. Am Fam Physician, 68: 923-926,2003.
- * Siller López FR: Toxicología Hepática. En Toxicología Básica (Jaramillo-Juárez F, Rincón-Sánchez AR y Posadas del Río FA, Eds), Primera Edición, UAA-U de G-UJED, Serie Textos Universitarios, Cap 8, pp 117-135,2006.

- * Smith JV, Luo Y: Elevation of oxidative free radical s in Alzheimer' s diseases models can be attenuated by Ginkgo biloba extract Egb 761. *J Alzheimer's Dis*, 5: 287-300. 2003.
- * Smith JV, Luo Y: Studies on molecular mechanisms ok Ginkgo biloba extract. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004. 64: 465-472.
- *Sugiyama T, Kubota Y, Shinozuka K, Yamada S, Yamada K, Umegaki K: Induction and recovery of hepatic drug metabolizing enzymes in rats treated with Ginko biloba extract. *Food Chem Toxicol*, 42(6): 953-957, 2004.
- * Sweeney MI, Lyon ME: Selective effect of malathion on blood coagulation versus locomotor activity.
- * Taylor Palmer: Agentes Anticolinesterásicos. En Goodman y Gilman, *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, Octava Edición, Editorial Médica Panamericana, Cap. 7, pp 143-160, 1991.
- * Teimouri F, Amirkabirian N, Esmaily H, Mohammadirad A, Aliahmadi A, Abdollahi M: Alteration of hepatic cells glucose metabolism as a non-cholinergic detoxication mechanism in counteracting diazinon-induced oxidative stress. *Hum Exp Toxicol*, 25 (12): 697-703, 2006.
- * Turrens JF, Freeman BA, Levitt JG, Crapo JD: The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys*, 217: 401-410, 1982.
- * United Nations Environment Programme: *The State of the World Environment*. Nairobi, Kenya, UNEP, 1987.
- * Videira RA, Antunes-Madeira MC, Lopes VI, Madeira VM: Changes induced by malathion, methylparathion and parathion on membrane lipid physicochemical properties correlate with their toxicity. *Biochim Biophys Acta*, 1511: 360-368, 2001.

- * Waliszewski S, Pardío Sedas V: Plaguicidas en México. Ciencia y Desarrollo, 105: 139144, 1992.
- * WHO: Environmental Health Criteria, Vol 145, pp 244, 1993.
- * Wilson IB: The inhibition and reactivation of acetylcholinesterase. Ann NY Acad Sci, 135: 177-183, 1966.
- *Yarsan E, Tanyuksel M, Celik S, Aydin A: Effects of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. Bull Environ Contam Toxicol, 63: 575-581, 1999.
- * Yagmur E, Piatkowski A, Gröger A, Pallua N, Gressner AM, Kiefer P: Bleeding complication under Ginkgo biloba medication. Am J Hematol, 79(4): 343-344, 2005.
- * Zimmerman M, Colciaghi F, Cattabeni F, Di Luca M: Ginkgo biloba extract- From molecular mechanisms to the treatment of Alzheimer's disease. Cell Mol Biol, 48: 613-623, 2002.