



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

Departamento de Fisiología y Farmacología

**“ANÁLISIS DEL EFECTO DEL *GINKGO BILOBA* SOBRE EL DAÑO
FUNCIONAL Y BIOQUÍMICO PRODUCIDO POR EL
TETRACLORURO DE CARBONO EN HÍGADO Y EN RIÑONES”**

Tesis para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Que presenta la

M. EN C. ROSA MARÍA CHÁVEZ MORALES

Director de Tesis:

DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ

Aguascalientes, Ags., junio de 2010.

Este trabajo de tesis se realizó en el

Departamento de Fisiología y Farmacología del

Centro de Ciencias Básicas de la

Universidad Autónoma de Aguascalientes

y en el Departamento de Bioquímica de la

Universidad Juárez del Estado de Durango.

A G R A D E C I M I E N T O S

A Dios, quien me ha permitido llegar a este momento con salud y en compañía de mi amada familia.

Agradezco sinceramente el apoyo recibido por mis Maestros, Dr. Fernando Jaramillo Juárez y Dr. Francisco A. Posadas del Río, quienes han compartido conmigo sus infinitos conocimientos y quienes con sus enseñanzas, han enriquecido mi formación profesional. Gracias por ayudarme a alcanzar esta meta.

A la Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña, quien con su amable y paciente dedicación hizo posible llevar a buen fin este logro.

A Ma. Luisa Rodríguez Vázquez, por su invaluable ayuda y dedicación en las horas de trabajo.

Al Dr. Miguel A. Reyes Romero, por su apoyo en la realización de este trabajo y su generosa hospitalidad.

Al Dr. Martín Gerardo Rodríguez, por su ayuda desinteresada y su amable colaboración.

A la Dra. Ana Rosa rincón Sánchez por su valiosa ayuda.

A aquéllos seres que se han constituido como puente vital entre la investigación y el conocimiento. A ellos, mi eterno agradecimiento, en donde se encuentren.

DEDICATORIAS

Con mucho amor, este trabajo y el esfuerzo para realizarlo, los dedico a mi papá, Hugo Eduardo Chávez Herrera, mi mamá, Rosa María Morales Contreras y a mi hermano Hugo Eduardo Chávez Morales.

*Ellos son el impulso, el motivo y la luz de mi existencia.
Por ellos y para ellos, todo bueno lo que logre realizar en la vida.*

Y sobre todo, dedico este trabajo a Dios, quien me bendijo con la familia más maravillosa del mundo.

Centro de Ciencias Básicas

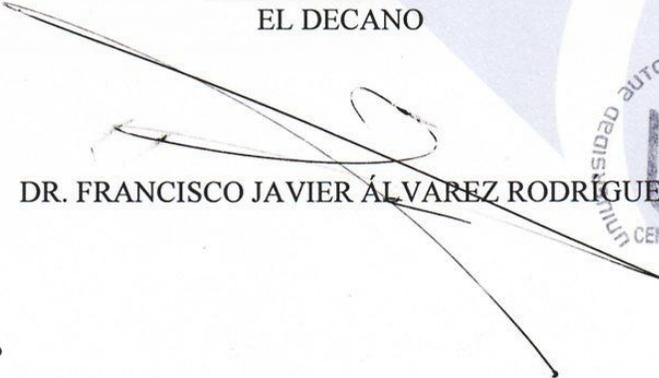
**M. en C. ROSA MARÍA CHÁVEZ MORALES,
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E .**

Estimado (a) Alumno (a) Chávez:

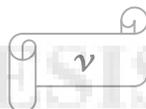
Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis titulado: **“Análisis del efecto del *Ginkgo biloba* sobre el daño funcional y bioquímico producido por el tetracloruro de carbono en hígado y en riñones”**, hago de su conocimiento 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.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 6 de mayo de 2010
“LUMEN PROFERRE”
EL DECANO


DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ

c.c.p.- Archivo





UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES



**DR. FRANCISO J. ÁLVAREZ RODRÍGUEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS.
PRESENTE.**

Estimado Señor Decano:

Nos permitimos comunicarle que después haber analizado el trabajo de tesis doctoral "Análisis del efecto del *Ginkgo biloba* sobre el daño funcional y bioquímico producido por el tetracloruro de carbono en hígado y en riñones", realizado por la M. en C. Rosa María Chávez Morales, estudiante de la Segunda Generación del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas (modalidad tradicional), consideramos que el trabajo:

- 1) Reúne los requisitos de una tesis de Doctorado en Ciencias.
- 2) Genera información en el área de la Toxicología.

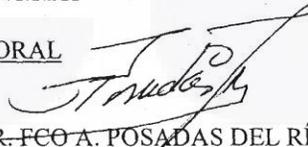
Por ello, y dado que este trabajo cumple con el requisito establecido en el Artículo 162-Inciso III del Reglamento General de Docencia de la UAA, damos nuestro voto aprobatorio para que la persona antes citada continúe con los trámites administrativos que le permitan presentar su examen de grado.

Aprovechamos este conducto para saludarlo cordialmente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., a 4 de mayo del 2010.
"SE LUMEN PROFERRE"

COMITÉ TUTORAL


DR. FERNANDO IRAMILLO JUÁREZ


DR. FCO A. POSADAS DEL RÍO

c.c.p.- Interesado.
c.c.p.- Archivo.

✓ 630





UNIVERSIDAD JUAREZ DEL ESTADO DE DURANGO

FACULTAD DE MEDICINA

AV. UNIVERSIDAD S/N ESQ. FANNY ANITUA
Tels. 12-17-79, 13-05-27, Fax 13-69-02 Durango,
Dgo. Mexico C.P. 34000

**COORDINADOR,
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS,
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES,
PRESENTE.**

El suscrito, miembro del comité tutorial de la C. M. en C. Rosa Ma. Chavez Morales, estudiante del programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, de la manera más atenta hace de su conocimiento el acuerdo con el contenido de la tesis que presenta la C. Chavez Morales como requisito parcial para la obtención del grado académico correspondiente.

ATENTAMENTE
Scire ad Sanare"

Victoria de Durango, Dgo., a 6 de mayo de 2010

Dr. Miguel Arturo Reyes Romero

De: Kai.Savolainen@ttl.fi

Para: jara@att.net.mx; faposari@hotmail.com

Asunto: Human and Experimental Toxicology - Decision on Manuscript ID HET-09-0145.R1

Fecha: Dom, 14 Mar 2010 5:32 am

14-Mar-2010

Dear Dr. Jaramillo-Juárez:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Protective effect of Ginkgo biloba extract on liver damage by a single dose of CCl4 in male rats" in its current form for publication in the Human and Experimental Toxicology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Human and Experimental Toxicology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Prof. Kai Savolainen
Editor in Chief, Human and Experimental Toxicology
Kai.Savolainen@ttl.fi

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 1
Comments to the Author
The recommendations were done.

RESUMEN

El CCl₄, es un compuesto que mediante el proceso de biotransformación, genera dos metabolitos altamente reactivos, los radicales triclorometilo y peroxitriclorometilo. Ambos metabolitos ejercen efectos tóxicos en los riñones y en el hígado. Por otra parte, el extracto del *Ginkgo biloba* (Gb) contiene diversos compuestos, de los cuales, los flavonoides se presentan en mayor concentración y se les atribuyen propiedades benéficas para el organismo, tales como el mejoramiento de la circulación sistémica, la estimulación de la síntesis de ATP y de compuestos antioxidantes, como el GSH, entre otras. El objetivo de este trabajo fue analizar el posible efecto protector del Gb sobre el daño renal producido por la intoxicación aguda y crónica con CCl₄, en animales de experimentación (ratas Wistar machos). Se trabajó bajo dos formas de intoxicación con CCl₄, aguda y crónica. Para analizar el efecto del Gb ante la intoxicación por una dosis única de CCl₄, se utilizaron grupos de 10 ratas cada uno y se trataron de la siguiente manera: Control (0.40 ml de aceite de maíz/rata, vo), CCl₄ (0.40 ml de CCl₄ al 50%/rata/dosis única, vo), tratamiento preventivo-Gb+CCl₄ (4 mg de Gb/kg/día/5 días/ip, al sexto día 0.40 ml de CCl₄ al 50%/rata/vo), tratamiento terapéutico-CCl₄+Gb (0.40 ml de CCl₄ al 50%/rata/vo, al día siguiente 4 mg de Gb/kg/día/5 días/ip) y Gb (4 mg de Gb/kg/5 días/ip). Para analizar el efecto del Gb ante la intoxicación crónica con CCl₄, se utilizaron grupos de 10 ratas cada uno y se trataron de la siguiente manera: Control (0.2 ml de aceite de maíz/rata 3 veces semana/ 8 semanas, ip), CCl₄ (0.2 ml de CCl₄ del 13-25%/ 3 veces semana/ 8 semanas, ip), Gb+CCl₄ (0.2 ml de CCl₄ del 13-25%/ 3 veces semana/ 8 semanas, ip + 4 mg de Gb de la solución farmacéutica) y Gb (4 mg de Gb de la solución. farmacéutica). Concluidos los tratamientos, las ratas fueron sometidas a una cirugía para la valoración de parámetros que miden la función renal (FPR, VFG, FF, manejo renal de Na⁺ y H₂O, concentración de glucosa y proteínas en orina, actividad urinaria de TGG y acidificación urinaria), seguida por eutanasia y toma de muestras de corteza renal e hígado para hacer el análisis histológico (tinciones con hematoxilina y eosina) y el estudio molecular, el cual consistió en la cuantificación de la expresión de mensajeros de TNF- α e IL-6.

En los grupos tratados de forma aguda, los resultados demuestran que el CCl₄ produce alteraciones en las células tubulares proximales que consisten en glucosuria, proteinuria, aumento

de la actividad de TGG en la orina, disminución del flujo sanguíneo renal y aumento de la FF, así como incremento de MDA en corteza renal. Estas alteraciones son contrarrestadas por el Gb, especialmente al ser administrado de forma preventiva. A nivel histológico, las alteraciones producidas por el CCl₄ sobre los riñones consistieron en vacuolización citoplásmica y pérdida del borde en cepillo en túbulo proximales, estos daños fueron más intensos en la corteza interna. La administración preventiva y terapéutica de Gb, disminuyó la cantidad de células tubulares proximales dañadas. En cuanto al estudio molecular, este revela que el CCl₄ provoca disminución de la intensidad de expresión de TNF- α , mientras que el Gb permite que el transcrito de esta citocina siga expresándose. En el hígado, las alteraciones histológicas provocadas por el CCl₄ consistieron en necrosis centrolobulillar con áreas necróticas extendidas hacia la periferia del lobulillo. Los tratamientos con Gb evitaron la extensión de la necrosis hacia las áreas periféricas. El estudio molecular en el hígado revela que el CCl₄ provoca disminución de la intensidad de expresión del transcrito de TNF- α y del gen constitutivo GAPDH, mientras que la administración de Gb permite que la expresión de estas proteínas esté presente. Tanto en riñones como en hígado, el tratamiento preventivo con Gb estimuló el aumento en la expresión de TNF- α e IL-6.

Durante la intoxicación crónica con CCl₄, se observó aumento de glucosuria, revertida por el Gb, incremento de la concentración de proteínas en orina, que el Gb no logró evitar, así como aumento de la actividad urinaria de la TGG, revertida por la administración de Gb. El CCl₄ también provocó aumento de la acidificación urinaria, efecto revertido por el Gb. Los resultados demuestran también que el Gb ejerce efectos benéficos sobre la circulación sanguínea renal, al incrementar las depuraciones de PAH y de In. Las concentraciones de MDA en corteza renal estuvieron aumentadas en todos los grupos experimentales, con respecto a los valores del grupo control, incluso en el grupo que recibió solamente Gb, lo que indica un posible efecto tóxico. A nivel histológico, el CCl₄ produce vacuolización citoplásmica y pérdida del borde en cepillo, efectos aumentados en la corteza interna. El Gb logra conservar un mayor número de túbulo y células sanas.

Con base en lo anterior, ante la intoxicación aguda con CCl₄, el Gb ejerce un efecto nefroprotector al ser administrado de forma preventiva, a nivel funcional, estructural y molecular. Durante la intoxicación crónica con CCl₄, el Gb revierte algunos efectos tóxicos producidos por este hidrocarburo.

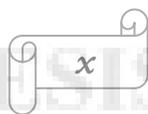


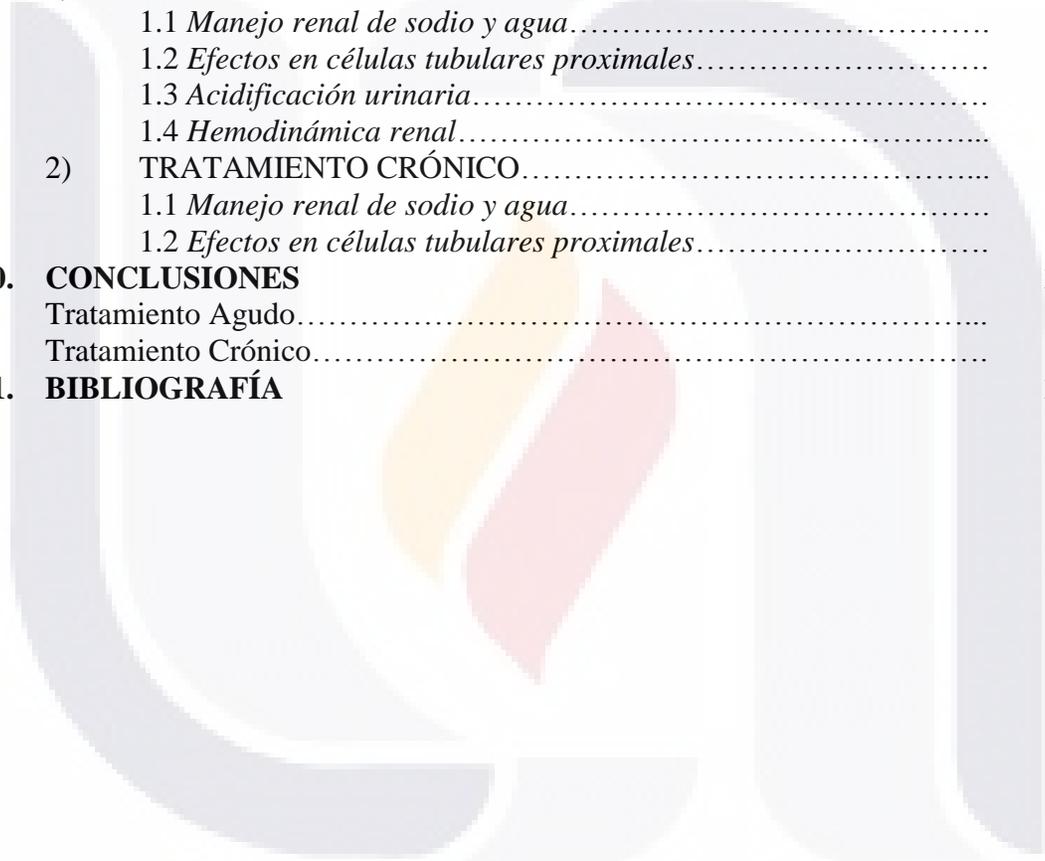
TABLA DE ABREVIATURAS.

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ADI	Ingesta Diaria Aceptable (Por sus siglas en inglés)
C-In	Depuración de Inulina
C-PAH	Depuración de Para aminohipurato
CCl ₄	Tetracloruro de Carbono
CCl ₃ OO•	Radical Proxitriclorometilo
Cl ₃ C•	Radical Triclorometilo
CYP	Citocromo P450
DL ₅₀	Dosis Letal Media
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FF	Fracción de Filtración
FG	Filtración Glomerular
FPR	Flujo Plasmático Renal
Gb	<i>Ginkgo biloba</i>
GSH	Glutación Reducido
GST	Transferasas de Glutación
HGF	Factor de Crecimiento de Hepatocitos
HSP	Proteínas de estrés
IGF-1	Factor de Crecimiento similar a la Insulina
In	Inulina
IPCS	International Programme on Chemical Safety
IRC	Insuficiencia Renal Crónica
MAC	Concentración Máxima Permisible (por sus siglas en inglés)
MRP	Proteína de Resistencia Múltiple a Fármacos
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fostato
NTA	Necrosis Tubular Aguda
OAT1	Transportador de Aniones Orgánicos 1
PAH	Para aminohipurato o Ácido Para aminohipurico
TFG	Tasa de filtración Glomerular
TGF β	Factor de Crecimiento Transformante Beta

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO		<i>Pág.</i>
PORTADA		i
AGRADECIMIENTOS		ii
DEDICATORIA		iii
Cartas de aceptación.....		iv
Carta de aceptación.....		viii
RESUMEN		ix
Tabla de abreviaturas.....		xi
ÍNDICE		xii
Índice de Figuras.....		xiv
Índice de Tablas.....		xix
Índice de Cuadros.....		xix
1 INTRODUCCIÓN		1
1.1. Exposición ocupacional y ambiental a los xenobióticos.....		1
1.2. Intoxicaciones agudas y crónicas.....		3
1.3. Participación de los riñones en la homeostasis corporal.....		8
1.4. Biotransformación y eliminación de xenobióticos.....		13
2 ANTECEDENTES		17
2.1. Hidrocarburos alifáticos halogenados.....		17
2.1.1. Clasificación y usos industriales.....		17
2.1.2. Vías de ingreso en los seres humanos.....		18
2.1.3. Efectos tóxicos.....		18
2.2. Tetracloruro de carbono (CCl ₄).....		19
2.2.1. Fuentes de producción y usos industriales.....		20
2.2.2. El CCl ₄ en el medio ambiente.....		21
2.2.3. Aspectos toxicocinéticos y toxicodinámicos.....		22
2.2.4. Biotransformación y unión covalente de metabolitos a moléculas titulares.....		24
2.3. Alteraciones renales por intoxicaciones agudas y crónicas.....		28
2.3.1. Falla renal aguda.....		29
2.3.2. Falla renal crónica.....		32
2.3.3. Indicadores que valoran la función renal.....		33
2.4. Estrés oxidativo.....		39
2.4.1. Aspectos generales.....		39
2.4.2. Especies reactivas de oxígeno (ERO).....		40
2.4.3. Xenobióticos y producción de radicales libres.....		42
2.4.4. Mecanismos antioxidantes (GSH).....		45
2.5. <i>Ginkgo biloba</i>		47
2.5.1. Usos y efectos titulares.....		47
2.5.2. Componentes bioactivos.....		49
2.5.3. Actividad antioxidante.....		51
3. TIPO DE INVESTIGACIÓN		53
4. JUSTIFICACIÓN		53
5. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES		53

6.	HIPÓTESIS	54
7.	METODOLOGÍA	54
	7.1. Materiales y métodos.....	54
	7.2. Grupos experimentales.....	54
	7.3. Diagrama experimental.....	56
	7.4. Análisis Estadístico.....	58
8.	RESULTADOS	60
	TRATAMIENTO AGUDO.....	60
	TRATAMIENTO CRÓNICO.....	71
9.	DISCUSIÓN	80
	1) TRATAMIENTO AGUDO.....	80
	1.1 <i>Manejo renal de sodio y agua</i>	80
	1.2 <i>Efectos en células tubulares proximales</i>	81
	1.3 <i>Acidificación urinaria</i>	83
	1.4 <i>Hemodinámica renal</i>	83
	2) TRATAMIENTO CRÓNICO.....	92
	1.1 <i>Manejo renal de sodio y agua</i>	92
	1.2 <i>Efectos en células tubulares proximales</i>	94
10.	CONCLUSIONES	100
	Tratamiento Agudo.....	100
	Tratamiento Crónico.....	101
11.	BIBLIOGRAFÍA	102



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1-1	Curva de concentración plasmática contra tiempo de una infusión intravenosa continua (A) y administración frecuente de cantidades pequeñas (B) (Tomado de Niesink, de Vries y Hollinger, 1996).....	6
1-2	Dosis y su relación con el efecto. La dosis aguda se compara con la dosis acumulativa después de la administración repetida de una sustancia de eliminación limitada. De esta manera, la sustancia tiende a acumularse, produciendo daño (Tomado de Niesink, de Vries y Hollinger, 1996).....	7
1-3	Administración de dosis iguales y repetidas de un compuesto, a intervalos regulares, con acumulación (línea sólida) y sin acumulación en el organismo (línea punteada) (Tomado de Repetto, 1981).....	8
1-4	Descripción topográfica del sistema urinario masculino y femenino (Accesado de la red, ADAM, 2005).....	9
1-5	Estructura macroscópica del riñón (Accesado de la red, ADAM, 2005)	9
1-6	Estructura microscópica del riñón (Accesado de la red, ADAM, 2005)	10
1-7	Integración de las reacciones de biotransformación de fase I y II (Tomado de Plaa, 1995).....	14
1-8	Mecanismo de oxidación de xenobióticos por el sistema de transporte de electrones del citocromo P450 (Tomado de Niesink, de Vries y Hollinger, 1996).....	16
2-1	Clasificación de los hidrocarburos (Tomado de Ebbing, 1996).....	18
2-2	Biotransformación del tetracloruro de carbono (Tomado de Harris y Anders, 1980; Anders y Jakobson, 1985; McGregor y Lang, 1996).....	25
2-3	Formación del radical triclorometilo. Este radical actúa sobre las dobles ligaduras de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares generando, en consecuencia, ácidos grasos clorinados. Este proceso altera la funcionalidad de las membranas, evita la síntesis adecuada de proteínas, provoca disminución de la actividad de algunas enzimas, conduce a la pérdida de la homeostasis del calcio intracelular (apoptosis), e incluso pueden aparecer alteraciones del material genético (Tomado de Plaa, 1995).....	27
2-4	Estructura química de la Inulina.....	34
2-5	Depuración de In, un indicador de la FG. La tasa de excreción de la inulina es igual a la tasa de filtración.....	35
2-6	Estructura química de ácido para-aminohipúrico.....	35
2-7	Depuración de PAH, un indicador del FPR. La tasa de excreción del para aminohipurato es igual a la tasa de secreción.....	36
2-8	Secreción de PAH. El PAH alcanza la luz tubular gracias a las proteínas transportadoras OAT1 y MRP, localizadas en la membrana basolateral y luminal de células tubulares proximales. OAT intercambia α -cetoglutarato por PAH, mientras que MRP actúa como un canal iónico que conduce al anión hacia la luz tubular.	

	Recientemente se han identificado otras proteínas transportadoras en la membrana luminal que favorecen la secreción de PAH (“x” y “y”), aunque los mecanismos no han sido descritos.....	37
2-9	Sistema de retroalimentación tubuloglomerular. Las células de la mácula densa, en la primera porción del túbulo distal, son sensoras de las concentraciones de sodio. Cuando existe una disminución de la FF (por disminución del FPR y FG), las cantidades de líquido tubular y de sodio también disminuyen, lo que activa la secreción de renina y angiotensina II por las células de la mácula densa. La secreción de estos compuestos provoca vasoconstricción de la arteriola eferente, mientras que la arteriola aferente presenta vasodilatación. De esta forma, la FF aumenta y la FG se mantiene normal, asegurando el aporte de sodio a la porción tubular.....	38
2-10	Principales fuentes de radicales libres en la célula aeróbica. En la producción de estos radicales participan diversas enzimas solubles unidas a membranas (Tomado de Repetto, 1981).....	41
2-11	Reacciones generadoras de peróxido de hidrógeno.....	42
2-12	a: Reacción Haber-Weiss; b: Acción catalítica de iones metálicos en esta reacción (Tomado de Niesink, de Vries y Hollinger, 1996).....	42
2-13	Necrosis celular inducida por el CCl ₄ . Las membranas plasmáticas y de otros organelos son alteradas por los radicales derivados de este compuesto, lo que resulta en la pérdida celular de potasio, enzimas y coenzimas y la ganancia de calcio y sodio intracelular. Esta serie de eventos conducen a la muerte celular. MFO = Monooxigenasas de función mixta (Tomado de Plaa, 1995).....	43
2-14	Reacciones de iniciación y propagación de la lipoperoxidación (Tomado de Repetto, 1981).....	44
2-15	Ciclo redox y homeostasis del glutatión (Tomado de Niesink, de Vries y Hollinger, 1996).....	46
2-16	Árbol de <i>Ginkgo biloba</i> , a la derecha en la parte superior, el fruto y en la inferior las hojas del árbol (hoja pata de pato). Esta planta ha sido ampliamente utilizada con fines ornamentales y medicinales sobretodo en el medio oriente. Actualmente el extracto de hojas de ginkgo (EGb 761) es conocido por sus capacidades potenciadoras de la memoria así como su capacidad antioxidante, entre otras propiedades medicinales (Tomado de Smith y Luo, 2004).....	48
2-17	Componentes del extracto de las hojas del <i>Ginkgo biloba</i> . La fracción flavonoide ejerce el efecto antioxidante, mientras que la fracción de terpenos ayuda a mejorar la circulación sanguínea (Tomado de Smith y Luo, 2004).....	49
8-1	Excreción fraccionaria de sodio en ratas expuestas al CCl ₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl ₄) y terapéutica (CCl ₄ +Gb).....	60
8-2	Flujo urinario en ratas expuestas expuestas al CCl ₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl ₄) y terapéutica (CCl ₄ +Gb).....	60

8-3	Concentración de glucosa en orina de ratas expuestas al CCl ₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl ₄) y terapéutica (CCl ₄ +Gb).....	61
8-4	Concentración de proteínas en orina de ratas expuestas al CCl ₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl ₄) y terapéutica (CCl ₄ +Gb). (**p< 0.01 y ***p<0.001).....	62
8-5	Actividad de la TGG en orina de ratas expuestas a Gb (4 mg/kg/día/5 días) y CCl ₄ (0.40 ml/rata/vo/dosis única). El CCl ₄ fue administrado al concluir el tratamiento con Gb. (**p<0.001).....	62
8-6	Masa ácida excretada en orina de ratas expuestas al CCl ₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl ₄) y terapéutica (CCl ₄ +Gb).....	62
8-7	Depuración de inulina (C-In) en ratas expuestas al CCl ₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl ₄) y terapéutica (CCl ₄ +Gb).....	63
8-8	Depuración de ácido para-aminohipúrico (C-PAH, ml/min/kg) en ratas expuestas al CCl ₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl ₄) y terapéutica (CCl ₄ +Gb).....	63
8-9	Fracción de filtración en ratas expuestas al CCl ₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl ₄) y terapéutica (CCl ₄ +Gb).....	63
8-10	Concentración de malondialdehído (MDA) en homogeneizado de corteza renal de ratas expuestas a Gb (4 mg/kg/día/5 días) y CCl ₄ (0.40 ml/rata/vo/ expuestas al CCl ₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl ₄) y terapéutica (CCl ₄ +Gb). (**p< 0.01 y ***p< 0.001).....	64
8-11	Cortezas renales externas de ratas tratadas con: A= aceite de maíz, B= CCl ₄ , C= CCl ₄ +Gb, D= Gb+CCl ₄ y E= Gb. * túbulo renal proximal, → pérdida del borde en cepillo, ⇒ vacuolización citoplásmica. Tinción con hematoxilina y eosina. Objetivo 40x.....	65
8-12	Cortezas renales internas de ratas tratadas con: A= aceite de maíz, B= CCl ₄ , C= CCl ₄ +Gb, D= Gb+CCl ₄ y E= Gb. * túbulo renal proximal, → pérdida del borde en cepillo, ⇒ vacuolización citoplásmica. Tinción con hematoxilina y eosina. Objetivo 40x.....	66
8-13	Conteo de células (A) y túbulos proximales (B) sanos y dañados por campo de 40X, en la corteza renal interna de los animales experimentales. (**p<0.001).....	67
8-14	Tejido hepático de los animales experimentales. A y B grupo control, objetivos 10 y 40x. C y D grupo tratado con CCl ₄ , objetivo 10 y 40x. E y F grupo tratado con CCl ₄ +Gb, objetivo 10 y 40x. G y H grupo tratado con Gb+CCl ₄ . I y J grupo tratado con Gb. * vena centrolobulillar, → necrosis centrolobulillar y periférica, - picnosis nuclear, ⇒ zona de infiltrado inflamatorio, ↓ vacuolización	

	citoplásmica. Tinción con Hematoxilina y Eosina.....	68
8-15	Expresión del transcrito del gen constitutivo GAPDH en corteza renal de ratas expuestas a: CCl ₄ (0.40 ml/rata/vo/dosis única) y Gb (4 mg/kg/día/5 días) de manera preventiva y terapéutica. A, expresión del transcrito en gel de agarosa: carriles= 0 marcador de pesos moleculares, 1-3 controles, 4-8 tratados con CCl ₄ , 9-13 tratados con CCl ₄ +Gb, 14-17 tratados con Gb+CCl ₄ y 18-20 tratados con Gb. B, análisis estadístico de la expresión del ARNm de esta proteína (*p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001).....	69
8-16	Expresión del transcrito de TNF-α (468 pb) en corteza renal de ratas expuestas a: CCl ₄ (0.40 ml/rata/vo/dosis única) y Gb (4 mg/kg/día/5 días) de manera preventiva y terapéutica. A, expresión del transcrito en gel de agarosa: carriles= 0 marcador de pesos moleculares, 1-3 controles, 4-8 tratados con CCl ₄ , 9-13 tratados con CCl ₄ +Gb, 14-17 tratados con Gb+CCl ₄ y 18-20 tratados con Gb. B, análisis estadístico de la expresión del ARNm (*p<0.05).....	70
8-17	Expresión del transcrito de IL-6 (496 pb) en corteza renal de ratas expuestas a: CCl ₄ (0.40 ml/rata/vo/dosis única) y Gb (4 mg/kg/día/5 días) de manera preventiva y terapéutica. A, expresión del transcrito en gel de agarosa: carriles= 0 marcador de pesos moleculares, 1-3 controles, 4-8 tratados con CCl ₄ , 9-13 tratados con CCl ₄ +Gb, 14-17 tratados con Gb+CCl ₄ y 18-20 tratados con Gb. B, análisis estadístico de la expresión del ARNm (*p<0.05, ***p<0.001).....	70
8-18	Expresión del transcrito del gen constitutivo GAPDH en hígado de ratas expuestas a: CCl ₄ (0.40 ml/rata/vo/dosis única) y Gb (4 mg/kg/día/5 días) de manera preventiva y terapéutica. A, expresión del transcrito en gel de agarosa: carriles= 0 marcador de pesos moleculares, 1-3 controles, 4-7 tratados con CCl ₄ , 8-11 tratados con CCl ₄ +Gb, 12-15 tratados con Gb+CCl ₄ y 16-19 tratados con Gb. B, análisis estadístico de la expresión del ARNm (*p<0.05).....	71
8-19	Expresión del transcrito de TNF-α (468 pb) en hígado de ratas expuestas a: CCl ₄ (0.40 ml/rata/vo/dosis única) y Gb (4 mg/kg/día/5 días) de manera preventiva y terapéutica. A, expresión del transcrito en gel de agarosa: carriles= 0 marcador de pesos moleculares, 1-3 controles, 4-7 tratados con CCl ₄ , 8-11 tratados con CCl ₄ +Gb, 12-15 tratados con Gb+CCl ₄ y 16-19 tratados con Gb. B, análisis estadístico de la expresión del ARNm (***p<0.001).....	71
8-20	Expresión del transcrito de IL-6 (496 pb) en hígado de ratas expuestas a: CCl ₄ (0.40 ml/rata/vo/dosis única) y Gb (4 mg/kg/día/5 días) de manera preventiva y terapéutica. A, expresión del transcrito en gel de agarosa: carriles= 0 marcador de pesos moleculares, 1-3 controles, 4-7 tratados con CCl ₄ , 8-11 tratados con CCl ₄ +Gb, 12-15 tratados con Gb+CCl ₄ y 16-19 tratados con Gb. B, análisis estadístico de la expresión del ARNm (***p<0.001).....	72
8-21	Excreción fraccionaria de sodio en ratas expuestas a Gb (4 mg/3 veces por semana/8 semanas) y CCl ₄ (0.2 ml/ 3 veces semana/8 semanas). El	

Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄. (**p<0.01)..... 73

8-22 Flujo urinario en ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄. (**p<0.01)..... 73

8-23 Concentración de glucosa en orina de ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄. (*p<0.05)..... 73

8-24 Concentración de proteínas en orina de ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄. (**p<0.01 y ***p<0.001)..... 74

8-25 Actividad de TGG en orina de ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄. (*p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001)..... 74

8-26 Masa ácida excretada por la orina en ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄. (***p<0.001)..... 75

8-27 Depuración de Inulina en ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄..... 76

8-28 Depuración de ácido para-aminoohipúrico en ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄..... 76

8-29 Fracción de filtración en ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄..... 76

8-30 Concentración de MDA en ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄. (***p<0.001)..... 77

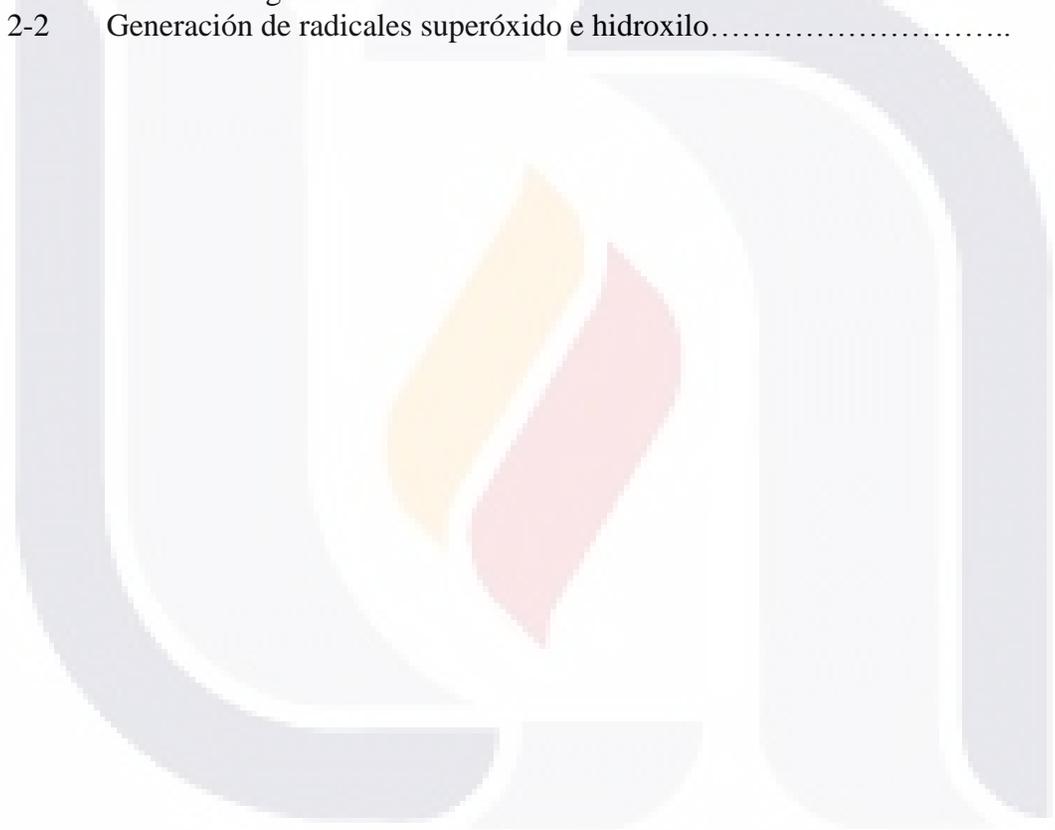
8-31 Cortezas renales externas de ratas tratadas con: A= aceite de maíz, B= CCl₄, C= Gb+CCl₄ y D= Gb. * túbulo renal proximal, → pérdida del borde en cepillo, ⇒ vacuolización citoplásmica. Tinción hematoxilina y eosina Objetivo 40x..... 78

8-32 Cortezas renales internas de ratas tratadas con: A= aceite de maíz, B= CCl₄, C= Gb+CCl₄ y D= Gb. * túbulo renal proximal, → pérdida del borde en cepillo, ⇒ vacuolización citoplásmica, ↓ túbulo en regeneración. Tinción con Hematoxilina y eosina. Objetivo 40x..... 78

8-33 Conteo de células (A) y túbulos (B) proximales sanos y dañados por campo, en la corteza renal de los animales experimentales. (*p<0.05 y ***p<0.001)..... 79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
2-1	DL ₅₀ del CCl ₄ para diferentes especies animales a través de tres vías de entrada al organismo.....	19
2-2	Generación de radicales superóxido e hidroxilo.....	40



1. INTRODUCCIÓN

Los riñones son órganos de vital importancia para el organismo y entre sus múltiples funciones se encuentra la de eliminar compuestos tóxicos, situación que expone de manera importante las células renales, principalmente las células de la porción proximal de la nefrona. En este sentido, cualquier alteración renal conduce a padecimientos graves que en ocasiones, provocan la muerte o genera una calidad de vida muy baja.

Numerosos xenobióticos producen efectos tóxicos sobre los riñones, entre ellos, el tetracloruro de carbono (CCl_4), un hidrocarburo alifático halogenado empleado como solvente en algunas industrias, poniendo en riesgo la salud de los obreros. Entre los efectos nefrotóxicos provocados por el CCl_4 , se encuentran: edema celular, oliguria, anuria y azohemia. Por ello, es necesario establecer medidas preventivas y correctivas encaminadas a proteger la salud de los trabajadores y de la población en general.

En este contexto, numerosas investigaciones han demostrado la capacidad antioxidante de los componentes presentes en el extracto de *Ginkgo biloba* (Gb). Por lo anterior, consideramos importante investigar la capacidad del Gb para prevenir o disminuir la magnitud de las alteraciones funcionales, moleculares y las lesiones histológicas producidas por el CCl_4 en los riñones de ratas expuestas de manera aguda y crónica a éste hidrocarburo. La información generada en esta investigación, puede ser de utilidad clínica para los médicos que atienden a los trabajadores expuestos de manera ocupacional a los hidrocarburos alifáticos halogenados, así como también puede generar alternativas de tratamiento en personas con falla renal de naturaleza no ocupacional (hepatitis y cirrosis, hipertensión crónica, diabetes, etc.).

1.1. Exposición ocupacional y ambiental a los xenobióticos.

En el medio ambiente existe una gran variedad de compuestos emitidos por fuentes naturales y antropogénicas que, bajo ciertas circunstancias, pueden alterar la homeostasis

del organismo. Tales circunstancias representan riesgos para la salud y están determinadas por el potencial toxicológico de las sustancias mismas y su destino en el ambiente y en los organismos (Niesink *et al*, 1996).

En Toxicología, exposición se define como la condición por la cual los xenobióticos están en contacto con los organismos y, bajo ciertas circunstancias, pueden pasar al interior de los mismos. Ahora bien, el destino de las sustancias en el ambiente y en el organismo depende de una serie de eventos que suceden desde que la sustancia es liberada por la fuente emisora hacia los vectores ambientales (agua, suelo y aire), hasta el momento en que los efectos producidos por dicha sustancia son evidentes. Tales eventos acontecen en las siguientes fases: 1) fase de producción, 2) fase de cinética ambiental, 3) fase de exposición, 4) fase toxocinética y 5) fase toxodinámica.

La fase de cinética ambiental se refiere al destino de la sustancia en el ambiente y en el individuo. La fase de exposición se refiere al momento en el cual la sustancia entra en contacto con los organismos. La interacción entre la sustancia y el organismo que conduce al desarrollo de eventos nocivos, constituye la fase toxicodinámica. Los eventos que acontecen en estas fases dependen de los siguientes factores: características filogenéticas y ontogénicas del individuo, edad, sexo, susceptibilidad, ruta de exposición (vía de entrada al organismo), concentración del xenobiótico en el cuerpo, tiempo de exposición, características fisicoquímicas de la sustancia y factores ambientales, tales como presencia de otros compuestos que inducen o inhiben la biotransformación del xenobiótico. Todo ello determina la presencia y magnitud de efectos tóxicos en los seres vivos. De esta manera, la posibilidad de entrar en contacto con sustancias tóxicas es alta cuando se vive en las inmediaciones de la fuente de contaminación, aunque la exposición también es posible a grandes distancias por el desplazamiento del compuesto a través del aire, el suelo y el agua, poniendo en riesgo la salud de los individuos a través de la ingesta, contacto o aspiración de agentes contaminantes, ya sea de forma directa o indirecta a través del consumo de alimentos contaminados (Niesink *et al*, 1996; Jaramillo *et al*, 2009).

Ahora bien, la exposición a los xenobióticos se intensifica en el ambiente laboral, debido a que bajo estas circunstancias, las concentraciones de los compuestos tóxicos aumentan de manera importante, contrario a lo que sucede en el medio ambiente, donde la capacidad diluyente del agua, depuradora del aire y transformadora del suelo, disminuyen las concentraciones de los agentes contaminantes. Las rutas de exposición en el ambiente industrial son principalmente la vía dérmica y la vía inhalatoria. Por ello, si no se cuenta con medidas adecuadas de prevención y protección, que en ocasiones son insuficientes, los trabajadores de diversas industrias pueden desarrollar enfermedades graves como la cirrosis hepática, producida por la exposición a hidrocarburos, la silicosis por exposición al carbono, la asbestosis producida por la intoxicación con polvo de asbesto, o en casos más extremos, pueden surgir efectos carcinogénicos (propios de la intoxicación crónica de tipo ocupacional) como por ejemplo el desarrollo de mesotelioma pulmonar por intoxicación con monóxido de carbono, entre otros padecimientos mortales (Jaramillo *et al*, 2009).

1.2. Intoxicaciones agudas y crónicas.

Se distinguen dos tipos de intoxicaciones: la aguda y la crónica. Existe una necesidad práctica de distinguir una de la otra, puesto 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 ocurre, por ejemplo, después de ingerir cantidades excesivas de fármacos, o por efectos alérgicos a los mismos, ingesta de agentes de limpieza o pesticidas ya sea accidental o intencionalmente, así por 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. En este tipo de intoxicación se debe distinguir la intoxicación accidental (el grupo más afectado suele ser el de los

niños), la autointoxicación (suicida) o intoxicación homicida. Los esquemas representativos de este tipo de intoxicación se presentan más adelante.

Intoxicación Crónica.

Este tipo de intoxicación consiste en la exposición continua o repetida a cantidades pequeñas de una sustancia en tiempo prolongado (varios meses o incluso años). Es importante señalar que el nivel de exposición en la intoxicación crónica es más bajo que en la aguda, aunque con efectos más graves pero que se desarrollan de forma gradual. Tales efectos incluyen alteraciones a nivel genético que producen carcinogenicidad. El ambiente laboral (exposición ocupacional) es el mejor escenario de la intoxicación crónica. Otros ambientes propicios para la exposición crónica a contaminantes son los parques o jardines, para quienes acostumbran visitarlos por las mañanas, exponiéndose a las partículas suspendidas y a los contaminantes que se encuentran más concentrados en la tropósfera durante las mañanas frías; o bien, cuando se dedica mucho tiempo a cierta actividad.

Con relación a lo anterior, la Toxicología Ocupacional se encarga de estudiar los efectos nocivos producidos por las sustancias de uso laboral o industrial y establece los límites de seguridad ante su exposición (Jaramillo *et al*, 2009).

Ahora bien, como resultado de la contaminación del aire, del suelo y del agua, existen grupos específicos de la población que se encuentran expuestos durante largos periodos de tiempo a cantidades menores de las que se presentan en el ambiente ocupacional, por ejemplo localidades situadas en cercanías de un río contaminado o a una zona ladrillera. La exposición puede suceder de manera directa por estar en contacto con el vector ambiental contaminado o bien, de manera indirecta, por consumir alimentos o suelo contaminados que contengan residuos de pesticidas o toxinas naturales. Por otra parte, la mayoría de los contaminantes se presentan en forma de mezclas complejas, como el aire contaminado por emisiones industriales y de automóviles. Por ello, es inevitable la exposición simultánea a compuestos químicos por distintas vías. Con respecto a lo anterior, la presencia simultánea de varios compuestos es característica de la exposición ambiental,

pudiendo aparecer efectos tóxicos en el organismo por sinergia entre contaminantes, una vez que han alcanzado sus órganos diana. Cabe señalar que ante determinadas circunstancias, principalmente meteorológicas, pueden presentarse incidentes ambientales como episodios de contaminación localizados, tal como sucede en casos de inversión térmica durante los meses invernales o por fugas accidentales de gases tóxicos provenientes de alguna industria. En tales episodios, los contaminantes alcanzan concentraciones mucho más altas que en la mayoría de los casos de contaminación ambiental.

Otro aspecto importante a considerar en la intoxicación crónica ocupacional o ambiental es que, por lo general, están involucrados un mayor número de individuos, contrario a lo que sucede en un escenario de intoxicación aguda (Niesink *et al*, 1996).

Cabe señalar que los mecanismos fisiopatológicos que caracterizan a la intoxicación crónica ocupacional y ambiental, no son diferentes entre sí; sin embargo en el ambiente laboral, la exposición a una sustancia en particular es mayor que en el ambiente externo y un número determinado de individuos de edades específicas resulta afectado, mientras que en la exposición ambiental, todos los seres humanos de diferentes edades pueden estar expuestos, aunque existen situaciones que incrementan la susceptibilidad en ciertas personas, como el padecimiento de enfermedades, el embarazo, la vejez y la niñez, además del consumo o exposición a otras sustancias.

De esta manera, en el área laboral, existe un grado de exposición necesario o un grado de riesgo ocupacional que el trabajador acepta. Por el contrario, en la contaminación ambiental la exposición es involuntaria y hay menor tendencia por considerar riesgos aceptables o tolerables. Esta diferencia se refleja en la terminología de estándares designados para proteger la salud, ejemplo, la salud ocupacional se refiere a la máxima concentración permisible (MAC, por sus siglas en inglés), mientras que para la población abierta, se habla de un consumo o ingesta diaria aceptable (ADI, por sus siglas en inglés).

Ahora bien, cuando una sustancia es administrada de manera repetida a intervalos de tiempos menores que el requerido para su eliminación completa, dicha sustancia será

acumulada en el organismo. Este escenario de exposición está representado en la figura 1-1. La figura muestra que si la sustancia es administrada en cantidades muy pequeñas pero a intervalos frecuentes, la situación sería parecida a una infusión intravenosa continua. En ambos casos, la concentración plasmática aumentará hasta llegar a una meseta donde la tasa de eliminación es igual a la tasa de absorción. En exposiciones repetidas la tasa de acumulación depende de la frecuencia y el tiempo en el que se administran esas pequeñas cantidades (Niesink *et al*, 1996).

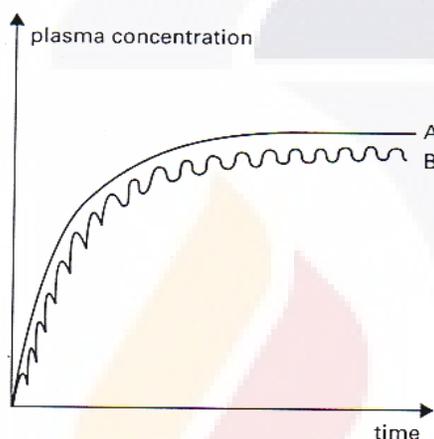


Figura 1-1. Curva de concentración plasmática contra tiempo de una infusión intravenosa continua (A) y administración frecuente de cantidades pequeñas (B) (Tomado de Niesink *et al*, 1996).

Con relación a las diferencias toxicocinéticas de los xenobióticos en escenarios de exposición aguda o crónica, se puede decir que, al estar expuestos los individuos a una sustancia en condiciones de intoxicación aguda, las concentraciones plasmáticas de la misma tenderán a subir de manera dramática e inmediata, hasta alcanzar una concentración máxima. Con el proceso de eliminación, el daño producido por la sustancia comienza a disminuir (daño residual) como se muestra en la figura 1-2, si el tiempo de exposición también disminuye. Por otra parte, ante un escenario de exposición crónica, y como se mencionó con anterioridad, la sustancia que entra en el organismo, lo hace en un tiempo más corto que aquél en el que el organismo elimina tal sustancia, de este modo tiende a acumularse, alcanzando cada vez concentraciones plasmáticas mayores hasta llegar a una meseta. Finalmente, la figura 1-2 también muestra el comportamiento del fenómeno ante

una situación de intoxicación crónica, en la cual no ocurre metabolismo ni excreción (Klaassen *et al*, 2001).

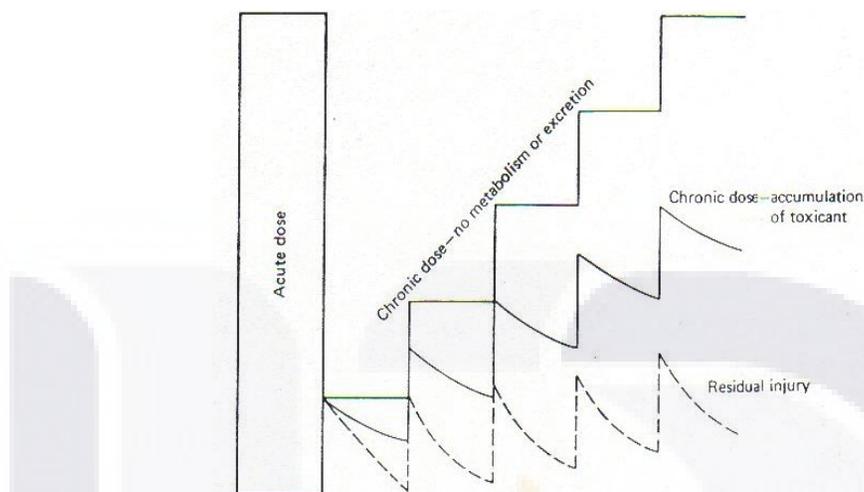


Figura 1-2. Dosis y su relación con el efecto. La dosis aguda se compara con la dosis acumulativa después de la administración repetida de una sustancia de eliminación limitada. De esta manera, la sustancia tiende a acumularse, produciendo daño (Tomado de Niesink *et al*, 1996).

La figura 1-3 representa un escenario de exposición con acumulación y sin acumulación del xenobiótico. Como se mencionó con anterioridad, este comportamiento es típico de una exposición crónica, en la cual puede ocurrir acumulación; la gráfica también hace referencia al tiempo de vida media. En la exposición crónica (con acumulación), cada vez que se ingiere una dosis (igual en cada ocasión) hay menos eliminación y, por tal motivo, conforme aumenta la acumulación mayor será la biodisponibilidad del compuesto.

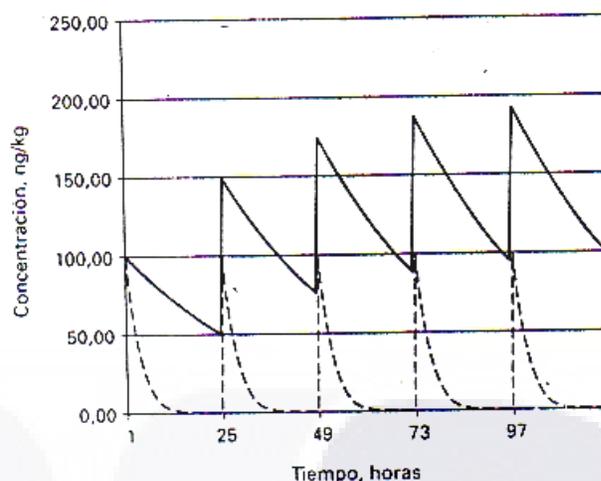


Figura 1-3. Administración de dosis iguales y repetidas de un compuesto, a intervalos regulares, con acumulación (línea sólida) y sin acumulación en el organismo (línea punteada) (Tomado de Repetto, 1981).

1.3. Participación de los riñones en la homeostasis corporal.

Los dos riñones se encuentran fuera de la cavidad peritoneal en contacto estrecho con la pared abdominal posterior, uno a cada lado de la columna vertebral (Figura 1-4). Cada uno de ellos tiene forma de frijol y en su línea media se localiza el hilio, por donde penetran una arteria renal, una vena renal, nervios y la porción ensanchada del uréter llamada pelvis renal, y que en continuidad con éste se encarga de transportar la orina desde el riñón hacia la vejiga. La pelvis de cada uréter la forman los cálices mayores, constituidos por los cálices menores, todos en forma de embudo ajustados a las pirámides renales, la punta de cada pirámide se llama papila y se proyecta hacia un cáliz menor.

Por otra parte, el riñón presenta una organización macroscópica peculiar, la cual se divide en dos regiones anatómicas: *cortical* (corteza renal) y *medular*. Esta última está formada por las pirámides renales (cuyos vértices se dirigen hacia los cálices menores y su base hacia la corteza) y las columnas renales que separan a las pirámides (Figura 1-5). Microscópicamente, el riñón se distinguen tres componentes estructurales: *la cápsula*, constituida por tejido conectivo denso irregular, *el estroma*, constituido por tejido conectivo reticular que ocupa el espacio intersticial donde se sitúan vasos sanguíneos, linfáticos y

nervios y *el parénquima* que constituye la mayor parte de la estructura renal y está formado por la nefrona y los túbulos colectores (Cotran *et al*,1999).



Figura 1-4. Descripción topográfica del sistema urinario masculino y femenino (Accesado de la red, ADAM, 2009).

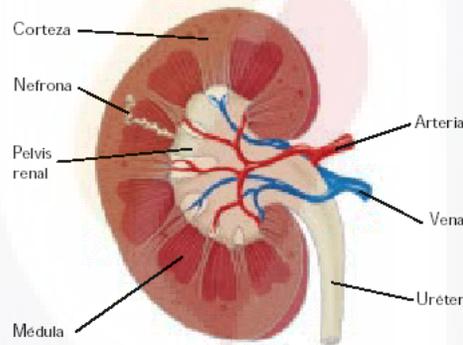


Figura 1-5. Estructura macroscópica del riñón (Accesado de la red, ADAM, 2005).

La unidad básica estructural y funcional de los riñones es la nefrona, (cada riñón contiene cerca de un millón de nefronas) sitio donde se llevan a cabo los procesos fisiológicos y bioquímicos que modifican la composición del agua plasmática que fluye por estas estructuras para formar la orina como producto final. Los componentes de la nefrona son: *glomérulo* (estructura vascular de $\approx 200 \mu\text{m}$ de diámetro, formada por un ovillo de capilares que provienen de la arteriola aferente y que termina en una arteriola eferente), *cápsula de Bowman* (estructura epitelial que recibe el ultrafiltrado proveniente del

glomérulo), *túbulo contorneado proximal*, *asa de Henle* y *túbulo contorneado distal*) (Figura 1-6).

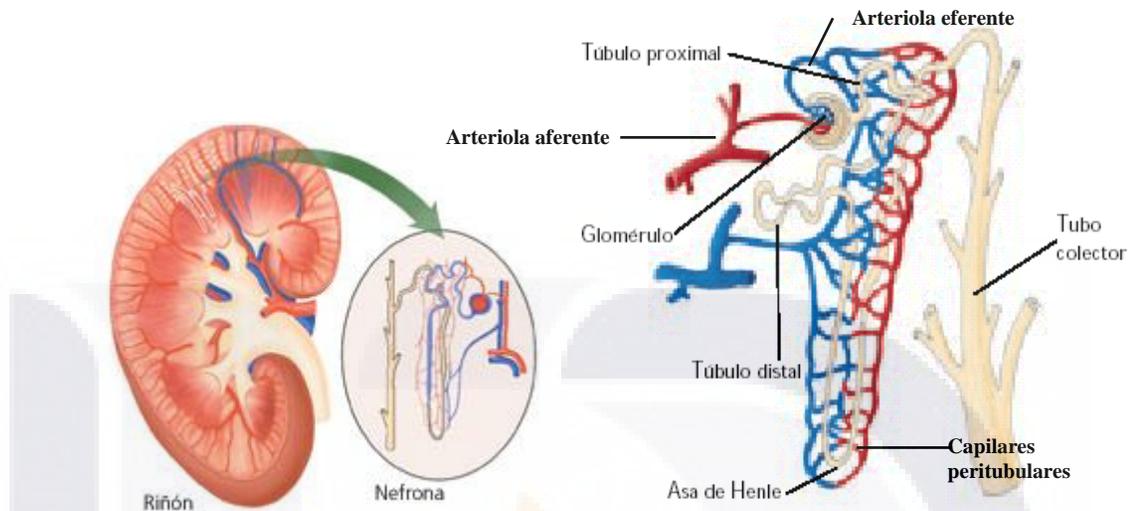


Figura 1-6. Estructura microscópica del riñón (Accesado de la red, ADAM, 2005).

El riego sanguíneo en las nefronas ocurre de la siguiente manera: la sangre ingresa a cada riñón por la arteria renal, posteriormente la arteria se divide en ramas cada vez más pequeñas (arterias interlobares, arqueadas y corticales o interlobulares). Las arterias radiales corticales se proyectan hacia la superficie externa del riñón, de esta manera nacen las arteriolas aferentes, cada una de ellas lleva sangre hacia un glomérulo, que representa un ovillo de capilares. Tanto arteriolas como glomérulos se encuentran en la corteza. Los capilares glomerulares salen a través de la arteriola eferente en el polo vascular de la cápsula de Bowman. La arteriola eferente da lugar a un segundo grupo de capilares, los peritubulares, distribuidos de manera profusa por la corteza. Finalmente, estos capilares se reúnen entre sí para formar las venas por las que la sangre abandona el riñón (Figuras 1-5 y 1-6).

Cada una de las nefronas realiza tres procesos básicos: filtración, reabsorción y secreción. La filtración consiste en el paso de agua y solutos, provenientes de las arteriolas aferentes, a través de los capilares glomerulares, hacia la cápsula de Bowman. Se filtran elementos como la glucosa, aminoácidos, proteínas de bajo peso molecular, sustancias con

cargas positivas, entre otras. La reabsorción tiene lugar en el sistema tubular de la nefrona y consiste en el paso de sustancias desde la luz tubular a través de la capa epitelial hacia el intersticio tubular y de ahí a la circulación en los capilares peritubulares. Este proceso difiere en los distintos segmentos del sistema tubular y ocurre por distintos mecanismos de transporte. Se reabsorben sustancias como la glucosa, agua, iones de sodio y otros compuestos, dependiendo de sus concentraciones en el medio intracelular y de la acción de distintas hormonas como la antidiurética, la paratiroidea y el péptido natriurético auricular. Finalmente el proceso de secreción consiste en el desplazamiento de sustancias hacia la luz tubular provenientes de las propias células tubulares o bien, del intersticio. Los procesos de reabsorción y secreción mantienen el equilibrio ácido-base mediante el desplazamiento de cationes o aniones.

Por otra parte, los riñones efectúan una gran variedad de funciones para el cuerpo, la mayor parte de las cuales es esencial para la vida, aunque son bien conocidos por ser los órganos excretores por excelencia.

Para realizar ese gran número de funciones, los riñones reciben cada minuto de 1200 a 1300 mL de sangre o 20% del gasto cardíaco, de tal manera que diariamente toda la sangre pasa 360 veces por dichos órganos.

Las funciones que realizan los riñones y que permiten el mantenimiento de la homeostasis del organismo son:

Regulación de los equilibrios hídricos y electrolítico

Los riñones tienen la capacidad de reaccionar mediante la variación del contenido de agua en la orina, con lo que conservan el balance de ésta (contenido corporal total constante de agua). Además, los riñones excretan minerales a tasas muy variables, manteniendo también el equilibrio interno de los mismos; esta regulación es específica e independiente para cada tipo de ion.

Control del equilibrio ácido-base corporal.

Además de los pulmones, que regulan la eliminación de ácidos volátiles, los riñones también participan de manera determinante en la regulación del equilibrio ácido-base, excretando una orina ácida (ácidos no volátiles) o alcalina. Esta función renal se logra mediante la filtración o secreción de H^+ (pérdida de ácidos) y filtración o secreción de HCO_3^- .

Excreción de desechos metabólicos y sustancias bioactivas

En los riñones, los productos de desecho del metabolismo celular y xenobiótico, son eliminados continuamente y concentrados en la orina, la cual sale del riñón por los uréteres y se dirige a la vejiga urinaria, donde se acumula hasta ser evacuada periódicamente por la uretra (Figura 1-4). En la mayoría de los casos esos productos metabólicos carecen de función y son dañinos a concentraciones altas, por ejemplo la urea, ácido úrico, creatinina, productos finales del desdoblamiento de la hemoglobina, metabolitos de hormonas y xenobióticos, entre muchos otros compuestos.

No todas las sustancias eliminadas por los riñones carecen de función, sino que algunas de ellas son bioactivas, por ejemplo las hormonas y xenobióticos que afectan la función corporal.

Regulación de la presión arterial

La presión arterial es dependiente del volumen sanguíneo y éste, a su vez depende de la conservación renal del balance de agua y sodio. De este modo, mediante el control del volumen, los riñones participan en la regulación de la presión sanguínea, pero también lo hacen mediante la generación de sustancias vasoactivas que regulan la actividad del músculo liso en los vasos periféricos.

Regulación de la producción de eritrocitos (función endócrina)

En los riñones, un grupo especializado de células, producen eritropoyetina, una hormona que participa en el control de la producción de eritrocitos por la médula ósea. La disminución de la presión parcial de oxígeno en el tejido renal es el estímulo principal para

la producción de esta hormona, como sucede en la anemia, isquemia renal e hipoxia. Por tan motivo la anemia caracteriza a la enfermedad renal crónica.

Regulación de la producción de vitamina D

La síntesis de vitamina D comprende una serie de transformaciones, la última de las cuales ocurre en los riñones. La forma activa de la vitamina D, la 1,25-dihidroxitamina D₃, se sintetiza en los riñones; su producción está regulada por hormonas que controlan el equilibrio de los iones de calcio y fósforo.

Gluconeogénesis

La síntesis de nueva glucosa a partir de fuentes que no son carbohidratos (aminoácidos y glicerol) tiene lugar principalmente en el hígado, sin embargo, los riñones realizan también este proceso, sobre todo durante ayunos prolongados (Eaton y Pooler, 2006).

1.4. Biotransformación y eliminación de xenobióticos.

Los seres humanos están expuestos continuamente en su ambiente a una gran variedad de agentes tóxicos. La mayoría de estos compuestos son lipofílicos y se absorben fácilmente a través de la piel, pulmones y tracto gastrointestinal. Por ello, la exposición constante o intermitente a esos xenobióticos puede resultar en su acumulación en el organismo. A pesar de ello, los seres vivos cuentan con rutas de eliminación efectivas para tales sustancias, a través de la orina, bilis, heces fecales, leche materna, pulmones y por transpiración. Estas sustancias pueden ser eliminadas sin cambio alguno o bien, en forma de metabolitos derivados de la sustancia original.

Ahora bien, los compuestos lipofílicos tienden a difundir en las membranas celulares con facilidad, son reabsorbidos, pobremente excretados y por lo tanto susceptibles de ser acumulados en el organismo, mientras que los compuestos hidrosolubles son excretados fácilmente. Por fortuna, los animales han desarrollado procesos bioquímicos que convierten a los compuestos lipofílicos en metabolitos hidrofílicos. Tales procesos forman parte del mecanismo de *biotransformación* que involucra la participación de enzimas. Los

metabolitos formados a través de este proceso 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 el túbulo renal y en el intestino y, finalmente, se promueve la excreción de tales compuestos a través de las rutas urinaria y biliar-fecal (Klaassen *et al*, 1986; Berry, 1996).

Las reacciones enzimáticas del proceso de biotransformación pueden ser divididas en dos fases que suceden de manera consecutiva: a) *fase I*, involucran reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, y b) *fase II*, que consisten en reacciones de conjugación y síntesis. La función principal de las reacciones de fase I, es la adición de grupos -OH, -SH, -NH₂ y -COOH. La adición de estos grupos funcionales permite que se lleven a cabo las reacciones de fase II, en las cuales, los metabolitos generados en la fase I se unen de manera covalente a moléculas endógenas (ejemplo, ácido glucurónico, glutatión, 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, lo que facilita su eliminación. 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 *et al*, 1986). Estas reacciones se resumen en la figura 1-7.



Figura 1-7. 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 son un sistema enzimático acoplado constituido por dos enzimas: 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, que tiene función de oxidasa terminal. Sin embargo, al contrario de la reductasa, existe una gran diversidad de formas del CYP, 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 (Figura 1-8). El par de electrones extras, 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 destoxificación 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.

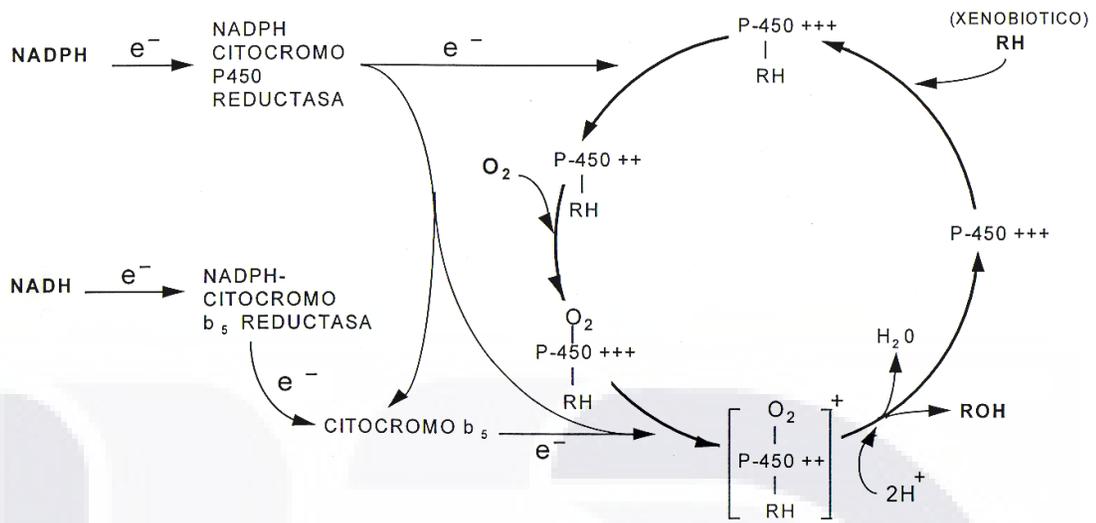


Figura 1-8. Mecanismo de oxidación de xenobióticos por el sistema de transporte de electrones del citocromo P450 (Tomado de Niesink *et al.*, 1996).

2. ANTECEDENTES

2.1. Hidrocarburos alifáticos halogenados.

Los compuestos orgánicos más sencillos son los hidrocarburos o sea compuestos que contienen solamente carbono e hidrógeno. Todos los demás compuestos orgánicos se consideran, con fines de clasificación, como derivados de los hidrocarburos. De acuerdo con la estructura de los enlaces entre los átomos de carbono, los hidrocarburos se clasifican en dos tipos: alifáticos y aromáticos.

Los hidrocarburos alifáticos incluyen a los alcanos o parafinas, alquenos u olefinas y alquinos o acetilénicos; además no contienen anillos bencénicos y en ellos, los átomos de carbono están dispuestos en cadena.

Los hidrocarburos aromáticos o de cadena cerrada, son hidrocarburos que contienen anillos de benceno o características estructurales semejantes.

Ahora bien, ambos tipos de hidrocarburos pueden contener algún hidrógeno de la molécula sustituido por un átomo de halógeno: flúor, cromo, bromo o yodo. Entre los hidrocarburos halogenados, los clorados son de mucho interés toxicológico, como el tetracloruro de carbono, un hidrocarburo alifático.

2.1.1. Clasificación y usos industriales.

Los hidrocarburos alifáticos o acíclicos pueden ser saturados (parafinas) y no saturados (Figura 2-1). Los primeros poseen enlaces covalentes simples lo cual les confiere cierta inercia química (Ebbing, 1996).

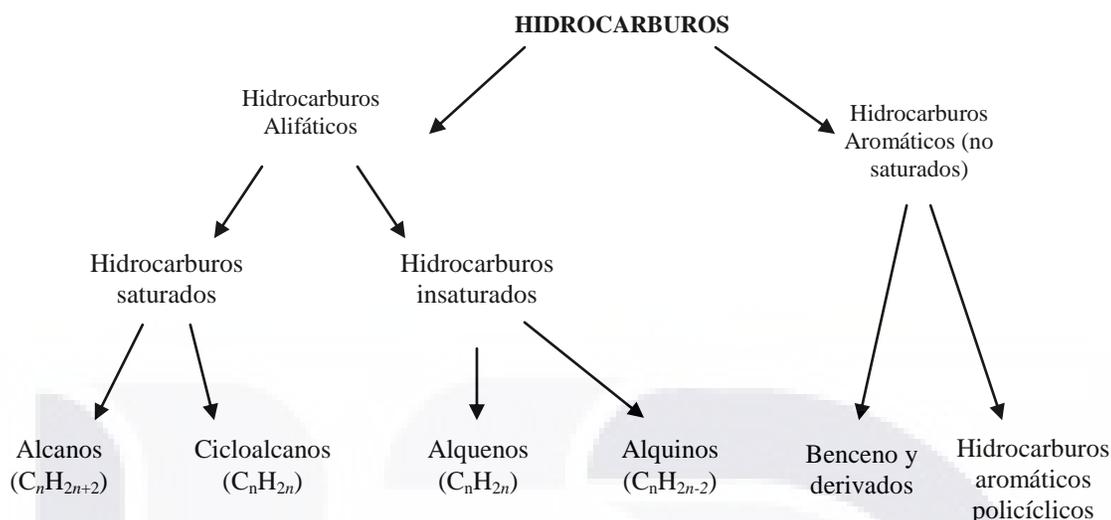


Figura 2-1. Clasificación de los hidrocarburos (Tomado de Ebbing, 1996).

Con relación a su aplicación, los hidrocarburos alifáticos son utilizados con frecuencia como disolventes de grasas, aceites, caucho y resina, además se emplean en las industrias durante la obtención y recuperación de aceites, en la fabricación de pinturas, tintas, colas y adhesivos, así como materia prima de síntesis orgánica.

2.1.2. Vías de ingreso en los seres humanos.

Los hidrocarburos alifáticos son bien absorbidos por las vías inhalatoria, oral y dérmica, sin embargo, los efectos tóxicos son mayores cuando ingresan al organismo a través del árbol bronquial. De esta forma, la ingestión oral de 500 a 1000 ml produce síntomas menores, mientras que al aspirar una cantidad tan pequeña como 1 ml, puede generarse una severa neumonitis química.

2.1.3. Efectos tóxicos.

En general, los hidrocarburos son agentes irritantes para los ojos, la piel y las vías respiratorias. La exposición prolongada a sustancias líquidas destruye las grasas de la piel, con riesgo de que se genere dermatitis. La inhalación de concentraciones altas de los

vapores de hidrocarburos puede causar pérdida del conocimiento, ya que afectan al sistema nervioso central (Dreisbach y Robertson, 1999).

Los hidrocarburos empleados como solventes en diversas industrias producen depresión del sistema nervioso central. Es importante señalar que ante intoxicaciones agudas los efectos tóxicos a este nivel, son irreversibles. Además, existe evidencia de que la exposición ocupacional a estos compuestos produce no solo alteraciones neurológicas, sino daño renal y hepático (Rincón *et al*, 1999).

2.2. Tetracloruro de carbono (CCl₄)

El tetracloruro de carbono (CCl₄) es un líquido incoloro, de olor dulce y volátil a temperatura ambiente. Es miscible en la mayoría de los solventes alifáticos, además él mismo es un solvente. Su solubilidad en agua es baja. No es flamable y es estable en presencia de aire y luz. Su descomposición puede producir fosgeno, dióxido de carbono y ácido clorhídrico (IPCS, 1999).

Con relación a las concentraciones tóxicas de este compuesto, las dosis letales medias (DL₅₀), de acuerdo con diversos estudios, varían entre las especies y son dependientes de la ruta de exposición (Tabla 2-1).

Tabla 2-1. DL₅₀ del CCl₄ para diferentes especies animales a través de tres vías de entrada al organismo.

Ruta de exposición	DL ₅₀	Especie
Vía inhalatoria (durante 6 h)	7228 ppm	rata y ratón
Vía inhalatoria (durante 8 h)	9528 ppm	rata y ratón
Vía oral	3000 mg/kg	gato
Vía dérmica	10 g/kg	conejo y Puerco de Guinea

Ahora bien, el CCl₄ ejerce efectos tóxicos en diversos órganos y la intensidad de la manifestación de tales efectos está en función de la ruta de exposición, el tiempo y la dosis.

Cabe señalar que no se ha encontrado evidencia suficiente para concluir que el CCl_4 tiene efectos teratogénicos o sobre la fertilidad de los mamíferos (IPCS, 1999).

2.2.1. Fuentes de producción y usos industriales

Fuentes naturales: estudios de laboratorio sugieren que el CCl_4 podría formarse, probablemente en la troposfera mediante reacciones fotoquímicas, inducidas con luz solar, entre alquenos clorinados (Singh *et al.*, 1975). Por otra parte, las emisiones volcánicas gaseosas son fuente de CCl_4 (Isidorov, Zenkerich y Loffe, 1990). Sin embargo, numerosas investigaciones han demostrado que las concentraciones atmosféricas globales de CCl_4 son de origen antropogénico (IPCS, 1999).

Fuentes antropogénicas: la producción de CCl_4 comenzó a partir de 1907 en los Estados Unidos de Norteamérica. Éste puede formarse por clorinación de metano, metanol, disulfuro de carbono, propano, 1,2-dicloroetano e hidrocarburos mayores. Además, los procesos de clorinación para el tratamiento de aguas residuales son fuentes formadoras de este hidrocarburo.

Con relación al uso, el CCl_4 es empleado con frecuencia en la producción de clorofluorocarbonos, los cuales a su vez, son utilizados principalmente como refrigerantes, propelentes, agentes espumantes y solventes, así como en la producción de otros hidrocarburos clorinados (IPCS, 1999).

En este contexto, la producción mundial del CCl_4 abarcó de 850 a 960 toneladas en los años de 1980 a 1988. El uso de este compuesto se incrementó en los EUA durante los años de 1980 a 1987. Sin embargo, a partir del Protocolo de Montreal (a cerca de la disminución del uso de sustancias que dañan la capa de ozono), se establecieron reglas para retirar la producción y consumo de CCl_4 . Por ello, el uso industrial de este hidrocarburo como agente limpiador y extintor ha desaparecido; a pesar de ello, en la actualidad aún es utilizado como fumigante de granos, pesticida, solvente para grasas y aceites, desengrasante

de metales, así como en la producción de pintura, tinto, plástico, semi-conductor y aditivo de petróleo (<biblio>).

2.2.2. El CCl₄ en el medio ambiente.

A partir de las fuentes emisoras (naturales o antropogénicas) el CCl₄ es depositado en el aire y arrastrado por la lluvia hacia la superficie terrestre y cuerpos de agua superficiales sin peligro de ser filtrado a través del suelo hacia mantos freáticos, debido a su alto grado de volatilización. En el medio acuático, este hidrocarburo tiene poca tendencia a la sedimentación, en el suelo, no se asocia con partículas edáficas y en el aire, es resistente a las reacciones de fotólisis y foto-oxidación que ocurren en la tropósfera, pero en la estratósfera el CCl₄ es degradado por fotólisis a través de radiación de onda corta. En este contexto, la presencia de CCl₄ en las capas altas de la atmósfera resulta de gran importancia ya que contribuye a la degradación de la capa de ozono.

Por lo anterior, la mayor parte del tiempo, el CCl₄ se encuentra en la atmósfera. Su vida media en este sitio es de 30 a 100 años y circula entre la tropósfera y la estratósfera.

Ahora bien, en lo referente a la degradación biológica por microorganismos, el CCl₄ no puede ser biodegradado por la vía aerobia pero si por anaerobiosis a través de una deshalogenación reductiva. En los mamíferos, este compuesto es metabolizado con rapidez, por lo que su potencial de bioacumulación es muy bajo, sin embargo, es justamente la metabolización del compuesto lo que genera radicales tóxicos que pueden llegar a producir efectos graves en diversos órganos y que conducen frecuentemente a la muerte. A pesar de que este hidrocarburo se volatiliza rápidamente, pequeñas concentraciones pueden permanecer en el agua y en el suelo. Por tal motivo, en el medio acuático, el CCl₄ provoca alteraciones diversas en los organismos, tales como disminución del crecimiento y reproducción de algas del género *Mycrocistis* y de cladóceros planctónicos como *Daphnia magna*. Comúnmente conocidos como pulgas de agua, estos cladóceros han sido de gran utilidad en el estudio de la toxicidad del CCl₄ y se han establecido dosis letales medias de 35 mg/L para esta clase de organismos. Entre los vertebrados, se ha encontrado que los

estados larvarios de anfibios también resultan afectados por la presencia de CCl_4 en el agua ($\text{DL}_{50}=0.9 \text{ mg/l}$, para *Rana catesbeiana*). Las aves y mamíferos terrestres presentan menor sensibilidad ante exposiciones agudas a CCl_4 (Crookes, *et al*, 1994; ATSDR, 2010; IPCS, 1999).

2.2.3. Aspectos toxicocinéticos y toxicodinámicos

* Absorción.

El CCl_4 es absorbido fácilmente por el tracto gastrointestinal y por los pulmones. Su absorción dérmica también es posible tanto en la fase líquida como en la de vapor, aunque esta última es muy baja (IPCS, 1999). En muchas investigaciones enfocadas al estudio de la toxicidad del CCl_4 se ha utilizado el aceite de maíz como vehículo en la administración oral (Paul y Rubinstein, 1963; Larson y Plaa, 1965; Marchand, McLean y Plaa, 1970) o emulphor, un aceite poliethoxilado (Sanzgiri *et al*, 1995).

Diversos estudios han investigado la manera como el CCl_4 entra al compartimento sanguíneo a partir de diferentes vías:

- Jakobson *et al*, (1982) investigaron la entrada percutánea del CCl_4 líquido (1 mL) en cerdos de guinea y encontraron que en una hora se alcanza una concentración pico en sangre de 1 mg de CCl_4/L .

- Wahlberg y Boman (1979) encontraron que al aplicar 0.5 o 2 mL de CCl_4 sobre la piel (3.1 cm^2) de cobayos, en pocos días ocurre absorción total del compuesto.

- Sanzgiri *et al*, (1995) encontró que en ratas expuestas por vía inhalatoria a concentraciones de 100 o 1000 ppm de CCl_4 (641 o 6410 mg/m^3) durante 2 h, la cantidad total absorbida es de 17.5 y 179 mg/kg de peso corporal. Los valores de C_{max} (mg/mL) son de 1 y 13, respectivamente y los valores de AUC (mg.min/mL) de 120 y 1900, respectivamente.

- El programa IRIS de la Agencia de Protección Ambiental-EUA (EPA) considera el 40% de absorción como la media para el cálculo del consumo respiratorio en humanos. Los valores determinados oscilan entre el 30 % y el 65 % (USA-EPA, 1991).

*** Distribución.**

La distribución del CCl_4 en los tejidos corporales ha sido investigada en diferentes especies animales:

- Bergman (1984) estudió la distribución de CCl_4 marcado con $[^{14}\text{C}]$ en ratones, después de una dosis única por vía inhalatoria (10 minutos; $256\ 000\ \text{mg}/\text{m}^3$ de aire); inmediatamente después de la exposición, encontró radioactividad en tejido graso, materia blanca del cerebro, médula espinal y nervios, hígado, riñones, glándulas salivales y mucosa gastrointestinal. Gran parte de la radioactividad presente en hígado y riñones no era extraíble, lo cual indicaba la unión covalente del tóxico a componentes tisulares.

- Watanabe *et al*, (1986) también encontraron CCl_4 en hígado, riñón, cerebro, músculos y sangre (en orden descendente) 3 h después de la administración oral de este compuesto.

- Teschke *et al*, (1983) encontraron algo similar a lo anterior. En ratas Wistar hembras, las concentraciones mayores de CCl_4 se observaron en sangre (26 mg/L), hígado y tejido graso de ratas después de la administración de una dosis única de CCl_4 por vía oral (1.5 mL/kg de peso corporal).

- Paustenbach *et al*, (1986) expusieron ratas macho Sprague-Dawley, de forma repetida, a 100 ppm ($641\ \text{mg}/\text{m}^3$) de vapor de CCl_4 marcado con $[^{14}\text{C}]$, durante 8 u 11.5 horas/día en periodos de 1 a 10 días y encontraron que el hidrocarburo alcanzaba concentraciones mayores en tejido graso, hígado, pulmones y glándulas adrenales.

De acuerdo con lo anterior, y en orden descendente, el CCl_4 se distribuye en mayor proporción en hígado, riñones, cerebro, médula espinal y tejido adiposo.

*** Eliminación.**

En la rata, las rutas principales de eliminación del CCl_4 son el aire expirado (como dióxido de carbono y cloroformo –producto del metabolismo reductivo-) y la orina (Reynolds *et al*, 1984). Ante la exposición oral o inhalatoria de CCl_4 , una porción aproximada del 30-50%

de la dosis administrada es exhalada como CCl_4 o como CO_2 (Cartlidge y Stranding, 1991). Page y Carlson (1994) reportaron que los mecanismos biliares participan en la eliminación fecal, pero esta vía de eliminación no contribuye de manera significativa a la excreción completa del compuesto, ya que por ella se elimina aproximadamente el 1% de la dosis administrada. A su vez, Erickson (1981) encontró que el CCl_4 también es excretado a través de la leche materna.

Experimentalmente, se ha encontrado que la cantidad de CCl_4 excretado y el tiempo durante el cual se excreta dependen de la dosis (Reynolds *et al*, 1984). Kim *et al*, (1990) encontraron que el tiempo de vida media del CCl_4 en la sangre es de 98 minutos y su aclaramiento es de 0.13 mL/min/g cuando se administra oralmente una dosis de 25 mg/kg de peso. El aclaramiento del CCl_4 en ratas después de exponerlas por vía inhalatoria es de tipo bifásico, con un tiempo de vida media inicial de 7 a 10 horas (Paustenbach *et al*, 1986; Veng-Pedersen *et al*, 1987). La exposición por tiempos más prolongados disminuye la depuración y aumenta las concentraciones en el tejido adiposo.

2.2.4. Biotransformación y unión covalente de metabolitos a moléculas titulares.

El metabolismo del CCl_4 es iniciado por el citocromo P450 (CYP 450) mediante la transferencia de un electrón al enlace C-Cl, formándose un radical aniónico que elimina al cloro (mecanismo de deshalogenación reductiva). De este modo, se forma el radical triclorometilo ($\text{Cl}_3\text{C}^\bullet$) que puede sufrir procesos de biotransformación oxidativos y reductores (Figura 2-2). Las isoenzimas implicadas en este proceso son el CYP-2E1 y CYP 2B1/B2 (Raucy *et al*, 1993; Gruebele *et al*, 1996).

Algunas isoformas de citocromo pueden ser especialmente susceptibles a la degradación por CCl_4 (Tierney *et al*, 1992). Al respecto, Dai y Cederbaum (1995) proporcionaron evidencia de que el CCl_4 inactiva al CYP-2E1 y reduce la producción de proteína del mismo, en una línea celular expresada constitutivamente en el ser humano. A pesar de que los atrapadores de radicales libres o antioxidantes, protegen a las biomoléculas

contra la oxidación generada por tales radicales, no pueden evitar la degradación de diversas formas de citocromo, como la 2E1.

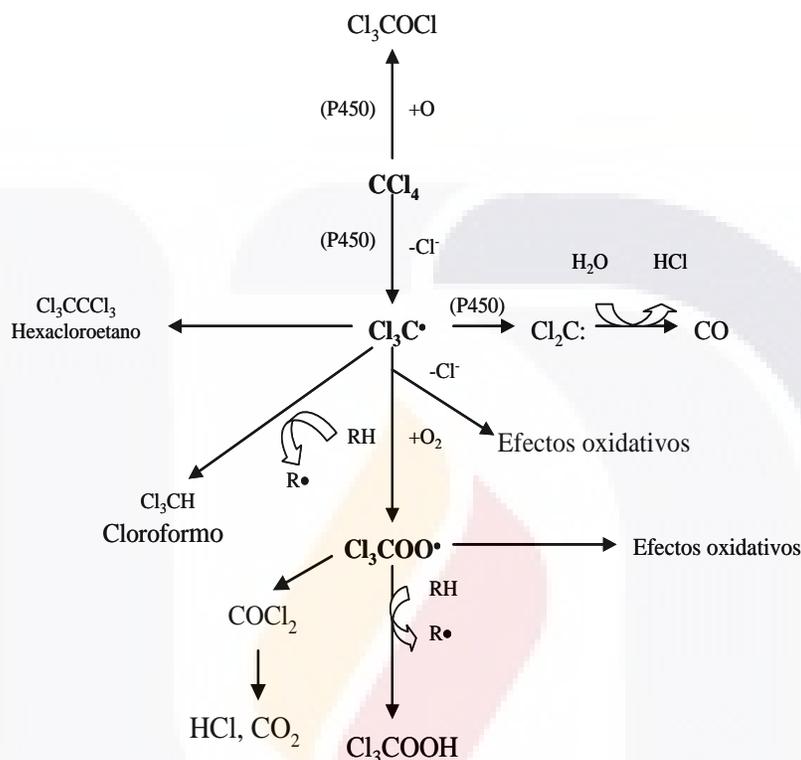


Figura 2-2. Biotransformación del tetracloruro de carbono (Tomado de Harris y Anders, 1980; Anders y Jakobson, 1985; McGregor y Lang, 1996).

Ahora bien, la ruta de eliminación más importante de los radicales $\text{Cl}_3\text{C}\cdot$ es la reacción con el oxígeno molecular, resultando en la formación de radicales triclorometilperoxilo o peroxitriclorometilo ($\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$) (Packer *et al*, 1978; Pohl *et al*, 1984; McCay *et al*, 1984). Este intermediario, el cual es más reactivo que el radical $\text{Cl}_3\text{C}\cdot$ (Dianzani, 1984), es capaz de oxidar los lípidos membranales (lipoperoxidación) y producir 4-hidroxi alquenos (Benedetti *et al*, 1982; Comporti *et al*, 1984). El radical $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$, también puede producir fosgeno (COCl_2), el cual puede interactúa nuevamente con macromoléculas tisulares o con agua, produciendo finalmente ácido clorhídrico (HCl) y dióxido de carbono (Pohl *et al*, 1984). En este contexto, Rubinstein y Kanics (1964)

reportaron la transformación del CCl_4 en dióxido de carbono en homogenado de hígado; esta transformación *in vivo* ha sido reportada por Reynolds *et al*, (1984). A su vez, el fósgeno puede conjugarse con diferentes compuestos endógenos, durante la fase II de biotransformación. Entre tales compuestos se encuentran la cisteína, con la formación del ácido 2-oxotiazolidin-4-carboxílico, y el glutatión reducido (GSH), formando un compuesto llamado diglutatiónil ditiocarbonato, *in vivo* (Shah *et al*, 1979; Kubic y Anders, 1980; Pohl *et al*, 1981).

La biotransformación del CCl_4 puede generar también cloroformo, proceso independiente de NADPH, en distintas especies de mamíferos. Esta ruta de transformación fue estudiada por Castro y col., (1990) en preparaciones de hígado de ratones C3H, ratas Sprague-Dawley y Hamsters Golden Syrian. Encontraron también que, bajo condiciones anaeróbicas, la transformación es más intensa en ratones que en Hamsters y más notable en éstos últimos que en ratas; en condiciones aeróbicas la transformación es mucho más intensa en Hamsters que en ratones y más intensa en ratones que en ratas.

Por otra parte, Shertzer y col., (1988), encontraron que los radicales generados a partir de la biotransformación del CCl_4 , pueden unirse de forma covalente con macromoléculas, produciendo efectos oxidativos. Cuando las moléculas afectadas son los lípidos, el fenómeno se conoce como lipoperoxidación (Figura 2-3). Este proceso conduce a la pérdida de la homeostasis del calcio intrahepático por alteraciones de la permeabilidad selectiva de las membranas celulares.

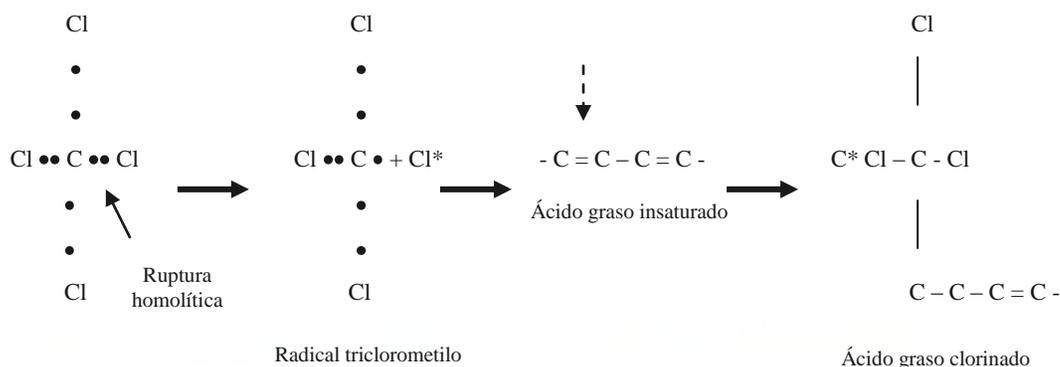


Figura 2-3. Formación del radical triclorometilo. Este radical actúa sobre las dobles ligaduras de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares generando, en consecuencia, ácidos grasos clorinados. Este proceso altera la funcionalidad de las membranas, evita la síntesis adecuada de proteínas, provoca disminución de la actividad de algunas enzimas, conduce a la pérdida de la homeostasis del calcio intracelular (apoptosis), e incluso pueden aparecer alteraciones del material genético (Tomado de Plaa, 1995).

Cambon-Gros *et al*, (1986) encontraron que fetos de ratas Sprague-Dawley pueden metabolizar el CCl_4 y dar origen al radical CCl_3^\bullet , el cual se une de forma covalente a los componentes lipídicos de la membrana del retículo endoplásmico liso, lo que produce alteraciones del CYP450 y en el almacenamiento de calcio. Lo anterior demuestra los efectos teratogénicos del CCl_4 .

En este contexto, Tjalve y Lofberg (1983) encontraron que la unión covalente entre los metabolitos del CCl_4 y las biomoléculas, ocurre en las células de diversos tejidos: hígado, corteza renal, mucosa del tracto respiratorio, cavidad bucal y esófago. Bergman (1984) encontró que esa unión covalente también ocurre en testículos. Ahora bien, de acuerdo con Villarruel *et al*, (1977) la oxidación de moléculas endógenas ocurre con mayor intensidad en hígado, corteza y médula renales.

Sin embargo, de acuerdo con Díaz *et al*, (1975) la lipoperoxidación no es el único mecanismo de daño del CCl_4 , sino que existen otras rutas, principalmente a nivel genético, que desencadenan daño en órganos fuertemente afectados por el hidrocarburo, como el hígado. En efecto, Oraumbo y Van Duuren (1989) señalan que los metabolitos electrofílicos derivados de la biotransformación del CCl_4 tiene la capacidad de formar aductos de tipo covalente con la cromatina.

Con respecto a lo anterior, el significado de las alteraciones provocadas por el CCl_4 sobre la viabilidad de los genes codificantes para diversas proteínas no se ha establecido con claridad. Sin embargo, Cartlidge y Standing (1991) detectaron aductos formados entre el ADN y los radicales triclorometilo y peroxitriclorometilo, además de alquilación de purinas en roedores y alteraciones en las cromátides de células de médula ósea y aberraciones cromosómicas en rata.

En este sentido, numerosos estudios han demostrado la propiedad carcinogénica del CCl_4 *in vivo*, en roedores expuestos a dosis parenterales u orales repetidas, los cuales desarrollan tumoraciones hepáticas. Estos mismos efectos se observan en hamsters expuestos por vía inhalatoria a CCl_4 (IARC).

2.3. Alteraciones renales por intoxicaciones agudas y crónicas.

* Toxicidad renal.

Un agente nefrotóxico es toda sustancia que, situada en el sistema renal, es capaz de producir alteraciones morfológicas y fisiológicas que conducen a lesiones del órgano más o menos graves. En ocasiones, el compuesto reactivo es la estructura inicial del xenobiótico, mientras que en otros casos la biotransformación (bioactivación) es la fuente generadora de metabolitos neurotóxicos. Este último, es el caso del CCl_4 .

Ahora bien, las características anatómicas y fisiológicas de los riñones los hacen particularmente susceptibles a los efectos tóxicos de muchos xenobióticos. En efecto, estos órganos sólo representan un 0.5% de la masa corporal, sin embargo reciben el 20-25% del gasto cardiaco, de tal modo que cualquier xenobiótico presente en la circulación sistémica puede llegar al riñón en cantidades relativamente elevadas. Además, la reabsorción de agua del filtrado glomerular incrementa la concentración del agente tóxico en el fluido tubular y puede alcanzar niveles tóxicos. Asimismo, el incremento de concentración también puede conducir a la precipitación del compuesto y a la obstrucción del túbulo renal. Por ello, los riñones y el hígado, son los órganos más afectados por la intoxicación con CCl_4 ,

independientemente de la ruta de la ruta de ingreso (dosis superiores o iguales a 200 ppm resultan en daño renal) (Cartlidge y Stading, 1991).

Muchos agentes nefrotóxicos tienen como sitio de acción el túbulo proximal de la nefrona, sobre el que actúan de manera específica, tal como ocurre con algunos antibióticos, compuestos antineoplásicos, hidrocarburos halogenados (CCl₄), micotoxinas y metales pesados. Los agentes nefrotóxicos como el CCl₄ pueden provocar mal funcionamiento de los riñones y esta respuesta se refleja en tres tipos de lesiones: falla renal aguda, falla renal crónica y adaptación renal posterior a una agresión nefrotóxica.

2.3.1. Falla renal aguda.

La falla renal aguda se caracteriza por el deterioro brusco de la función renal por la alteración súbita de la perfusión sanguínea y del parénquima renal (Hernando, 1997). Se caracteriza por una caída brusca en la magnitud de la filtración glomerular, seguida de azohemia o incremento de las concentraciones en sangre de compuestos nitrogenados, particularmente de urea. Esta es una de las manifestaciones más comunes de la nefrotoxicidad.

La patología de la falla renal aguda incluye necrosis extensiva, sobre todo en el túbulo proximal, de ahí el nombre de necrosis tubular aguda (NTA) que reciben la mayoría de las fallas renales de este tipo. Existen cambios morfológicos, como la pérdida del borde en cepillo y de células individuales que dejan desnuda la membrana basal, por lo que se observa diseminación de células adyacentes para tratar de contrarrestar la pérdida celular; aumento de mitosis y congestión de los vasos rectos con eritrocitos y leucocitos (Olsen y Solex, 1994; Racusen, 1999). En casos de falla renal por agentes tóxicos, la muerte celular ocurre por necrosis; la apoptosis se desencadena en falla renal por etiología distinta a la intoxicación. La unión corticomedular es un lugar particularmente susceptible al daño (incluyendo el túbulo proximal descendente y la porción ascendente medular gruesa), debido a que en esta área el flujo sanguíneo es relativamente bajo a pesar de la elevada

actividad metabólica para la reabsorción activa de sodio (Brezis y Epstein, 1993; Brezis y Rosen, 1995).

Durante la falla renal aguda, existe además disminución de la tasa de filtración glomerular (TFG) debido principalmente a cuatro factores: 1) disminución del flujo sanguíneo renal, 2) disminución del coeficiente de ultrafiltración glomerular, 3) escape del filtrado a través del epitelio tubular dañado y 4) obstrucción tubular.

Ahora bien, diversos estudios han demostrado la importancia de fenómenos específicos relacionados con el daño producido en células renales tales como la alteración de la homeostasis del calcio intracelular, depleción del trifosfato de adenosina (ATP), generación de radicales libres, la función alterada del endotelio, la presencia de leucocitos, la proliferación y diferenciación celular, pérdida de polaridad de las células epiteliales tubulares y pérdida de células de la membrana basal (Brezis y Rosen, 1995).

Entre los mecanismos celulares que conducen a la falla renal aguda se encuentran:

- a. Déficit de ATP. El grado de disminución de los niveles de ATP varía con la duración de la presencia del agente causal, que al hacerse más prolongada implica la reducción de precursores y el daño de las mitocondrias. Entre los efectos inmediatos de la reducción de ATP en las células tubulares está el cese de la actividad de las bombas ATPásicas de transporte iónico. Una consecuencia de este hecho es el hinchamiento o vacuolización celular por disminución de la extrusión de sodio y agua.
- b. Calcio e hidrogeniones. La disminución de ATP mencionada en el apartado anterior, inhibe la salida de Ca^{2+} vía Ca^{2+} -ATPasa y modifica su reciclaje hacia los depósitos intracelulares. La alteración de la homeostasis de calcio cumple un papel relevante en el daño celular. La agresión renal se acompaña de acidosis intracelular como consecuencia de la disminución de la actividad del mecanismo de salida de H^+ y probablemente, de un aumento de la tasa de producción de H^+ . Si bien, un grado marcado de acidosis puede ser un factor facilitador de la muerte celular, es posible

que un grado menor pueda tener un efecto citoprotector, a través de inhibición de pasos metabólicos potencialmente letales, como enzimas degradativas o consumo de O_2 .

- c. Enzimas degradativas: fosfolipasas y proteasas. La activación de fosfolipasas probablemente por daño en las membranas lisosomales, y las variaciones consiguientes en la composición lipídica de las membranas celulares son hechos comprobados en el daño renal agudo.
- d. Daño citoesquelético. Durante la falla renal aguda existen alteraciones en la organización de las fibras de actina, que tienen relación directa con cambios en la polaridad celular, desorganización de las microvellosidades del borde en cepillo, disfunción de las uniones estrechas intercelulares y pérdida de las relaciones normales célula-célula y célula-matriz extracelular. Entre estos cambios, el cambio de la polaridad celular, con pérdida, por ejemplo, del anclaje de la Na/K ATPasa en la región basolateral, parece ser uno de los más importantes en cuanto a alteración funcional, impidiendo el transporte unidireccional de solutos característico de las células con organización espacial especializada. La disminución de ATP es un elemento clave en este cambio de polaridad, que es reproducible en cultivos de células tubulares con reducción de ATP.

Un apartado adicional de importancia deriva del aumento de la expresión de proteínas de estrés (HSP, del término en inglés Heat Shock Proteins) en modelos de falla renal aguda por agentes nefrotóxicos. Estas proteínas ejercen un efecto protector celular que aún no ha sido estudiado con precisión.

Diversas investigaciones han estudiado la función renal en animales de experimentación expuestos a diferentes dosis de CCl_4 . Kluwe (1981) trabajó con ratas de la cepa Fisher y encontró que el peso de los riñones disminuía, al mismo tiempo que se presentaban fenómenos de hematuria, enzimuria y disminución de las concentraciones de glucosa sérica.

Ahora bien, dependiendo del elemento funcional alterado, la falla renal aguda se clasifica como prerrenal si lo que falla es la perfusión renal; como parenquimatoso o intrínseco si la alteración radica en las estructuras renales y obstructivo o postrenal si el flujo urinario está interrumpido.

A pesar del daño producido sobre el parénquima renal, es posible que la función renal se recupere, siempre y cuando el daño no haya sido muy severo. En este sentido, la ejecución de un programa preestablecido, que implica la expresión de genes de respuesta inmediata, como fos o egr1 (early growth response 1), así como la acción coordinada de factores de crecimiento, desempeñan un papel fundamental en la recuperación del tejido lesionado. Están identificados diversos mitógenos del túbulo proximal, como el factor de crecimiento transformante (TGF β), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), que al ser administrados farmacológicamente aceleran la recuperación de las lesiones tubulares. El uso de estos agentes se fundamenta en la existencia de receptores específicos en el túbulo proximal, en la capacidad mitogénica de los mismos, en el aumento de su expresión tras la inducción de la falla renal aguda (HGF y IGF 1) y en el papel crítico de algunos de estos factores (TGF β) en la embriogénesis renal (Hernando, 1997).

2.3.2. Falla renal crónica.

Muchas formas de lesión renal progresan inexorablemente hacia la insuficiencia renal crónica (IRC). A diferencia del daño renal agudo, luego del cual los riñones pueden recuperar sus funciones, el daño renal prolongado frecuentemente es irreversible y conduce a la destrucción progresiva de las nefronas. En estas circunstancias, la reducción del tejido renal produce hipertrofia estructural y funcional de las nefronas restantes. Estas nefronas reciben un aumento del flujo sanguíneo y del filtrado glomerular que parece depender de la disminución de la resistencia de las arteriolas, aferentes y eferentes, aunque la caída de la resistencia en las arteriolas aferentes parece ser mayor. Esto genera aumento de la presión en los capilares glomerulares y, en consecuencia, de la presión neta de filtración. La

hipertrofia compensadora se debe a la hiperfiltración adaptativa, mediada por aumentos de presión y flujo sanguíneo en los capilares glomerulares. Sin embargo, en última instancia, estas adaptaciones no son efectivas porque predisponen a la esclerosis de los glomérulos y al aumento de trabajo de los glomérulos menos afectados, lo que, a su vez, conduce a su destrucción final.

El volumen de los glomérulos suele aumentar, así como la longitud y el diámetro de los túbulos, especialmente del trayecto proximal, lo que aumenta la reabsorción proximal manteniendo el equilibrio glomérulo-tubular. Estas modificaciones estructurales son mecanismos adaptativos para el manejo adecuado de algunas sustancias, como el agua, el sodio y el potasio. Sin embargo, con otras sustancias los riñones insuficientes sólo realizan su regulación parcial, como sucede con el fósforo y el equilibrio ácido-base. Por otra parte, la insuficiencia renal crónica suele acompañarse de malnutrición grave, alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, así como del uso defectuoso de la energía.

La insuficiencia renal crónica tiene lugar en los casos de exposición prolongada a dosis relativamente pequeñas de un agente tóxico. En exposiciones de animales de experimentación al CCl_4 los cambios funcionales producidos por esta nefropatía se manifiestan por poliuria, glucosuria y proteinuria, cuando las dosis de CCl_4 son bajas; cuando las dosis son altas se presenta anuria y falla renal completa. Cabe señalar que la magnitud de la nefrotoxicidad causada por el CCl_4 , varía dependiendo de la especie, variedad y sexo (Klaassen *et al*, 1986).

2.3.3. Indicadores que valoran la función renal

Debido a que los riñones presentan una susceptibilidad elevada de sufrir daños por causa de enfermedades diversas y acciones tóxicas de agentes xenobióticos, existe la necesidad de valorar el funcionamiento de los riñones y para ello suelen utilizarse diversos compuestos indicadores como la creatinina, la urea, la inulina y el ácido para-amino hipúrico que siguen

trayectos diferentes en la nefrona, en función de sus pesos moleculares y su capacidad de unirse a proteínas plasmáticas.

En conjunto, a las técnicas empleadas para la valoración de la función renal se les da el nombre de Técnicas de Aclaramiento. Se entiende por *aclaramiento*, como el volumen de plasma que es completamente depurado de una sustancia por los riñones en la unidad de tiempo:

$$Cs = Us * V / Ps$$

Donde: Cs = aclaramiento de la sustancia “s”
 Us = concentración urinaria de la sustancia “s”
 V = volumen de orina
 Ps = concentración plasmática de la sustancia “s”

Estas técnicas miden la función excretora de los riñones, el flujo sanguíneo renal y las funciones básicas de la nefrona: filtración, secreción y absorción.

A) Depuración de inulina (In).

Se trata de un polisacárido formado por cadenas de fructosas (fructosano) presente de forma natural en raíces de diversos vegetales (Figura 2-4).

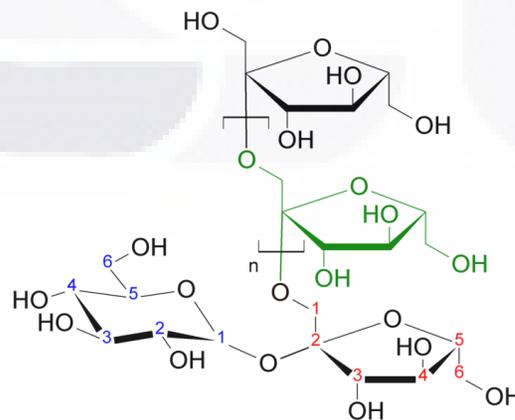


Figura 2-4. Estructura química de la Inulina.

La inulina no sufre degradación enzimática, por lo que se absorbe sin cambios en su estructura química. Una vez que la circulación sanguínea la conduce a las nefronas, se filtra libremente por los capilares glomerulares, casi en su totalidad. En la porción tubular, la inulina no es reabsorbida, por lo que es eliminada sin cambios en las mismas concentraciones con las que ingresó al organismo (Figura 2-5) (Hernando *et al*, 1997; Traynor *et al*, 2006). Por lo anterior, la depuración de inulina se utiliza ampliamente como indicador de la *filtración glomerular*.

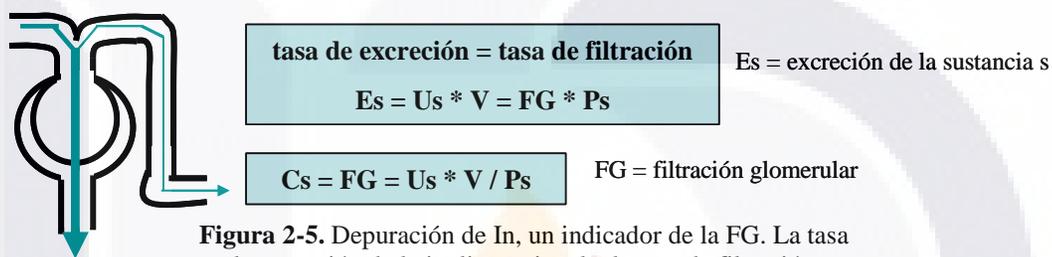


Figura 2-5. Depuración de In, un indicador de la FG. La tasa de excreción de la inulina es igual a la tasa de filtración.

B) Depuración de para aminohipurato o ácido para aminohipurico (PAH).

El ácido para aminohipurico es un polisacárido de bajo peso molecular presente en algunos vegetales y sobre todo en las algas verdes. Al igual que la inulina, no es metabolizado y llega a la nefrona sin sufrir cambios en su estructura (Figura 2-6).

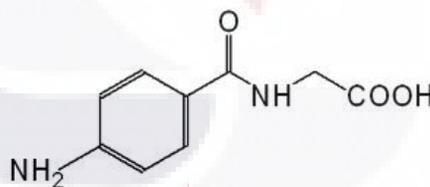


Figura 2-6. Estructura química de ácido para-aminohipurico.

En la nefrona, este compuesto se filtra en muy bajas cantidades pero alcanza la porción tubular principalmente mediante la secreción tubular y no regresa a la circulación. Se excreta en la orina prácticamente en las mismas concentraciones en las que fue administrado (90% de la cantidad inicial) (figura 2-7). Debido a que sigue el trayecto de las arteriolas aferente y eferente, de los capilares glomerulares y peritubulares, la depuración

de para-aminohipurato es de gran utilidad en la valoración del flujo sanguíneo renal (Pascal, 2004).



Figura 2-7. Depuración de PAH, un indicador del FPR. La tasa de excreción del para aminohipurato es igual a la tasa de secreción.

La secreción de PAH ocurre en el túbulo proximal de la nefrona. En ese sitio los transportadores de aniones orgánicos (OAT1, por sus siglas en inglés) localizados en la membrana basolateral de las células tubulares, intercambian el PAH, localizado en el intersticio, por α -cetoglutarato, proveniente del ciclo de Krebs, desde el interior de la célula. Una vez dentro de la célula, el PAH, se secreta hacia la luz tubular a través de la proteína transportadora MRP (proteína de resistencia múltiple a fármacos), localizada en la membrana luminal (Burckhardt *et al*, 2001). En la figura 2-8 se muestran los eventos más importantes en la secreción de aniones orgánicos, como el PAH.

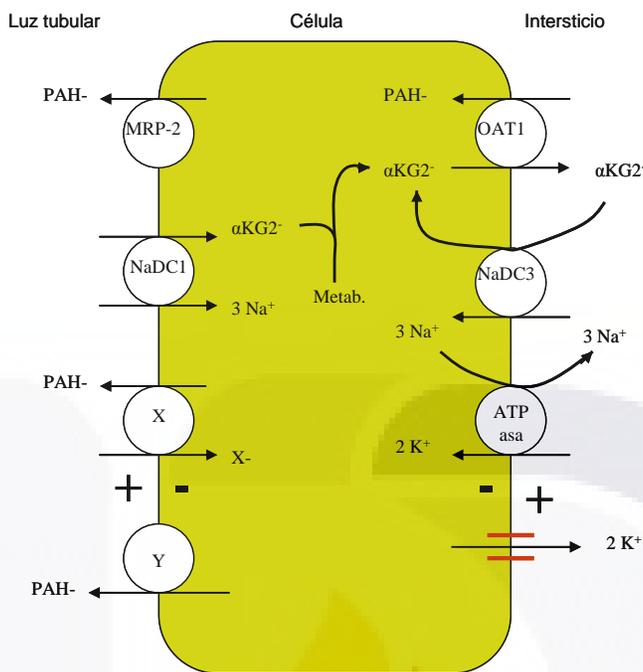


Figura 2-8. Secreción de PAH. El PAH alcanza la luz tubular gracias a las proteínas transportadoras OAT1 y MRP, localizadas en la membrana basolateral y luminal de células tubulares proximales. OAT intercambia α -cetoglutarato por PAH, mientras que MRP actúa como un canal iónico que conduce al anión hacia la luz tubular. Recientemente se han identificado otras proteínas transportadoras en la membrana luminal que favorecen la secreción de PAH (“x” y “y”), cuyos mecanismos aún no han sido descritos. (Tomado de Burckhardt, 2001).

Al transportador OAT1 son afines otros aniones orgánicos, entre ellos algunos diuréticos, eicosanoides, oligopéptidos, hormonas esteroideas, quinolinas, antibióticos β -lactámicos, entre otros. Es importante señalar que la secreción de aniones orgánicos como el PAH, se realiza con mayor eficacia si el compuesto presente en la circulación se encuentra unido a las proteínas plasmáticas, esto facilita el reconocimiento del anión orgánico por la proteína transportadora de la membrana basolateral (Burckhardt *et al*, 2001).

C) Fracción de filtración.

La relación entre las depuraciones de In y PAH es indicativa de la fracción de filtración glomerular (FF), que es la fracción de plasma que es filtrada a través del glomérulo.

$$FF = FG / FPR$$

$$FF = C\text{-In} / C\text{-PAH}$$

La FF puede aumentar o disminuir en función de la vasoconstricción o vasodilatación de las arteriolas aferente y eferente. Este mecanismo forma parte de los procesos compensatorios que tienen la finalidad de asegurar una tasa de filtración adecuada y con ello el aporte de líquido a la porción tubular, cuando ocurren cambios importantes en la presión sistémica que comprometan el aporte sanguíneo a las células renales (Hernando *et al*, 1997). Con relación a lo anterior, el sistema de retroalimentación tubuloglomerular ejerce una función muy importante en la regulación de la FF por vasodilatación de la arteriola aferente y vasoconstricción de la eferente (Figura 2-9).

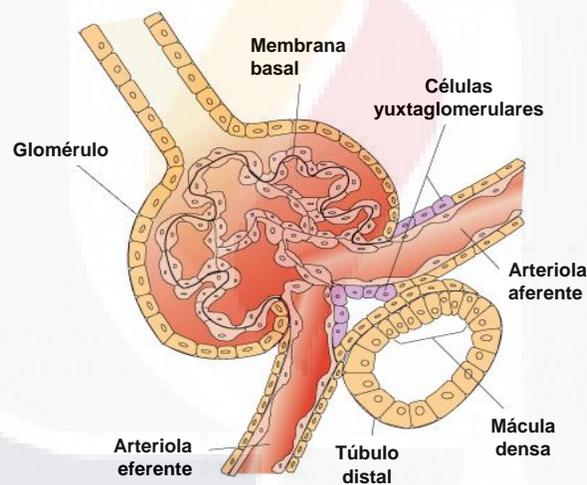


Figura 2-9. Sistema de retroalimentación tubuloglomerular. Las células de la mácula densa, en la primera porción del túbulo distal, son sensoras de las concentraciones de sodio. Cuando existe una disminución de la FF (por disminución del FPR y FG), las cantidades de líquido tubular y de sodio también disminuyen, lo que activa la secreción de renina y angiotensina II por las células de la mácula densa. La secreción de estos compuestos provoca vasoconstricción de la arteriola eferente, mientras que la arteriola aferente presenta vasodilatación. De esta forma, la FF aumenta y la FG se mantiene normal, asegurando el aporte de sodio a la porción tubular.

2.4. Estrés oxidativo

2.4.1. Aspectos generales.

Los *radicales libres* son especies químicas con uno o más electrones desapareados, lo que ocasiona su alta reactividad. 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 y los lípidos. 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). Entre los compuestos antioxidantes, se encuentran los siguientes agentes reductores: NADPH, glutatión, proteínas tiol, vitamina C y E. Cabe señalar que, 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). La causa primaria del estrés oxidativo es la producción de especies reactivas de oxígeno y las estructuras quinoideas.

Como consecuencia de la pérdida del equilibrio antes mencionado, el proceso oxidativo induce daño en moléculas que constituyen estructuras celulares (lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y proteínas), lo que trae como consecuencia una serie de efectos deletéreos para las células.

2.4.2. Especies reactivas de oxígeno (ERO).

Durante el metabolismo celular, los organismos aeróbicos producen radicales libres, como en la fosforilación oxidativa, en la cual se forman sustancias potencialmente tóxicas para las células (radicales libres de oxígeno) que son transformadas en sustancias inocuas por el sistema enzimático mitocondrial de la oxidasa de citocromo, en colaboración con las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa. En la producción de radicales libres participan diversas enzimas solubles y algunas unidas a las membranas (Turrens *et al*, 1982). En la tabla 2-2 y en la figura 2-10 se esquematiza la formación de radicales superóxido e hidroxilo.

Tabla 2-2. Generación de radicales superóxido e hidroxilo.

REACCIÓN	RADICAL	OBSERVACIONES
$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$ $O_2^{\bullet -} + e^- + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2$	<i>Superóxido</i>	Producido durante la fosforilación oxidativa por la acción de la superóxido dismutasa.
$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2O + OH^{\bullet}$ $OH^{\bullet} + e^- + H^+ \rightarrow H_2O$	Hidroxilo	Es un agente nocivo que puede reaccionar a velocidad alta con muchos compuestos celulares (fosfolípidos, ácidos nucleicos, proteínas, etc.) generando radicales libres de las moléculas con las que reacciona.
<u>Reacción general:</u>		
$2 O_2 + 4 e^- + 4 H^+ \rightarrow 2 H_2O_2$		

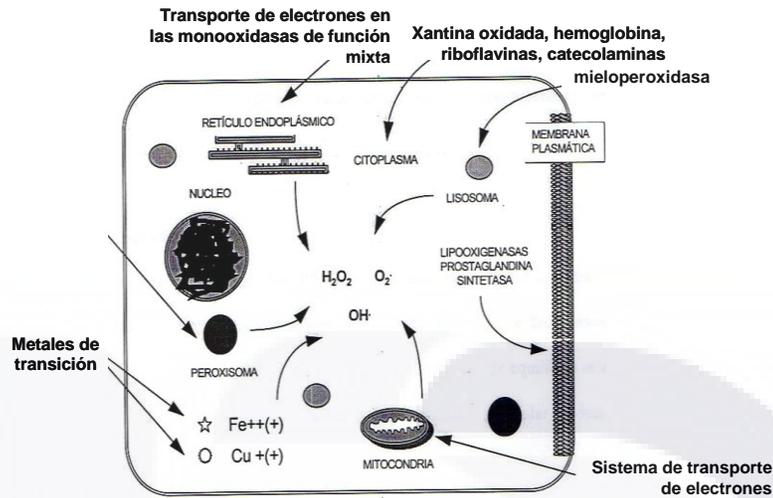
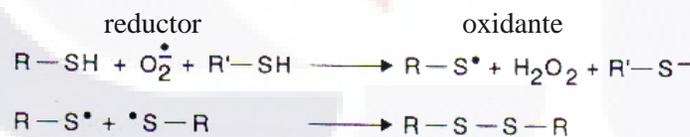


Figura 2-10. Principales fuentes de radicales libres en la célula aeróbica. En la producción de estos radicales participan diversas enzimas solubles unidas a membranas (Tomado de Repetto, 1981).

Los intermediarios reactivos de oxígeno mejor conocidos son el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo.

El radical superóxido se forma cuando un electrón es tomado por uno de los orbitales π^*2p del oxígeno molecular. El radical superóxido puede interactuar directamente con los grupos tiol:



El anión superóxido puede también dismutar y formar peróxido de hidrógeno.

La formación de peróxido de hidrógeno (Figura 2-11) conduce a la utilización de agentes reductores equivalente como respuesta de la detoxificación por la peroxidasa de glutatión. Si la capacidad protectora de la superóxido dismutasa y catalasa es insuficiente, pueden formarse radicales hidroxilo y oxígeno.

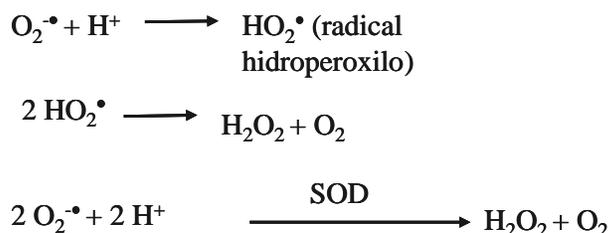


Figura 2-11. Reacciones generadoras de peróxido de hidrógeno.

El radical hidroxilo (OH^{\bullet}) es uno de los oxidantes más reactivos que existen. Reacciona inmediatamente con cualquier sustancia biológica disponible. Este radical puede ser producido vía reacción Haber-Weiss, una reacción entre el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, catalizada por iones metálicos (Figura 2-12):

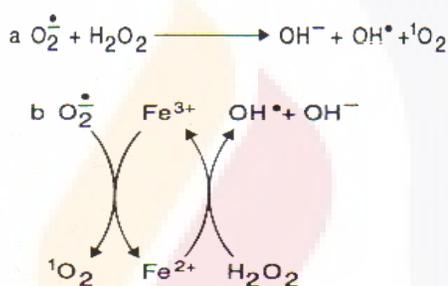


Figura 2-12. a: Reacción Haber-Weiss; b: Acción catalítica de iones metálicos en esta reacción (Tomado de Niesink *et al*, 1996).

2.4.3. 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 biotoxicación 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 a través de la orina.

La participación de radicales libres en el desarrollo de efectos tóxicos ha sido ampliamente estudiada, tal es el caso de la inducción de necrosis hepática por metanos halogenados, como el cloroformo (CHCl_3) y el tetracloruro de carbono (CCl_4). En efecto, como antes se señaló, la biotransformación del CCl_4 genera dos metabolitos altamente reactivos: el radical triclorometilo ($\text{Cl}_3\text{C}\cdot$) y el radical peroxitriclorometilo ($\text{Cl}_3\text{COO}\cdot$). En la figura 2-13 se esquematiza el daño celular producido por los radicales libres derivados de la biotransformación del CCl_4 . Es pertinente señalar que este mismo mecanismo provoca nefrotoxicidad, afectando principalmente a las células del túbulo proximal.

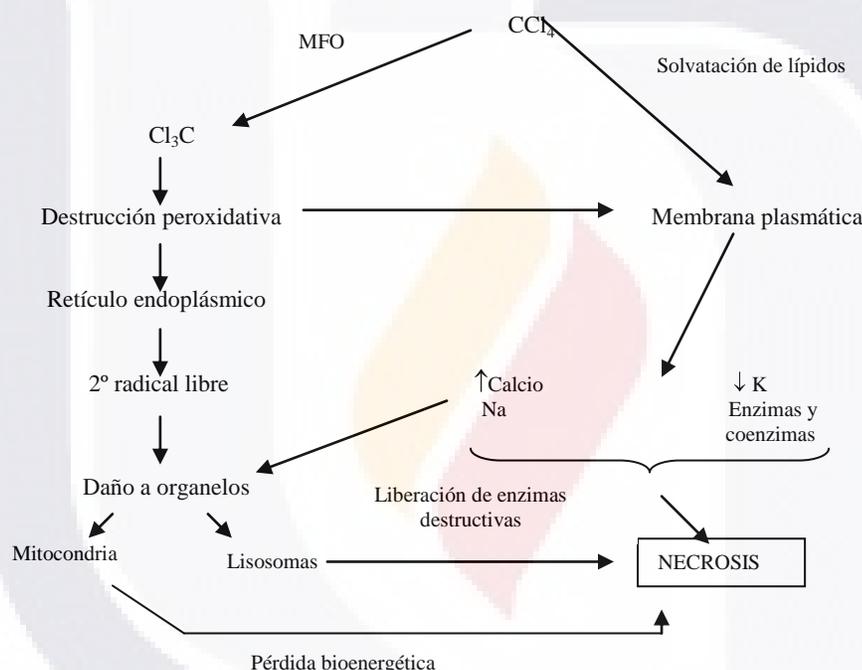


Figura 2-13. Necrosis celular inducida por el CCl_4 . Las membranas plasmáticas y de otros organelos son alteradas por los radicales derivados de este compuesto, lo que resulta en la pérdida celular de potasio, enzimas y coenzimas y la ganancia de calcio y sodio intracelular. Esta serie de eventos conducen a la muerte celular. MFO = Monooxigenasas de función mixta (Tomado de Plaa, 1995).

Los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas biológicas son particularmente susceptibles al ataque por radicales libres. El proceso de lipoperoxidación inicia cuando cualquier especie de radical, como el triclorometilo o peroxitriclorometilo, con suficiente reactividad para desprender un átomo de hidrógeno de un grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), deja un electrón desapareado en el átomo de carbono $-\text{C}\cdot\text{H}-$. El resto de los eventos que conllevan a la formación de hidroperóxidos de lípidos se ilustran en la figura 2-14. Los

hidroperóxidos puros son moléculas relativamente estables bajo condiciones fisiológicas, pero la presencia de metales de transición (Fe^{2+} , Cu^{2+}) y de complejos metálicos (hemo libre, hemoproteínas), catalizan su descomposición a hidrocarburos alquílicos y, especialmente, a compuestos carbonílicos como aldehídos (ejemplo, 4-hidroxi-2,3-trans-nonenal, malondialdehído). A su vez, los aldehídos pueden reaccionar con los grupos sulfhidrido (-SH) de las proteínas o con grupos amino para formar entrecruzamientos intra e intermoleculares, provocando alteraciones y daños en las macromoléculas.

La lipoperoxidación provoca disminución de la fluidez membranal, con incremento en la permeabilidad iónica, e inactivación de enzimas unidas a la mambrana (ATP asa de Na^+/K^+ , ATPasa de Ca^{++} , etc.). Finalmente, la fragmentación continua de las cadenas laterales de los ácidos grasos lleva eventualmente a la pérdida completa de la integridad de la membrana y, cuando esto ocurre, los lisosomas liberan su contenido hidrolítico causando la muerte celular.

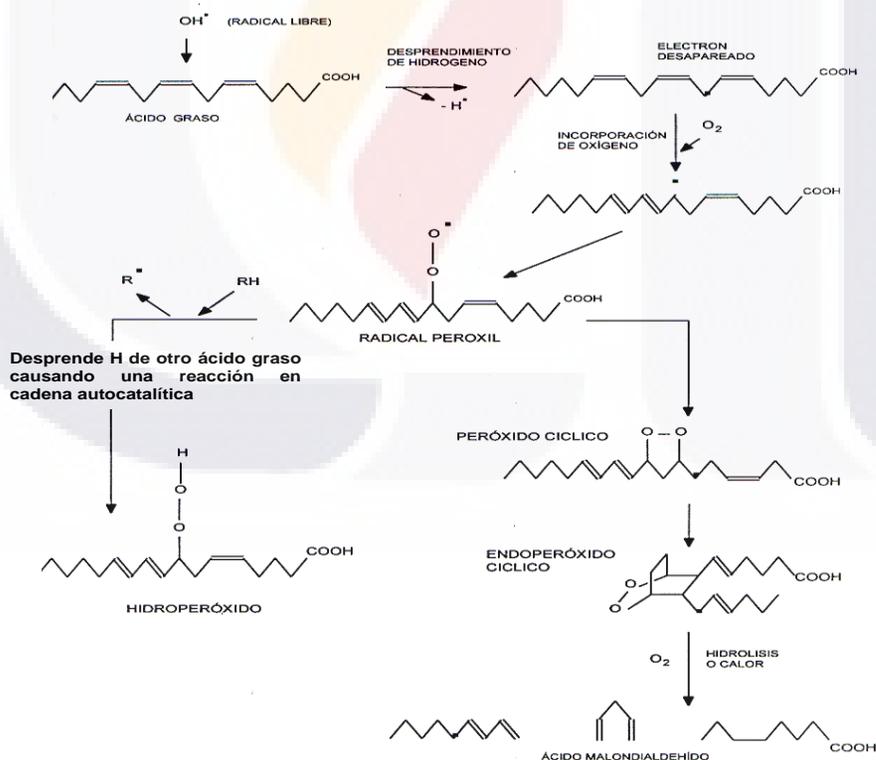


Figura 2-14. Reacciones de iniciación y propagación de la lipoperoxidación (Tomado de Repetto, 1981).

2.4.4. Mecanismos antioxidantes (GSH).

Como ya se señaló, para neutralizar a los radicales libres y evitar el daño celular, 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 *et al*, 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 destoxificación 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). 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. 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).

La síntesis del GSH es catalizada secuencialmente por dos enzimas citosólicas: la γ -glutamilcisteína 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 el 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. En esas reacciones el GSH es oxidado a GSSG, el cual es reducido a GSH por la reductasa de glutatión dependiente de NADPH. La peroxidasa de glutatión (enzima que contiene selenio) cataliza la reducción del H_2O_2 y de otros peróxidos (Figura 2-15).

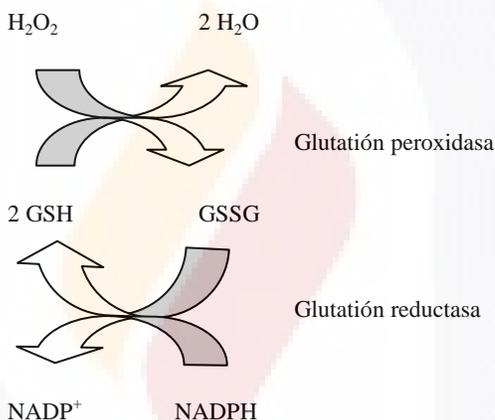


Figura 2-15. Ciclo redox y homeostasis del glutatión (Tomado de Niesink, de Vries y Hollinger, 1996).

Las concentraciones de GSH se encuentran notablemente reducidas en situaciones de desnutrición, estrés oxidativo y diversas condiciones patológicas (Lu 2000; Griffith, 1999). La razón de las $[\text{GSH}]:[\text{GSSG}]$ es usada como indicador del estado redox de las células y determina su capacidad antioxidante. La reducción de un 20-30 % del GSH intracelular produce una marcada incapacidad de las células para amortiguar las acciones de los compuestos tóxicos (Reed, 1990).

2.5. *Ginkgo biloba*

2.5.1. Usos y efectos titulares.

El uso de la Medicina Alternativa o Complementaria ha aumentado en años recientes. Este tipo de terapia médica incluye el consumo de vitaminas, suplementos alimenticios, extractos vegetales, etc., que mejoran la calidad de vida, potencian el rendimiento deportivo, estimulan la inmunidad y la memoria, entre otros beneficios (Neldner, 2000).

En este contexto, desde hace aproximadamente 5000 años, los frutos y semillas del árbol *Ginkgo biloba* (Gb) han sido utilizados en la Medicina China Tradicional para el tratamiento contra el asma, la enuresis y la tos. Más tarde, las hojas del *Ginkgo biloba* fueron usadas para el tratamiento de infecciones de la piel (Zimmerman *et al*, 2002).

La primera publicación sobre el uso de hojas del árbol Gb para propósitos médicos, data del año 1505 A. C. y se hizo en un texto de Liu Wen-Tai (DeFeudis y Drieu, 2000). Sin embargo, a partir de 1990 el extracto de hojas de este árbol (EGb) fue ampliamente conocido y consumido, una vez descubiertas sus capacidades potenciadoras de la memoria.

El Gb es una planta vascular perteneciente a la familia *Ginkgoaceae*. El árbol 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 el continente Asiático es comúnmente llamado “árbol hoja de pata de pato” por la forma de sus hojas (Figura 2-16).



Figura 2-16. Árbol de *Ginkgo biloba*, a la derecha en la parte superior, el fruto y en la inferior las hojas del árbol (hoja pata de pato). Esta planta ha sido ampliamente utilizada con fines ornamentales y medicinales sobretodo en el medio oriente. Actualmente el extracto de hojas de ginkgo (EGb 761) es conocido por sus capacidades potenciadoras de la memoria así como su capacidad antioxidante, entre otras propiedades medicinales (Tomado de Smith y Luo, 2004).

Las compañías farmacéuticas Beaufour-Ipsen Pharma (París, Francia) y Dr. Willmar Schwabe (Karlsruhe, 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, disminuyendo de este modo, los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) e inhibiendo la lipoperoxidación de membranas celulares (Smith y Luo 2003), 2) estimulación del factor relajante derivado de endotelio, lo cual, junto con el efecto anterior, resulta en el mejoramiento de la circulación sanguínea en venas, arterias y capilares, 3) el componente bilobalide incrementa la respiración mitocondrial protegiendo contra el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, incrementando, por lo tanto, las concentraciones de ATP, 4) atenuación de la apoptosis en cultivos celulares y 5) inhibición de la agregación A β amiloide en células de neuroblastoma, lo cual tiene gran importancia en la mejoría de las funciones cognitivas en pacientes con Alzheimer.

2.5.2. 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 ser humano (Pietri *et al*, 1997). Las dos fracciones principales del extracto de *Ginkgo biloba*, terpenos y flavonoides, tienen propiedades diferentes, lo que le confiere una acción farmacológica polivalente (Figura 2-17). 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, reducen la activación y la agregación de plaquetas, con lo que 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).

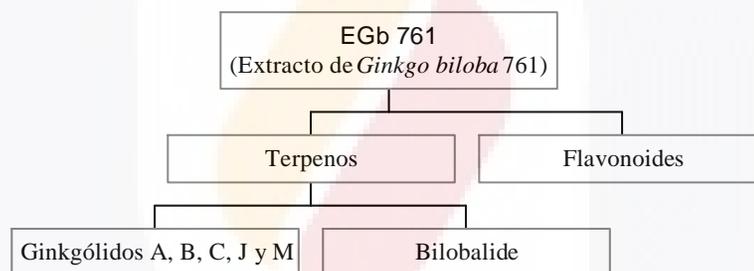
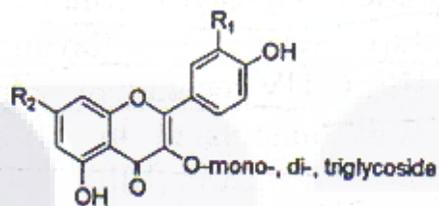


Figura 2-17. Componentes del extracto de las hojas del *Ginkgo biloba*. La fracción flavonoide ejerce el efecto antioxidante, mientras que la fracción de terpenos ayuda a mejorar la circulación sanguínea (Tomado de Smith y Luo, 2004).

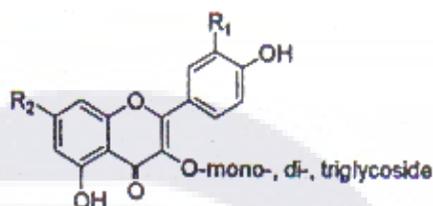
Los flavonoides son compuestos derivados del fenilcromo. Pertenecen a un grupo de compuestos ampliamente distribuidos en las plantas vasculares (*Ginkgo biloba*). El grupo catecol de los flavonoides, en el anillo A confiere alta estabilidad sobre radicales aroxilo. La deslocalización de los electrones 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, 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 sobre metales de transición prooxidantes (Fe^{+2}), inhibiendo, de esta manera, la formación de nuevos radicales hidroxilo (Gohil y Packer, 2002).

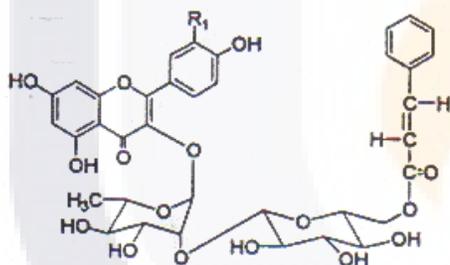
A continuación se muestran las estructuras químicas de los glucósidos flavonoides obtenidos del *Ginkgo biloba*:



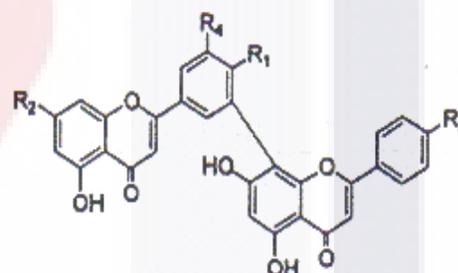
R1	
H	Canferol
OH	Quercetina
OCH ₃	Isorhamnetina



R1	R2	
H	O-glc	Derivados de apigemina
0-glc	OH	Derivados de Luteolina



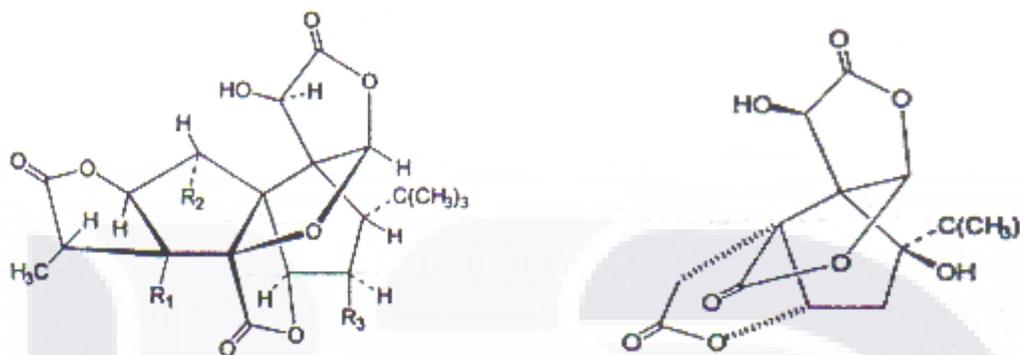
R1	
H	Derivados de Canferol
OH	Derivados de Quercetina
R2	H o glucosa



R1	R2	R3	R4	
H	H	H	H	Amentoflavon
OCH3	OH	OH	H	Bilobetina
OCH3	OCH3	OH	H	Ginkgetina
OCH3	OH	OCH3	H	Isoginkgetina
OCH3	OCH3	OCH3	H	Scaiadopitisina
OCH3	OH	OH	OCH3	5'-metoxibilobetina

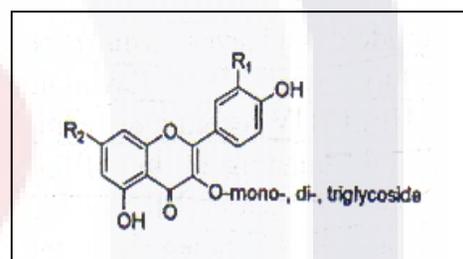
Esencialmente, se trata de flavonoles-*O*-glucósidos, con un enlace glucosídico localizado, por lo general, en posición 3 ó 7 de un anillo aglicón (Quercetina, Canferol o Isorhamnetina), el carbohidrato por lo general es una D-glucosa, L-ramnosa o glucoramnosa (DeFeudis y Drieu 2000).

Las estructuras químicas que se muestran a continuación, corresponden a las terpenilactonas (ginkgólidos y bilobálide) de *Ginkgo biloba*:



R1	R2	R3	Ginkgólidos
OH	H	H	A
OH	OH	H	B
OH	OH	OH	C
OH	H	OH	J
H	OH	OH	M

Compuesto bilobalide



La estructura química de las trilactonas terpenos presentes en las hojas del Gb, son únicas de éste árbol (DeFeudis y Drieu, 2000).

2.5.3. Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de un compuesto se basa en dos principios generales: su alta reactividad con radicales de diferente origen y su elevada estabilidad. Con relación a lo anterior, los flavonoides son potentes agentes antioxidantes, a través de la captación de radicales libres de oxígeno, la quelación de iones metálicos y su efecto preventivo de la lipoperoxidación al interactuar con la fracción hidrofóbica de los fosfolípidos membranales.

Los flavonoides polifenólicos, como los presentes en el extracto de Gb, 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).

Como se ha mencionado con anterioridad, las especies reactivas de oxígeno y los radicales libres derivados de la bioactivación de diversos agentes tóxicos, son fuente importante de daño celular que se ve traducido en la generación de diversas patologías e incluso se les ha relacionado con el proceso de envejecimiento. Por fortuna, existen agentes antioxidantes naturales en el organismo, sin embargo, esos compuestos protectores pueden disminuir a causa del estrés oxidativo, cuando la generación de agentes prooxidantes supera la capacidad antioxidante de los compuestos endógenos. Por ello, en la actualidad, existen numerosas investigaciones enfocadas al estudio del efecto de distintos antioxidantes, sobre el daño producido por las especies reactivas de oxígeno y los radicales libres. En este sentido, los flavonoides del *Ginkgo biloba* tienen la capacidad de actuar como atrapadores de agentes prooxidantes. 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).

Debido a sus múltiples beneficios sobre el organismo, especialmente su capacidad antioxidante, los componentes presentes en el extracto del Gb, sobretodo la quercetina, representan una fuente protectora antioxidante incluso más potente que la vitamina E.

3. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Básica (estudio exploratorio).

4. JUSTIFICACIÓN

La exposición ambiental u ocupacional a solventes orgánicos produce problemas de salud a los seres humanos. Al respecto, la exposición a CCl_4 daña a los riñones. Dado que estos órganos participan de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal, cuando son afectados por los xenobióticos aparecen alteraciones fisiopatológicas graves, como la falla renal. Esto frecuentemente, conduce a la muerte de los seres humanos o les genera una calidad de vida muy baja. Por ello, consideramos importante investigar la capacidad de los antioxidantes presentes en el extracto de las hojas del *Ginkgo biloba* para prevenir o disminuir la magnitud de las alteraciones fisiológicas, moleculares y estructurales producidas por el CCl_4 .

5. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES.

a) General.

Analizar el posible efecto protector del *Ginkgo biloba* (Gb) sobre el daño renal producido por la intoxicación aguda y crónica con CCl_4 , en animales de experimentación.

b) Específicos.

* En ratas Wistar machos adultos valorar:

1) Los efectos *preventivos* y *correctivos* del Gb sobre el daño renal producido por la intoxicación aguda con CCl_4 , mediante el análisis de:

2.1 La hemodinámica y el manejo renal de sodio y agua.

2.2 El daño funcional y bioquímico de células tubulares proximales.

2.3 La participación de los riñones en la homeostasis ácido/base de los líquidos corporales.

NOTA: Las determinaciones anteriores fueron hechas administrando el extracto del Gb antes del tratamiento con CCl₄ (efecto preventivo) y después del tratamiento con CCl₄ (efecto correctivo).

2) Los efectos *preventivos* y *correctivos* del Gb sobre el daño renal y hepático producido por la intoxicación crónica con CCl₄, mediante el análisis de la expresión génica a nivel de transcripción de citocinas proinflamatorias y profibróticas (TNF- α e IL-6).

6. HIPÓTESIS.

La administración de *Ginkgo biloba* a los animales de experimentación previene o disminuye la magnitud de las acciones tóxicas producidas por el CCl₄ en los riñones y en el hígado.

7. METODOLOGÍA.

7.1. Materiales y métodos.

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes y en el Laboratorio de Genética de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Es un estudio experimental con diseño estadístico completamente aleatorizado. Los animales de experimentación tuvieron acceso al alimento y al agua *ad libitum* durante los respectivos tratamientos.

7.2. Grupos experimentales.

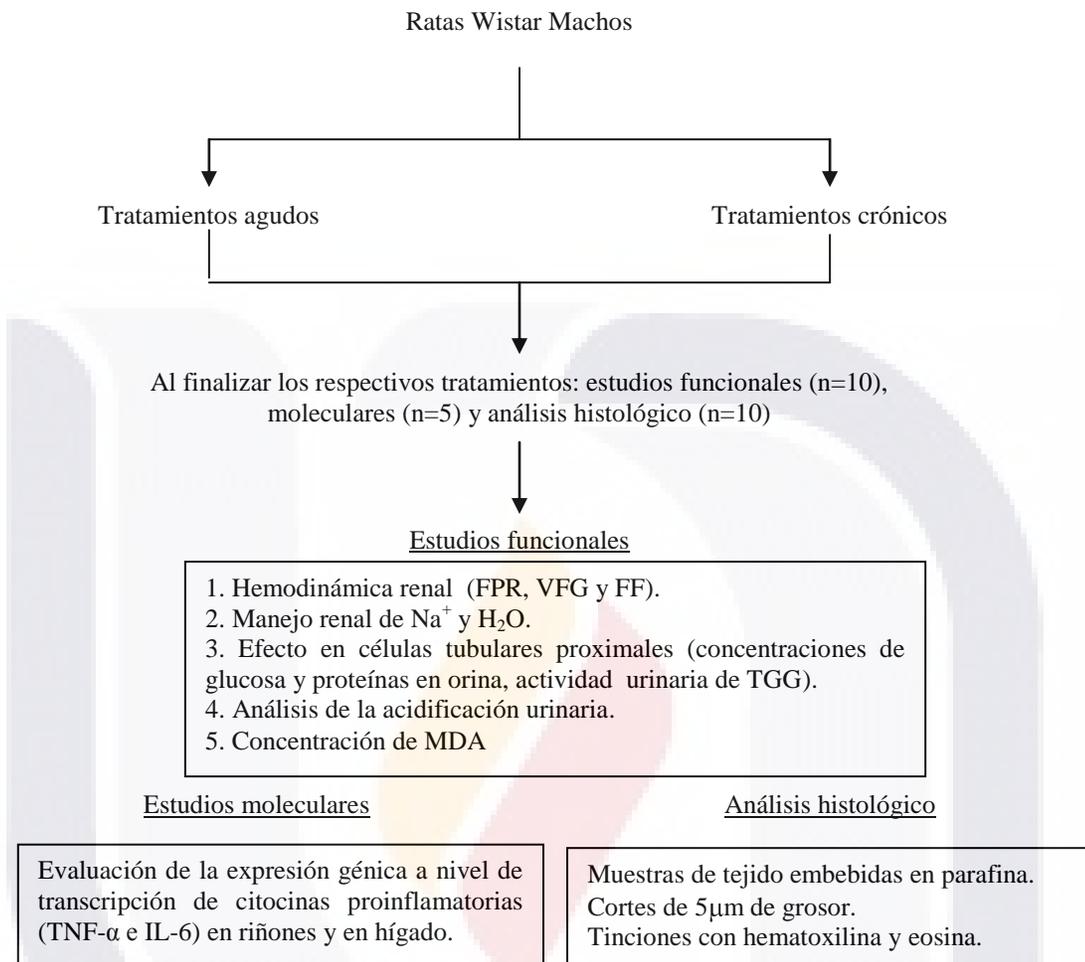
Los estudios fueron realizados en ratas Wistar machos que fueron divididos en los siguientes grupos experimentales:

Grupo	Tratamiento agudo (250 g de peso promedio)
Control	0.40 ml de aceite de maíz/rata, vo
Tratado con CCl ₄	0.40 ml de CCl ₄ al 50%/rata/dosis única, vo
Tratado con Gb+CCl ₄ (preventivo)	4 mg de Gb/kg/día/5 días/ip, al sexto día 0.40 ml de CCl ₄ al 50%/rata/vo
Tratado con CCl ₄ +Gb (correctivo)	0.40 ml de CCl ₄ al 50%/rata/vo, al día siguiente 4 mg de Gb/kg/día/5 días/ip
Tratado con Gb	4 mg de Gb/kg/5 días/ip
Grupo	Tratamiento crónico (90g de peso promedio)
Control	0.2 ml de aceite de maíz/rata 3 veces semana/ 8 semanas, ip
CCl ₄	0.2 ml de CCl ₄ del 13-25%/ 3 veces semana/ 8 semanas, ip Semana 1: CCl ₄ al 13% Semana 2: CCl ₄ al 16% Semana 3: CCl ₄ al 20% Semana 4 a 8: CCl ₄ al 25%
Gb+CCl ₄	0.2 ml de CCl ₄ del 13-25%/ 3 veces semana/ 8 semanas, ip + 4 mg de Gb de la solución farmacéutica
Gb	4 mg de Gb de la solución. farmacéutica

Se empleó aceite de maíz para las diluciones del CCl₄.

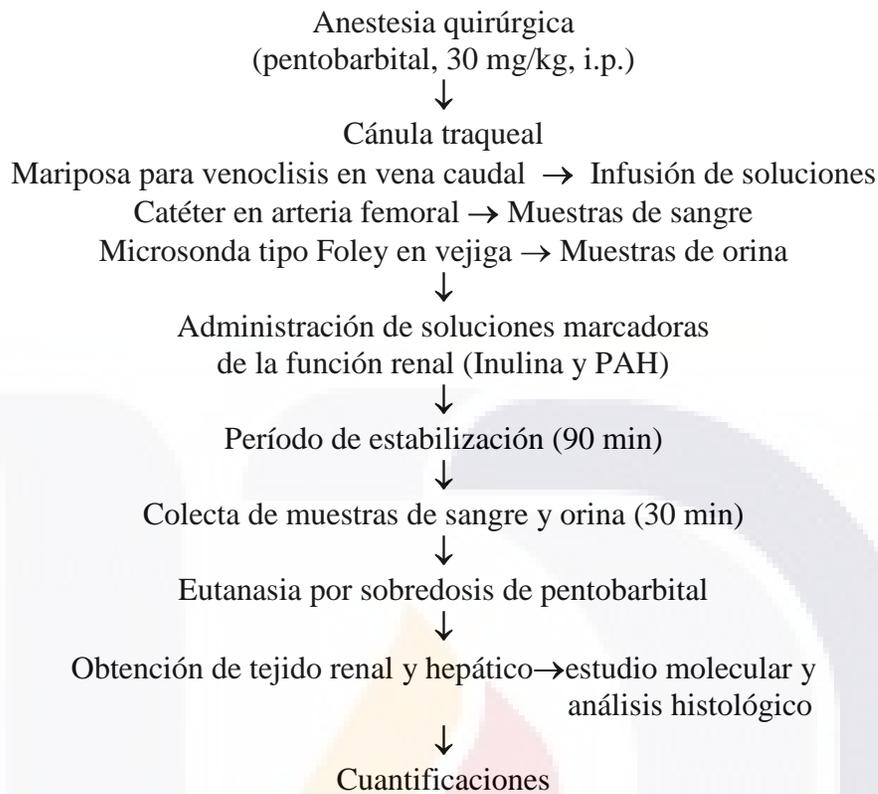
Solución farmacéutica de Gb: Vasodil en gotas

7.3. Diagrama experimental.



Estudio funcional.

Para evaluar el funcionamiento de los riñones de los animales de experimentación, se realizó una cirugía que constó de los siguientes pasos:



Estudio molecular.

Se realizó por el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) semicuantitativa a partir de ARN total, el cual se aisló de los tejidos renal (corteza) y hepático obtenidos de los grupos controles y experimentales: 100 mg de tejido se homogenizaron en 1mL de reactivo Tri-Reagent (trizol) y se aisló el ARN total (siguiendo la recomendación del fabricante del reactivo). La concentración de ARN se cuantificó por absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-70, utilizando como referencia el valor de $1A=40 \mu\text{g}$ de ARN total.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400. Se utilizó el kit de reactivos Super-Script RT-PCR. El volumen de la reacción fue de 50 μl , utilizando por reacción 1 μg de ARN total. Se utilizaron iniciadores y programas de amplificación reportados en la literatura. La expresión del gen constitutivo GAPDH se utilizó para normalización. Los productos de amplificación

se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se cuantificaron con el software Kodak Image I.

Análisis histológico.

Las muestras de tejido renal y hepático fueron fijadas en formaldehído y colocadas en histoquinet (Leyca) para su procesamiento. Posteriormente los tejidos fueron colocados en bomba de infusión y luego se hicieron bloques de parafina en el centro de inclusión (Leyca). Los cortes histológicos (5 μm de grosos) fueron hechos en histoquinet (Leyca). Se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina. El análisis de los tejidos se realizó en microscopio óptico y se tomaron fotografías. Para confirmar el análisis visual de los tejidos renales, se realizó un conteo de células y túbulos sanos y dañados, por campo.

Parámetros cuantificados.

PARÁMETRO	JUSTIFICACIÓN	REFERENCIA
1) Concentraciones plasmáticas y urinarias de inulina (C-In)	Prueba útil para valorar la velocidad de filtración glomerular	Föer <i>et al</i> , 1955 He <i>et al</i> , 2006
2) Concentraciones plasmáticas y urinarias de PAH (C-PAH)	Prueba útil para valorar el flujo plasmático renal	Arendhorst <i>et al</i> , 1975 He <i>et al</i> , 2006
3) Volumen urinario	Marcador de la función renal	Método volumétrico
4) Concentraciones plasmáticas y urinarias de sodio (C- Na^+ y EFNa^+)	Valoración del manejo renal de electrolitos (Na^+)	Método flamométrico
5) Gasometrías en sangre y orina. Determinaciones de: pH, pCO_2 , pO_2 y $-\text{HCO}_3$	Participación de los riñones en el equilibrio ácido-base de los líquidos corporales	Método gasométrico
6) Acidez titulable	Análisis del proceso de acidificación urinaria	Micrométodo volumétrico Jaramillo <i>et al</i> , 1990
7) Concentraciones plasmáticas y urinarias de glucosa (C-Glucosa)	Marcador de la función de células tubulares proximales	Trinder, 1969
8) Actividad de la TGG en corteza renal	Marcador de daño de células tubulares proximales	Orlowski y Meister, 1963
9) Concentraciones de ARN mensajero de $\text{TNF-}\alpha$, e IL-6	Marcador de inflamación	Navarro <i>et al</i> , 2005; Pribylova <i>et al</i> , 2006.

7.4. Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos fueron analizados bajo un diseño aleatorizado, con pruebas de ANOVA y de Tukey-Kramer.



8. RESULTADOS

TRATAMIENTO AGUDO

I. Estudios funcionales.

A) Manejo renal de sodio y agua

En lo referente a la excreción fraccionaria de sodio y al flujo urinario, con respecto a los valores de los controles, no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales de los tratamientos preventivo y terapéutico. Sin embargo, en el tratamiento preventivo (Gb+CCl₄) puede observarse una tendencia de aumento de excreción urinaria de sodio (Figuras 8-1 y 8-2).

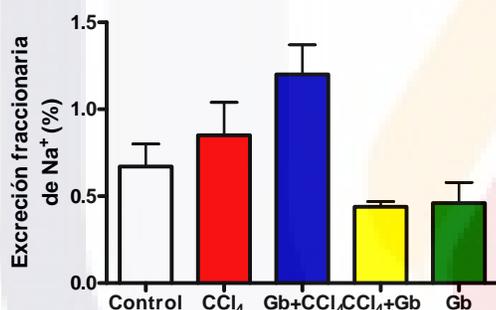


Figura 8-1. Excreción fraccionaria de sodio en ratas expuestas al CCl₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl₄) y terapéutica (CCl₄+Gb).

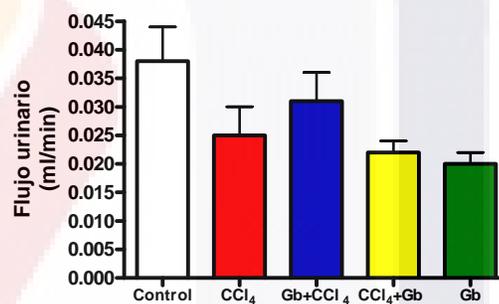


Figura 8-2. Flujo urinario en ratas expuestas al CCl₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl₄) y terapéutica (CCl₄+Gb).

B) Efecto en las células tubulares proximales

Como se muestra en la figura 8-3, con respecto a los valores del grupo control, la concentración de glucosa en orina aumentó de forma no significativa en los grupos tratados con CCl₄ o CCl₄+Gb (48% y 47%, respectivamente), mientras que el grupo que recibió Gb de manera preventiva presentó valores similares a los del grupo control y a los animales tratados solamente con Gb.

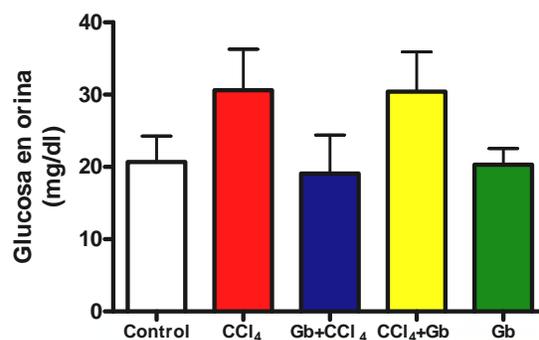


Figura 8-3. Concentración de glucosa en orina de ratas expuestas al CCl₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl₄) y terapéutica (CCl₄+Gb).

Con relación al grupo control, los valores medios de la concentración de proteínas en la orina de las ratas tratadas con CCl₄ y CCl₄+Gb mostraron un incremento estadísticamente significativo del 759% y 569%, respectivamente, mientras que los animales que recibieron Gb+CCl₄ presentaron valores similares a los de los grupos control y tratados con Gb (Figura 8-4).

Por otra parte, respecto al control: a) la actividad urinaria de la enzima TGG se incrementó significativamente en el grupo tratado con CCl₄ (2,900%), b) en el tratamiento preventivo (Gb+ CCl₄) la actividad de la enzima no se detectó, c) en el tratamiento terapéutico (CCl₄+Gb) la actividad de la TGG aumentó de manera significativa (2400%) y d) en el grupo tratado solamente con Gb no hubo cambios significativos en la actividad urinaria de la TGG (Figura 8-5).

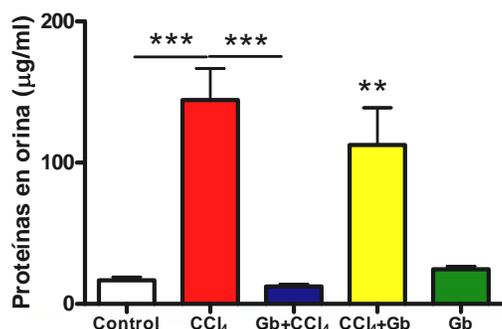


Figura 8-4. Concentración de proteínas en orina de ratas expuestas al CCl₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl₄) y terapéutica (CCl₄+Gb). (**p<0.01 y ***p<0.001).

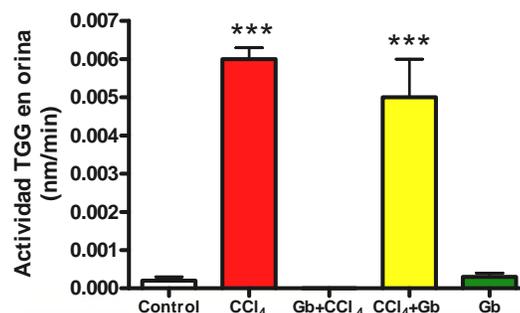


Figura 8-5. Actividad de la TGG en orina de ratas expuestas a Gb (4 mg/kg/día/5 días) y CCl₄ (0.40 ml/rata/vo/dosis única). El CCl₄ fue administrado al concluir el tratamiento con Gb. (**p<0.001).

C) Acidificación urinarias.

Como muestra la figura 8-6, no hubo diferencias significativas en la acidez titulable de la orina entre los grupos experimentales, con relación a los valores controles.

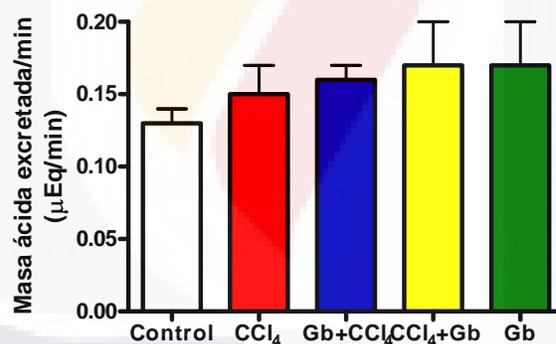


Figura 8-6. Masa ácida excretada en orina de ratas expuestas al CCl₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl₄) y terapéutica (CCl₄+Gb).

D) Hemodinámica renal.

La velocidad de filtración glomerular (C-In) no mostró cambios significativos entre los grupos experimentales estudiados (Figura 7). Asimismo, con respecto al grupo control, el flujo sanguíneo renal (C-PAH) disminuyó en el grupo tratado con CCl₄ (45%) y aumentó

en los grupos tratados con CCl_4 +Gb y Gb (10% y 30%, respectivamente), aunque estos cambios no presentaron significancia estadística (Figura 8-7).

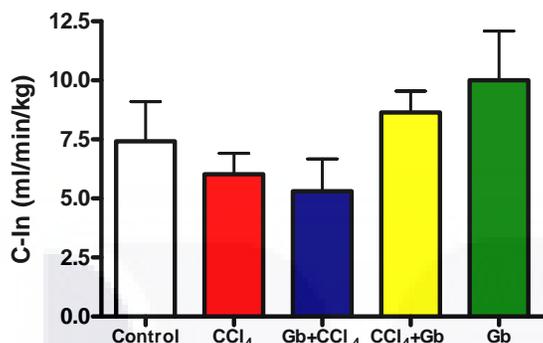


Figura 8-7. Depuración de inulina (C-In) en ratas expuestas al CCl_4 (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+ CCl_4) y terapéutica (CCl_4 +Gb).

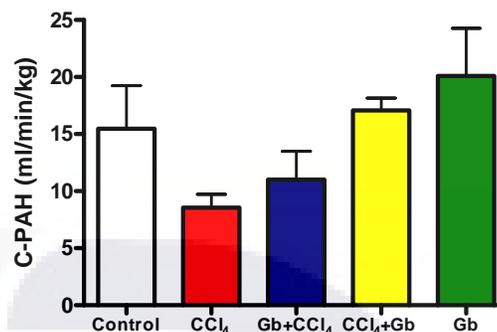


Figura 8-8. Depuración de ácido para-aminohipúrico (C-PAH, ml/min/kg) en ratas expuestas al CCl_4 (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+ CCl_4) y terapéutica (CCl_4 +Gb).

De los parámetros anteriores se deriva la fracción de filtración, la cual tampoco mostró cambios significativos entre los grupos experimentales estudiados (Figura 8-9).

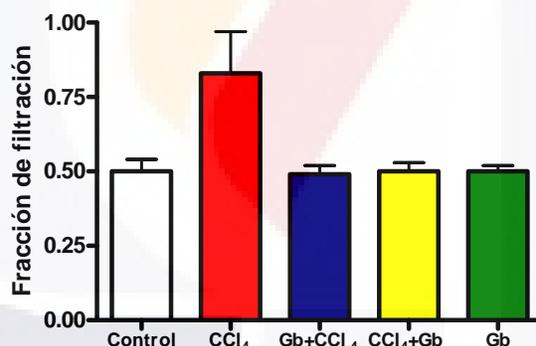


Figura 8-9. Fracción de filtración en ratas expuestas al CCl_4 (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+ CCl_4) y terapéutica (CCl_4 +Gb).

E) Estrés oxidativo

Con relación al grupo control, la concentración de MDA en la corteza renal aumentó significativamente en el grupo tratado con CCl_4 (279%) y en el grupo que recibió Gb de forma terapéutica (CCl_4 +Gb, 185%). Se debe subrayar que las ratas tratadas con Gb+ CCl_4 y solamente con Gb mostraron valores semejantes a los de las ratas controles.

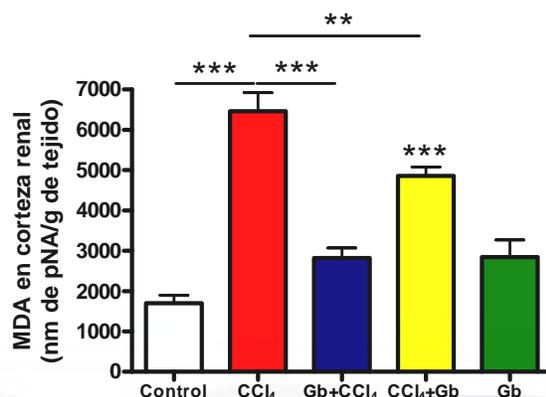


Figura 8-10. Concentración de malondialdehído (MDA) en homogeneizado de corteza renal de ratas expuestas a Gb (4 mg/kg/día/5 días) y CCl₄ (0.40 ml/rata/vo/ expuestas al CCl₄ (0.40 ml/rata/dosis única, oral) y al Gb (4 mg/kg/día/5 días) administrado de manera preventiva (Gb+CCl₄) y terapéutica (CCl₄+Gb). (**p< 0.01 y ***p< 0.001).

II. Estudio histológico.

A) Análisis histológico de las cortezas renales.

En las figuras 8-11 A-E y 8-12 A-E se puede apreciar que el CCl₄ provoca mayor daño en los túbulos de la corteza interna que en la externa. Este fenómeno prevalece en los tratamientos con Gb, incluso en el que sólo recibió el antioxidante.

La intoxicación con CCl₄, provocó necrosis en células tubulares proximales, caracterizada por la pérdida del borde en cepillo, eosinofilia citoplásmica y cambios nucleares. Asimismo, se presentaron células con vacuolización citoplásmica intensa. Los tratamientos con Gb disminuyeron el daño producido por el CCl₄.

Para confirmar los cambios estructurales observados en las cortezas renales, se realizó un conteo de túbulos proximales en corte transversal por campo de 40X, en la corteza interna de los riñones, donde el daño provocado por el CCl₄ fue mayor. En estos túbulos se cuantificó el número de células sanas y dañadas (Figura 8-13 A y B). El análisis cuantitativo confirmó el daño producido por el CCl₄, al haber mayor número de células dañadas por túbulo y por campo en el tratamiento que sólo recibió este hidrocarburo. Asimismo, se pudo confirmar la protección del Gb al ser administrado tanto de forma

preventiva como terapéutica puesto que la cantidad de células y túbulos dañados en estos tratamientos, fue menor y además, se conservó un mayor número de túbulos sanos (diferencia significativa con respecto al grupo tratado sólo con CCl_4). Entre los dos tratamientos con Gb no hubo diferencias significativas. Cabe señalar que a pesar de la nefroprotección del Gb, éste no pudo reestablecer el número de células y túbulos normales. Además, las cortezas internas de animales que recibieron solo Gb mostraron una gran cantidad de túbulos y células dañadas.

Imágenes histológicas de las cortezas renales.

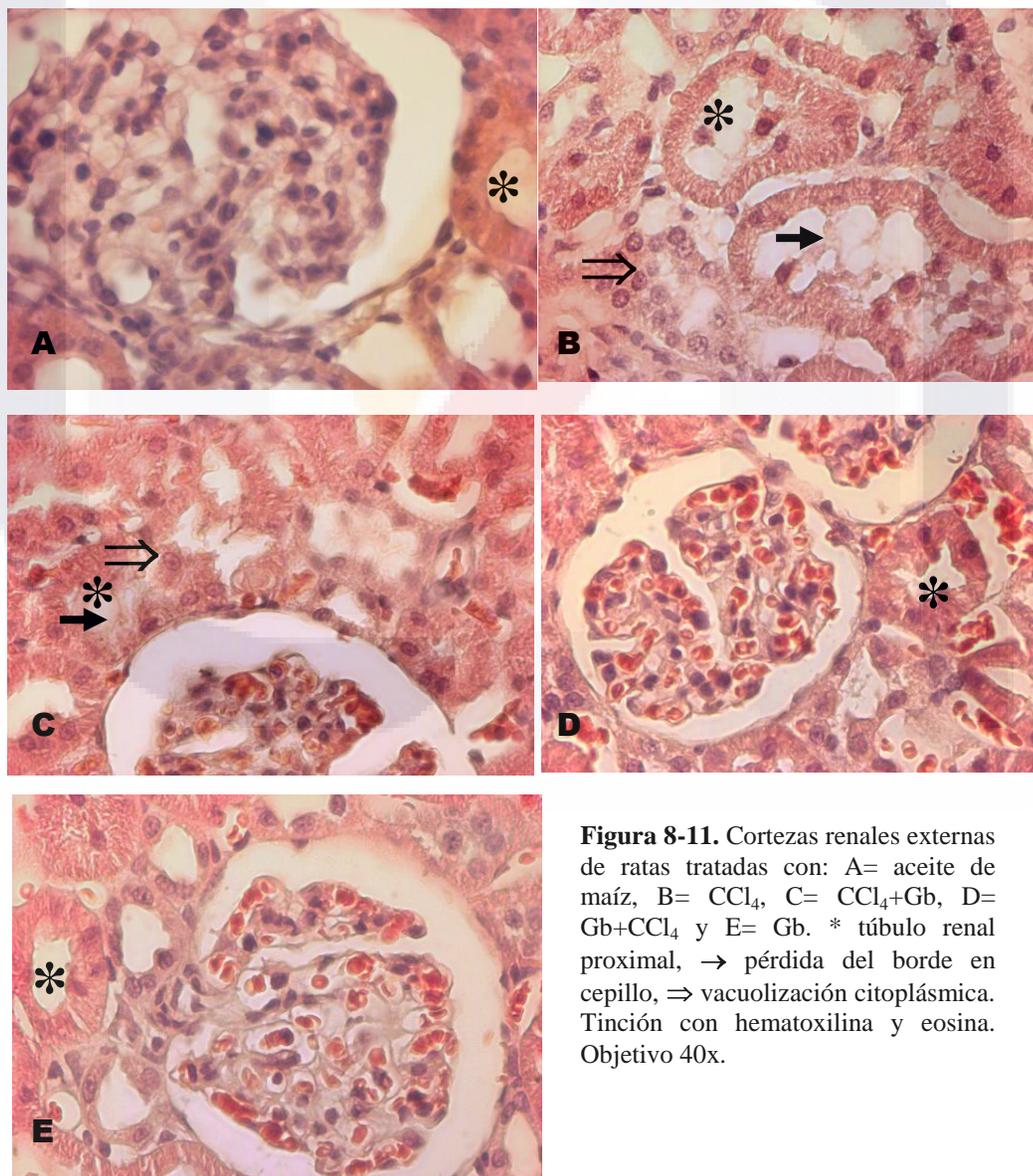


Figura 8-11. Cortezas renales externas de ratas tratadas con: A= aceite de maíz, B= CCl_4 , C= CCl_4 +Gb, D= Gb+ CCl_4 y E= Gb. * túbulo renal proximal, → pérdida del borde en cepillo, ⇒ vacuolización citoplásmica. Tinción con hematoxilina y eosina. Objetivo 40x.

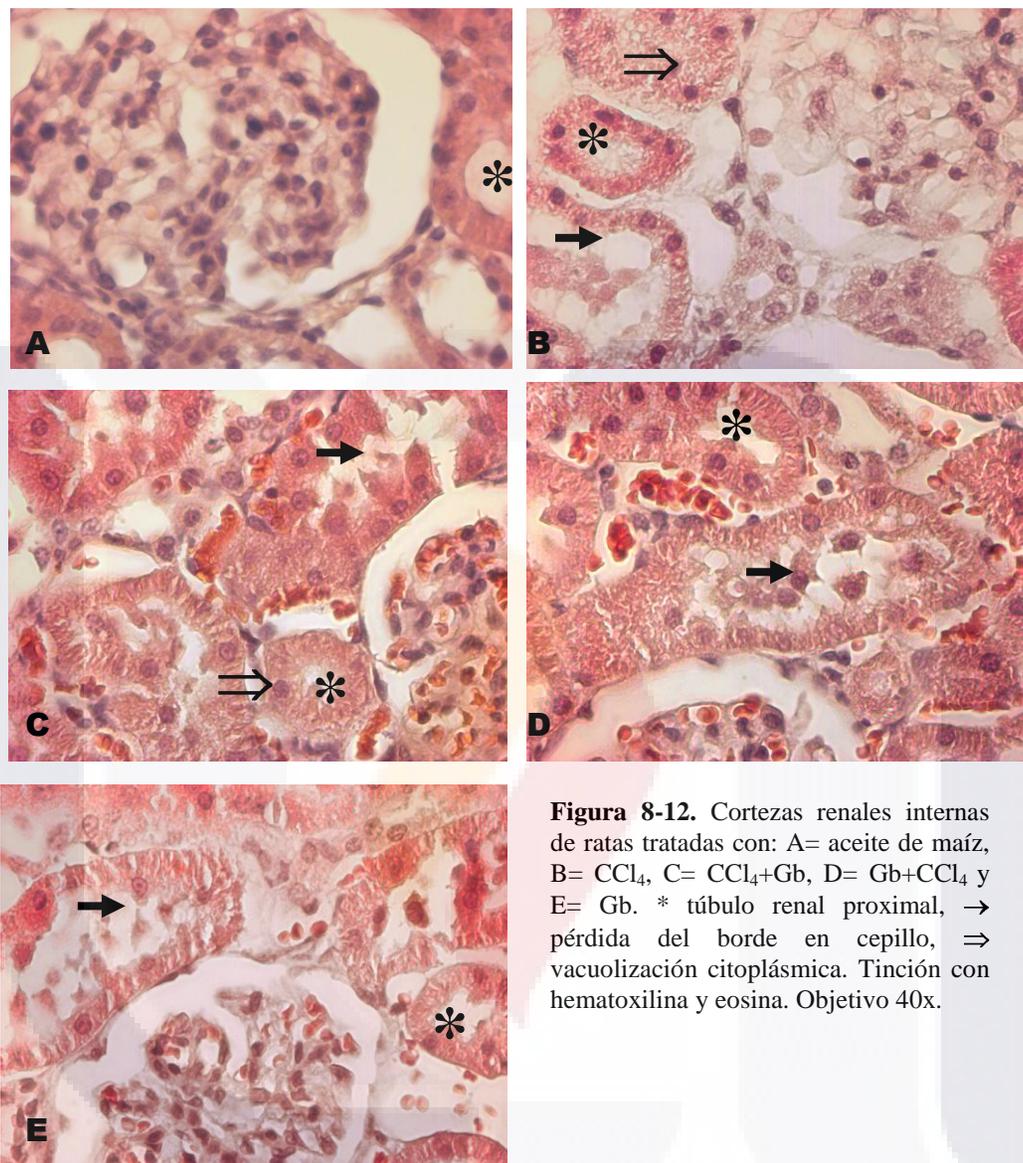


Figura 8-12. Cortezas renales internas de ratas tratadas con: A= aceite de maíz, B= CCl₄, C= CCl₄+Gb, D= Gb+CCl₄ y E= Gb. * túbulo renal proximal, → pérdida del borde en cepillo, ⇒ vacuolización citoplásmica. Tinción con hematoxilina y eosina. Objetivo 40x.

Conteo de células y túbulos en la corteza renal interna.

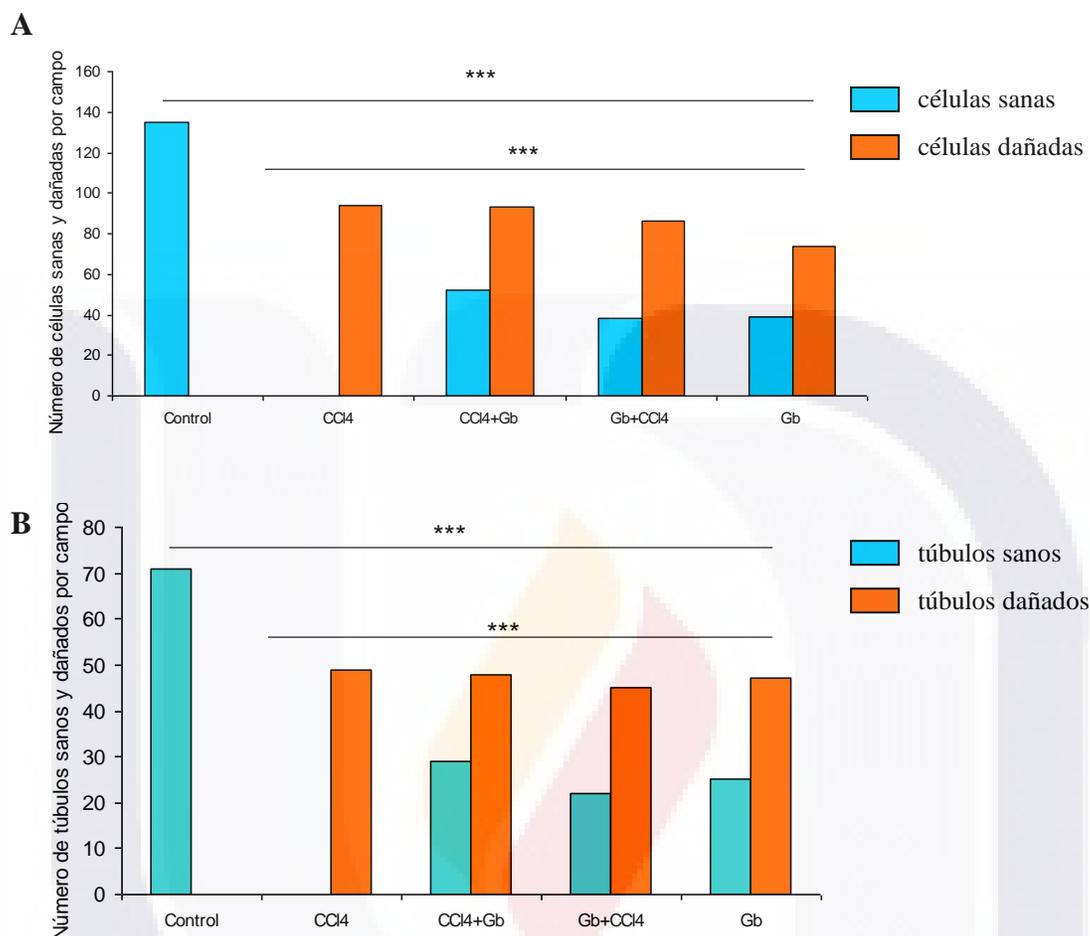


Figura 8-13 A y B. Conteo de células (A) y túbulos proximales (B) sanos y dañados por campo de 40X, en la corteza renal interna de los animales experimentales. (***) $p < 0.001$.

B) Análisis histológico del hígado.

Los hígados de ratas que recibieron solo CCl₄ presentaron necrosis de hepatocitos en áreas centrolobulillares con zonas extendidas hacia la periferia. Las áreas con necrosis de hepatocitos en los grupos que recibieron Gb de manera preventiva y correctiva, se limitaron a la zona central del lobulillo (Figura 8-14 A-J).

En las zonas necróticas, de los grupos tratados (CCl₄, CCl₄+Gb y Gb+CCl₄) se observaron hepatocitos con intensa vacuolización citoplásmica y picnosis nuclear. La presencia de infiltrado inflamatorio se hizo más evidente en el grupo tratado con Gb+CCl₄.

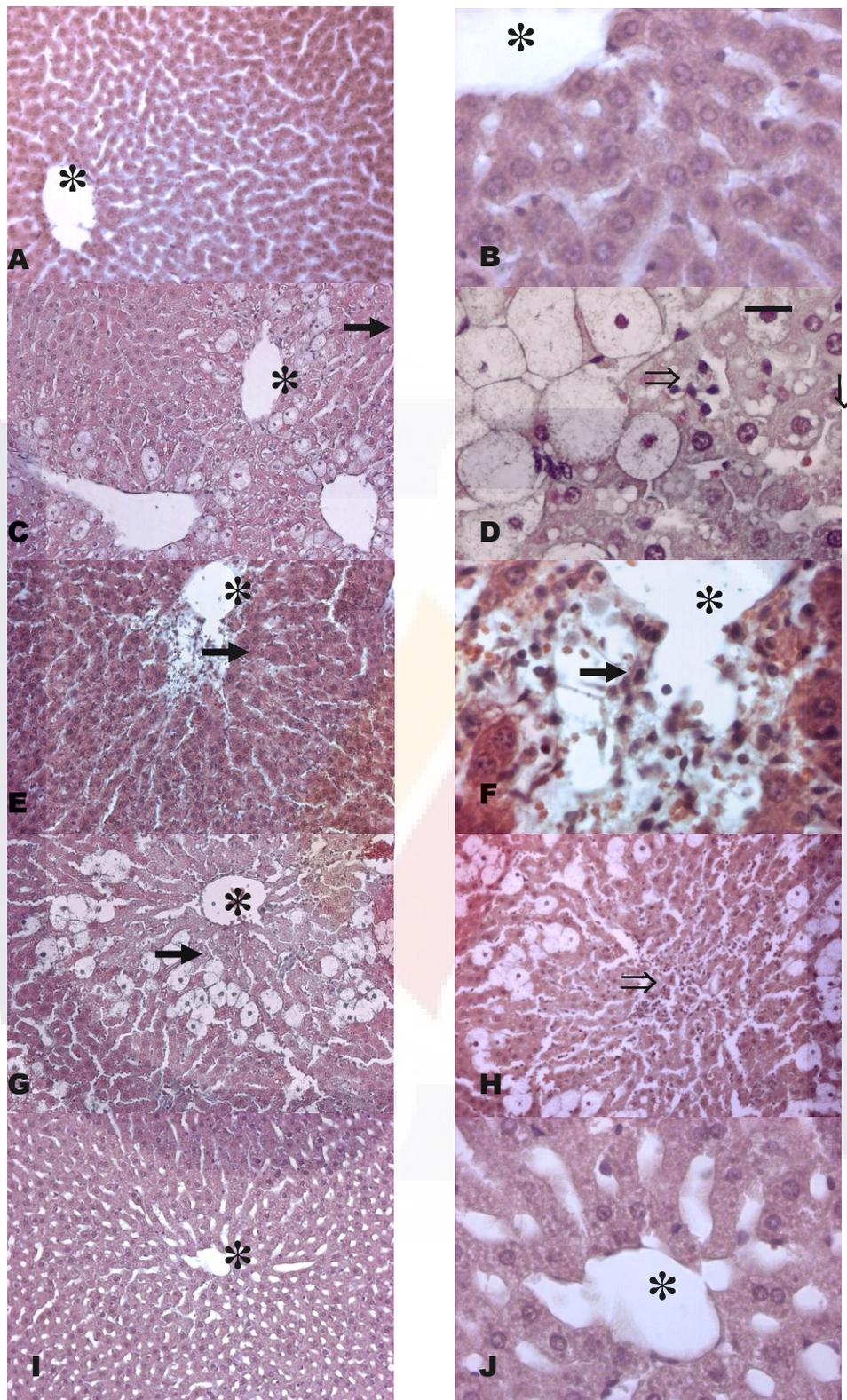
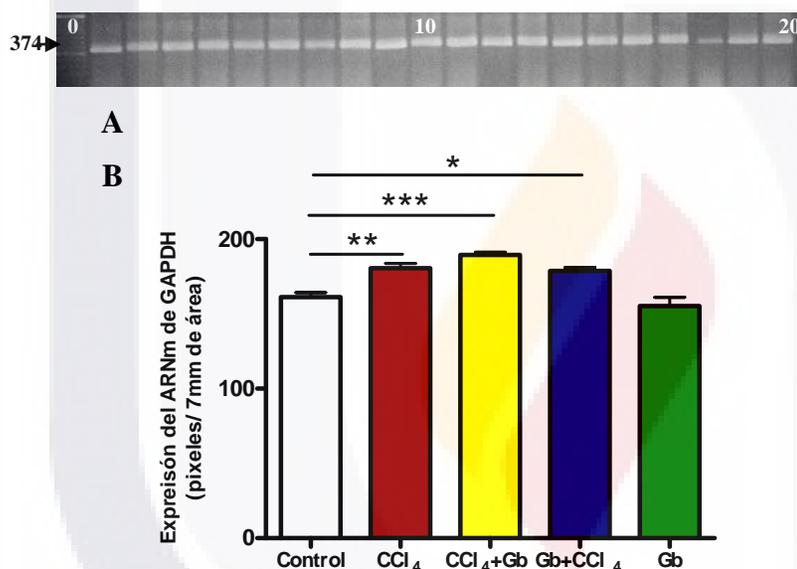


Figura 8-14. Tejido hepático de los animales experimentales. A y B grupo control, objetivos 10 y 40x. C y D grupo tratado con CCl_4 , objetivo 10 y 40x. E y F grupo tratado con CCl_4 +Gb, objetivo 10 y 40x. G y H grupo tratado con Gb+ CCl_4 . I y J grupo tratado con Gb. * vena centrolobulillar, → necrosis centrolobulillar y periférica, - picnosis nuclear, ⇒ zona de infiltrado inflamatorio, ⇓ vacuolización citoplásmica. Tinción con hematoxilina y eosina.

III. Estudios moleculares.

A) Expresión a nivel transcripcional de mensajeros de citocinas proinflamatorias en corteza renal.

Como puede observarse en las figuras 8-15 A y B, la expresión del transcrito del gen constitutivo GAPDH en la corteza renal está presente en todos los grupos experimentales, y expresado con intensidad mayor en el grupo tratado con CCl₄+Gb.



Las figuras 8-16 A y B muestran la expresión del mensajero de TNF- α . En el grupo que recibió sólo CCl₄, la expresión disminuyó de manera significativa, con respecto al control. En el grupo tratado con CCl₄+Gb la expresión de esta citocina presentó valores parecidos a los del grupo control y en el grupo que recibió Gb+CCl₄ la expresión estuvo aumentada de forma no significativa con respecto al control y de manera significativa con respecto al grupo que recibió sólo CCl₄.

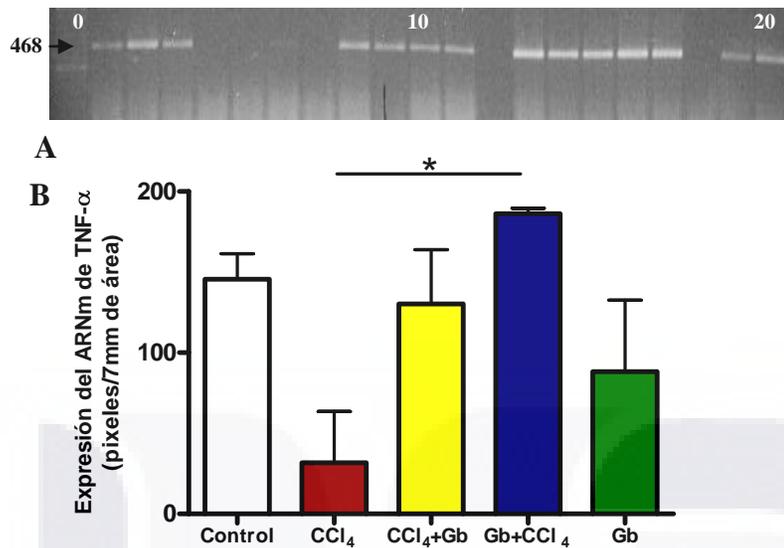


Figura 8-16. Expresión del transcrito de TNF- α (468 pb) en corteza renal de ratas expuestas a: CCl₄ (0.40 ml/rata/vo/dosis única) y Gb (4 mg/kg/día/5 días) de manera preventiva y terapéutica. A, expresión del transcrito en gel de agarosa: carriles= 0 marcador de peso molecular (de 50 pb), 1-3 controles, 4-8 tratados con CCl₄, 9-13 tratados con CCl₄+Gb, 14-17 tratados con Gb+CCl₄ y 18-20 tratados con Gb. B, análisis estadístico de la expresión del ARNm (* p <0.05).

Como se observa en las figuras 17 A y B la transcripción de IL-6 es casi nula en la mayoría de los grupos, excepto en el que recibió Gb+CCl₄.

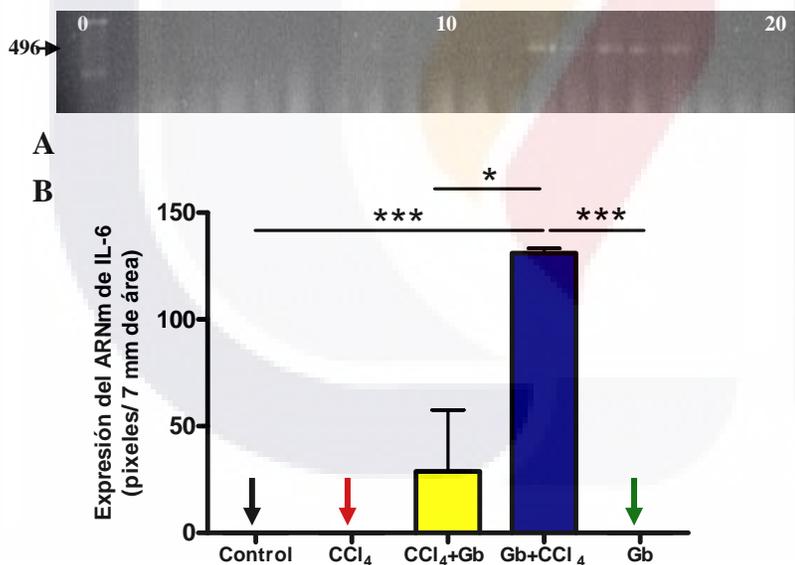


Figura 8-17. Expresión del transcrito de IL-6 (496 pb) en corteza renal de ratas expuestas a: CCl₄ (0.40 ml/rata/vo/dosis única) y Gb (4 mg/kg/día/5 días) de manera preventiva y terapéutica. A, expresión del transcrito en gel de agarosa: carriles= 0 marcador de peso molecular (de 50 pb), 1-3 controles, 4-8 tratados con CCl₄, 9-13 tratados con CCl₄+Gb, 14-17 tratados con Gb+CCl₄ y 18-20 tratados con Gb. B, análisis estadístico de la expresión del ARNm (* p <0.05, *** p <0.001).

B) Expresión a nivel transcripcional de mensajeros de citocinas proinflamatorias en hígado.

La expresión del transcrito del gen constitutivo GAPDH se mantuvo con la misma intensidad en la mayoría de los tratamientos, excepto en los hígados tratados con CCl₄, en los cuales la intensidad de expresión disminuyó (Figuras 8-18 A y B).

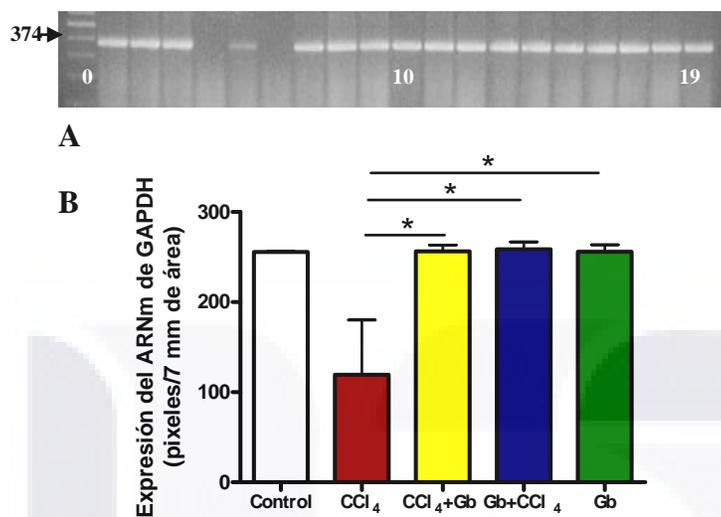


Figura 8-18. Expresión del transcrito del gen constitutivo GAPDH en hígado de ratas expuestas a: CCl₄ (0.40 ml/rata/vo/dosis única) y Gb (4 mg/kg/día/5 días) de manera preventiva y terapéutica. A, expresión del transcrito en gel de agarosa: carriles= 0 marcador de peso molecular (de 100 pb), 1-3 controles, 4-7 tratados con CCl₄, 8-11 tratados con CCl₄+Gb, 12-15 tratados con Gb+CCl₄ y 16-19 tratados con Gb. B, análisis estadístico de la expresión del ARNm (*p<0.05).

Como se muestra en las figuras 8-19 A y B, la transcripción de TNF- α disminuyó en el grupo tratado con CCl₄, mientras que en los demás grupos está presente, sin embargo, se observó una mayor intensidad de expresión en el grupo tratado con Gb+CCl₄ en comparación con lo observado en el grupo control.

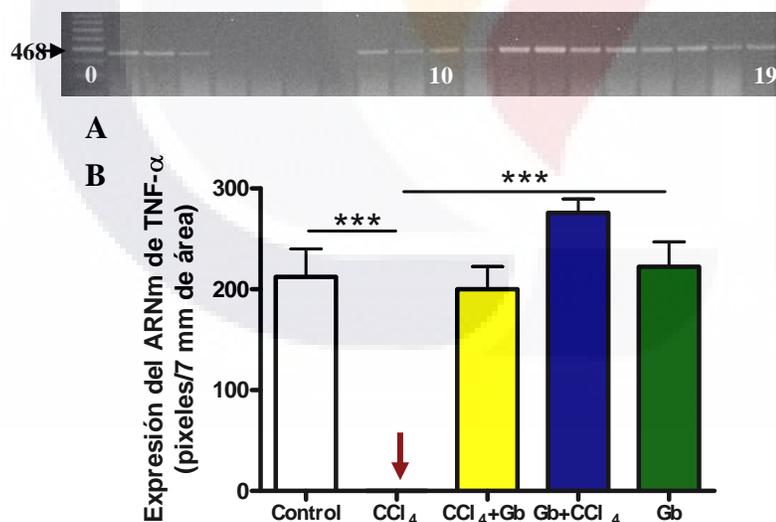


Figura 8-19. Expresión del transcrito de TNF- α (468 pb) en hígado de ratas expuestas a: CCl₄ (0.40 ml/rata/vo/dosis única) y Gb (4 mg/kg/día/5 días) de manera preventiva y terapéutica. A, expresión del transcrito en gel de agarosa: carriles= 0 marcador de peso molecular (de 100 pb), 1-3 controles, 4-7 tratados con CCl₄, 8-11 tratados con CCl₄+Gb, 12-15 tratados con Gb+CCl₄ y 16-19 tratados con Gb. B, análisis estadístico de la expresión del ARNm (***)p<0.001).

Como puede observarse en las figuras 8-20 A y B, la expresión del mensajero de Il-6 estuvo presente sólo en las muestras 13, 14, 18 y 19 de los tratamientos con Gb+CCl₄ y Gb.

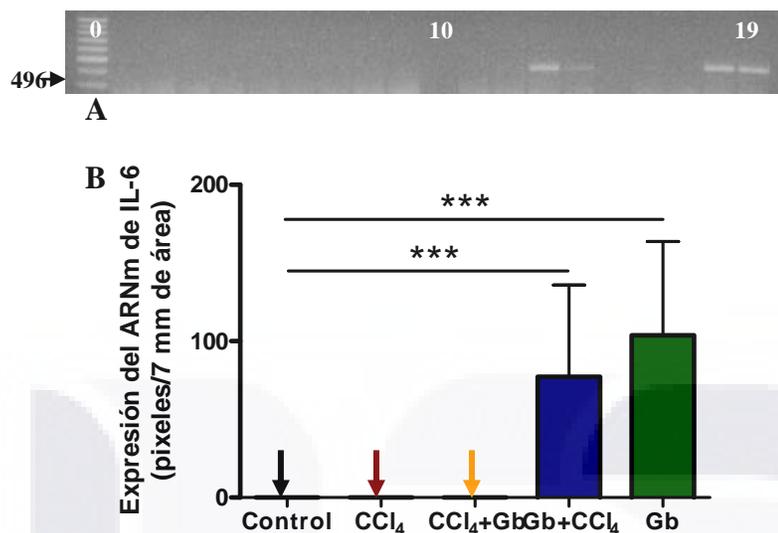


Figura 8-20. Expresión del transcrito de IL-6 (496 pb) en hígado de ratas expuestas a: CCl₄ (0.40 ml/rata/vo/dosis única) y Gb (4 mg/kg/día/5 días) de manera preventiva y terapéutica. A, expresión del transcrito en gel de agarosa: carriles= 0 marcador de peso molecular (de 100 pb), 1-3 controles, 4-7 tratados con CCl₄, 8-11 tratados con CCl₄+Gb, 12-15 tratados con Gb+CCl₄ y 16-19 tratados con Gb. B, análisis estadístico de la expresión del ARNm (***)p<0.001).

TRATAMIENTO CRÓNICO

I. Estudios funcionales.

A) Manejo renal de sodio y agua

La excreción fraccionaria de sodio aumentó de manera significativa en el grupo tratado con Gb+CCl₄, mientras que en el resto de los grupos se mantuvo sin modificaciones con respecto al control (Figura 8-21).

Con relación al grupo control, el flujo urinario disminuyó de manera no significativa en los animales tratados con CCl₄ (45%). Además, el grupo que recibió Gb+CCl₄ aumentó con respecto al grupo control (31%) y de manera significativa con relación al grupo tratado con CCl₄ (138%) (Figura 8-22).

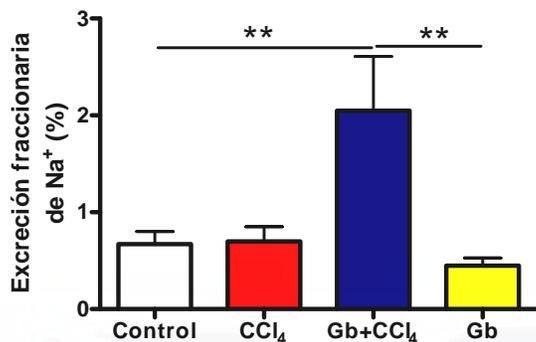


Figura 8-21. Excreción fraccionaria de sodio en ratas expuestas a Gb (4 mg/3 veces por semana/8 semanas) y CCl₄ (0.2 ml/ 3 veces semana/8 semanas). El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄. (**p<0.01).

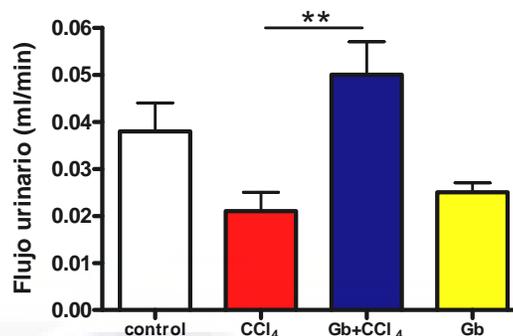


Figura 8-22. Flujo urinario en ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄. (**p<0.01).

B) Efecto en células tubulares proximales

Con relación al grupo control, la concentración urinaria de glucosa no presentó cambios significativos en los animales tratados con CCl₄, Gb+CCl₄ y Gb. Sin embargo, este parámetro disminuyó de manera significativa (58%) en el grupo tratado con Gb+CCl₄ respecto a los animales expuestos solamente al CCl₄. (Figura 8-23).

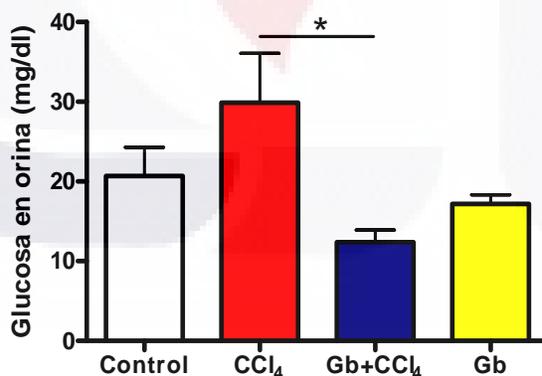


Figura 8-23. Concentración de glucosa en orina de ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄. (*p<0.05).

La concentración urinaria de proteínas aumentó de manera significativa en todos los grupos experimentales con respecto a los valores medios del grupo control: 959% en el

grupo tratado con CCl_4 , 775% en el que recibió Gb+ CCl_4 y 780% en el tratamiento con Gb (Figura 24).

Además, con relación al valor medio del grupo control, la actividad urinaria de la enzima TGG aumentó de manera significativa en el grupo tratado con CCl_4 (900%) y sin cambios significativos en los grupos tratados con Gb+ CCl_4 y Gb (Figura 25). Debe subrayarse que, aunque sin cambios significativos, la actividad urinaria de esta enzima fue menor en el grupo tratado con Gb+ CCl_4 que en el grupo expuesto solamente al CCl_4 (Figura 25).

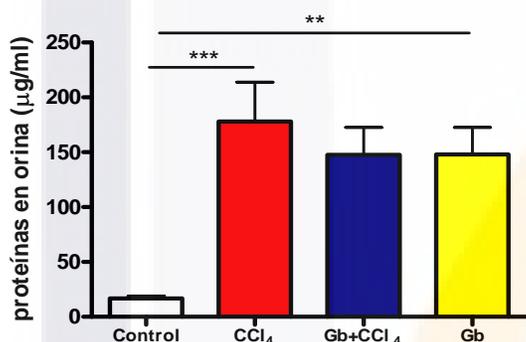


Figura 24. Concentración de proteínas en orina de ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl_4 (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl_4 . (** p <0.01 y *** p <0.001).

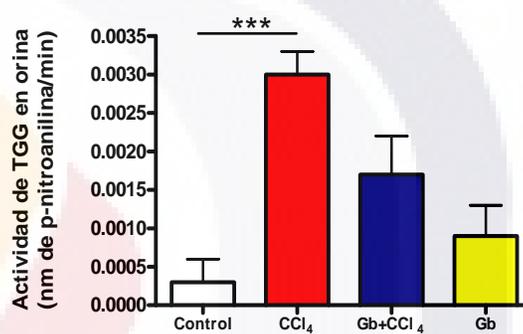


Figura 25. Actividad de TGG en orina de ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl_4 (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl_4 . (* p <0.05, ** p <0.01 y *** p <0.001).

C) Acidificación urinaria.

Respecto al valor medio del grupo control, la excreción de la masa ácida (acidez titulable) aumentó de manera significativa en el grupo tratado con CCl_4 (100%); sin embargo, en los grupos que recibieron Gb+ CCl_4 y Gb los valores de este parámetro no cambiaron de manera significativa. Además, en estos dos últimos grupos la masa ácida excretada disminuyó de manera significativa respecto a los animales tratados solamente con CCl_4 (61%) (Figura 26).

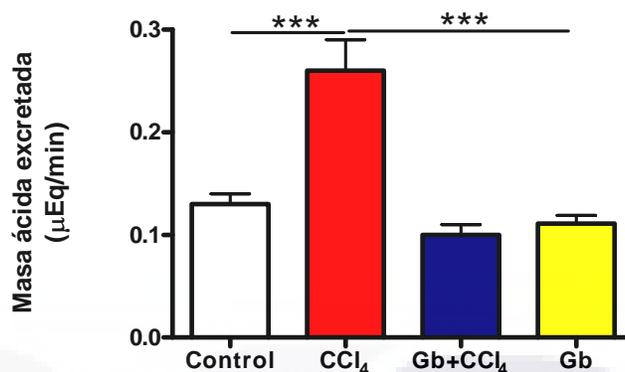


Figura 26. Masa ácida excretada por la orina en ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄. (***) $p < 0.001$.

D) Hemodinámica renal

Respecto al grupo control, la velocidad de filtración glomerular (C-In) aumentó de manera no significativa en el grupo tratado con Gb+CCl₄ (26%), mientras que en los grupos tratados con CCl₄ y Gb no se modificó (Figura 27).

Por otra parte, con relación al valor medio del grupo control, el flujo sanguíneo renal (C-PAH) disminuyó de manera no significativa en el grupo tratado con CCl₄ (32%) y aumentó significativamente en el grupo tratado con Gb+CCl₄ (144%). Además, este último grupo mostró un incremento significativo en la C-PAH (261%) con respecto al grupo tratado solamente con CCl₄ (Figura 28).

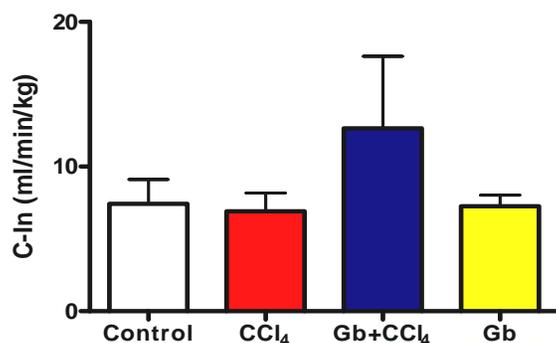


Figura 27. Depuración de Inulina en ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄.

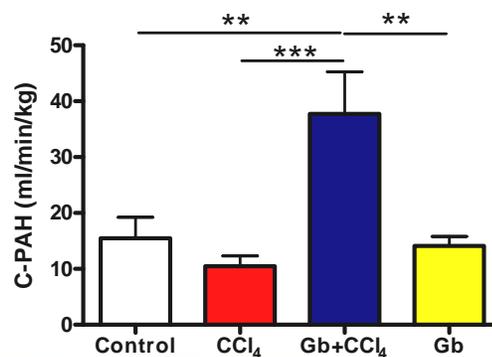


Figura 28. Depuración de ácido para-aminohipúrico en ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄.

La fracción de filtración aumentó de manera no significativa (68%) en los animales tratados con CCl₄, mientras que en los grupos tratados con Gb+CCl₄ y Gb no se encontraron diferencias importantes, con respecto al valor medio del grupo control (Figura 29).

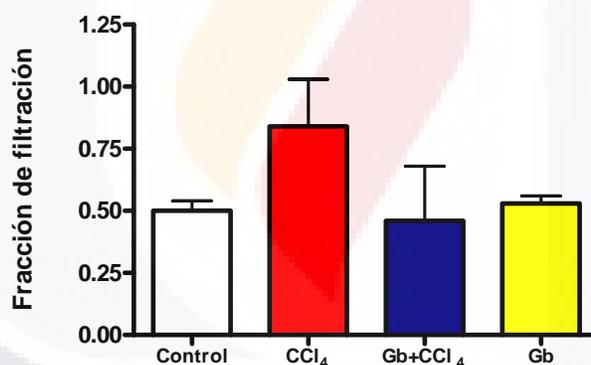


Figura 29. Fracción de filtración en ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄.

E) Efectos oxidativos.

Las concentraciones de malondialdehído en los homogenizados de corteza renal aumentó de manera significativa en todos los grupos, respecto al valor medio del grupo control: CCl₄ (323%), Gb+CCl₄ (246%) y Gb (219%) (Figura 30).

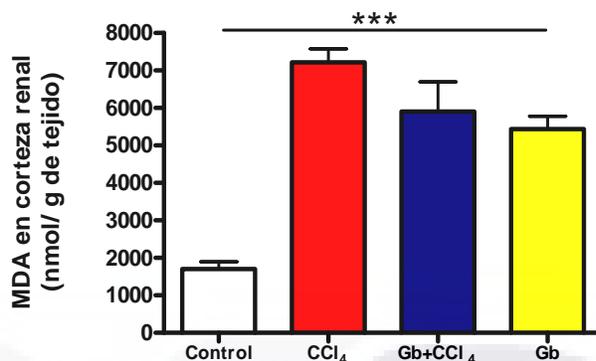


Figura 30. Concentración de MDA en ratas expuestas a Gb (4 mg de la solución farmacéutica) y CCl₄ (13-25%; 0.2 ml/ 3 veces semana/ 8 semanas) durante 8 semanas. El Gb fue administrado simultáneamente con el CCl₄. (**p<0.001).

II. Estudio histológico de la corteza renal.

El análisis histológico de la corteza renal reveló intensa vacuolización citoplásmica en todos los grupos experimentales, incluso en el que recibió solamente Gb (Figuras 8-31D, 8-32D y 8-33A y B). Aunque la pérdida del borde en cepillo también se presentó en todos los tratamientos, estuvo más intensificada en el grupo que recibió solo CCl₄, el cual mostró también mayor cantidad de células y túbulos dañados (Figuras 8-31B, 8-32B y 8-33A y B). El tratamiento con CCl₄+Gb disminuyó el daño provocado por el CCl₄, al disminuir la pérdida del borde en cepillo y conservar una mayor cantidad de células y túbulos sanos (Figuras 8-31C, 8-32C y 8-33A y B). Como puede observarse en las figuras 8-31B y 8-32B, el daño que el CCl₄ establece en la corteza interna es más intenso que en la corteza externa.

Por otra parte, las cortezas renales de ratas tratadas sólo con CCl₄, presentaron regeneración de las túbulos proximales, en los cuales se observó un epitelio bajo (Figura 8-32B).

Análisis visual de la corteza renal:

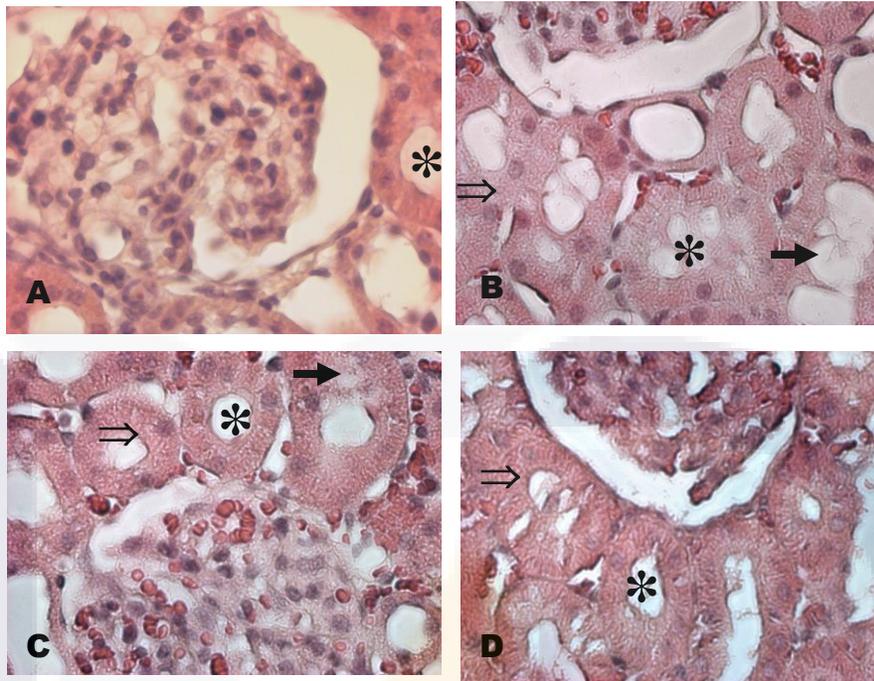


Figura 8-31. Cortezas renales externas de ratas tratadas con: A= aceite de maíz, B= CCl_4 , C= Gb+ CCl_4 y D= Gb. * túbulo renal proximal, → pérdida del borde en cepillo, ⇒ vacuolización citoplásmica. Tinción hematoxilina y eosina Objetivo 40x.

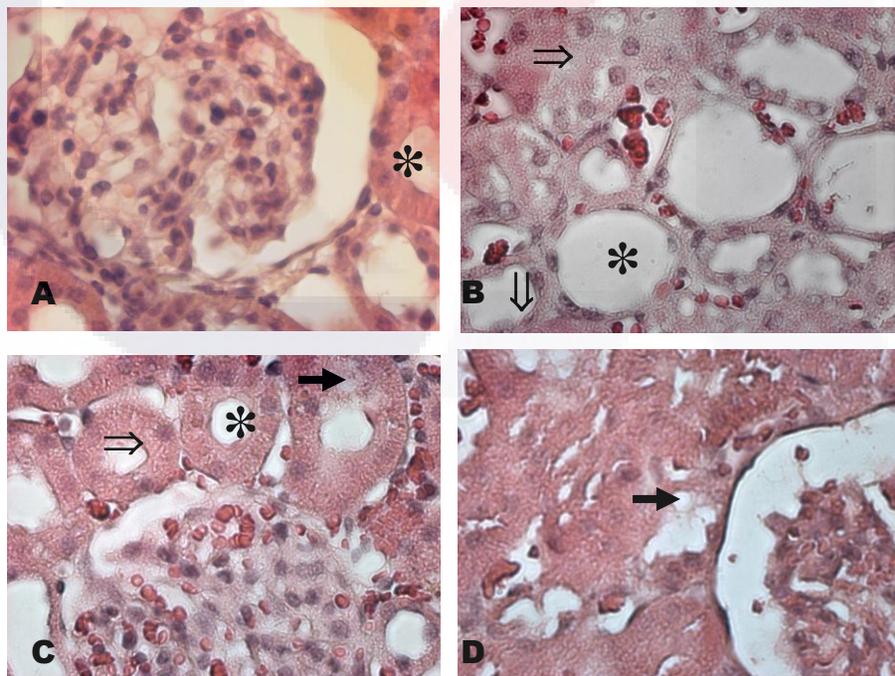


Figura 8-32. Cortezas renales internas de ratas tratadas con: A= aceite de maíz, B= CCl_4 , C= Gb+ CCl_4 y D= Gb. * túbulo renal proximal, → pérdida del borde en cepillo, ⇒ vacuolización citoplásmica, ⇓ túbulo en regeneración. Tinción con Hematoxilina y eosina. Objetivo 40x.

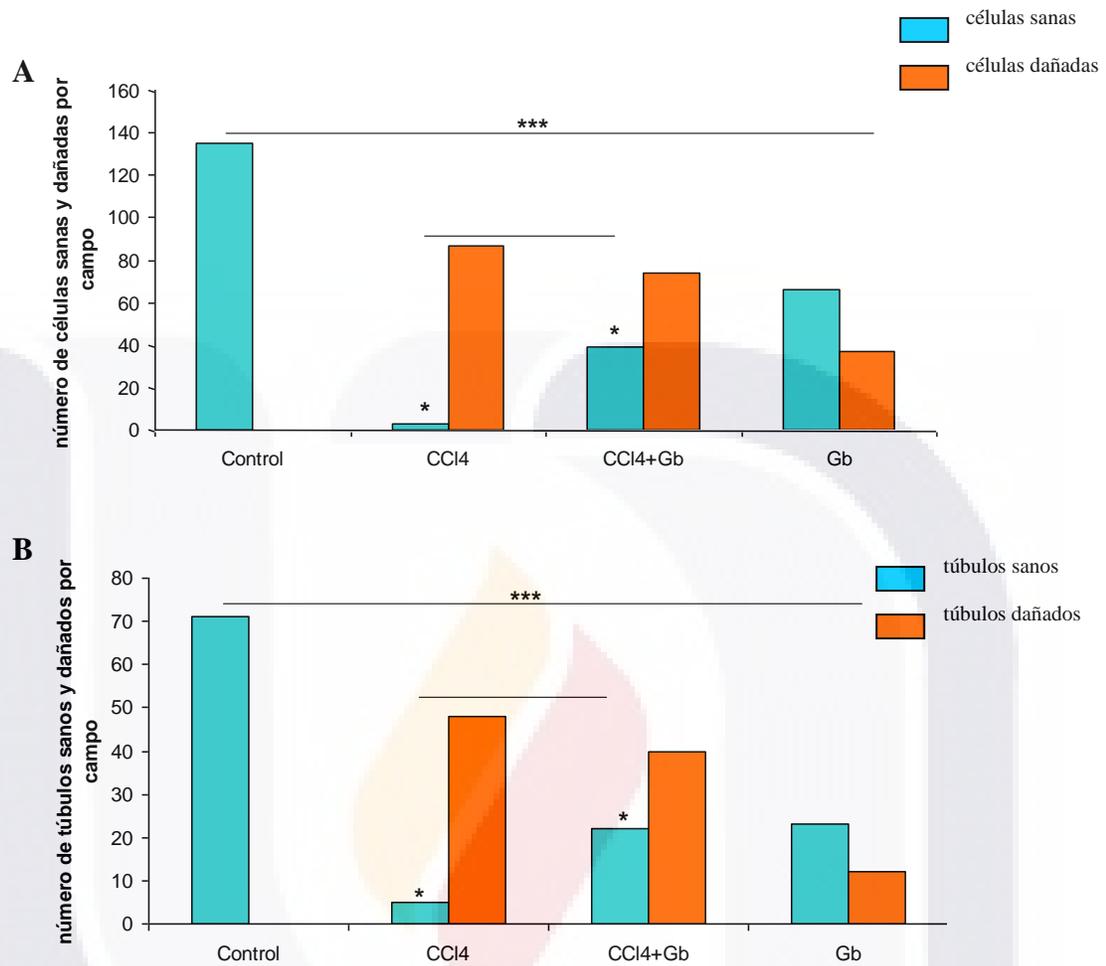
Conteo de células y túbulos en cortezas internas.

Figura 8-33. Conteo de células (A) y túbulos (B) proximales sanos y dañados por campo, en la corteza renal de los animales experimentales. (* $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$).

9. DISCUSIÓN

Como ya se describió, los riñones participan de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal de los mamíferos. Estos órganos actúan de manera conjunta para mantener el equilibrio funcional de varios sistemas corporales y juegan un papel importante en la regulación de algunos procesos bioquímicos y fisiológicos (Oster y Pérez, 1988). Ahora bien, muchos xenobióticos al ser biotransformados en el organismo generan metabolitos electrófilos altamente reactivos y tóxicos que forman aductos con algunas macromoléculas de las células, alterando con ello su función. La biotransformación del CCl_4 es un buen ejemplo de generación de radicales libres y daño celular ya que en este proceso, mediado por el citocromo P450 (CYP450), se forman radicales triclorometilo ($\text{Cl}_3\text{C}^\bullet$) y peroxitriclorometilo ($\text{Cl}_3\text{COO}^\bullet$) (Gruebele *et al.*, 1996). Estos compuestos intermediarios pueden interactuar con los lípidos de las membranas de las células causando lipoperoxidación (McCay *et al.*, 1984). La unión de estos radicales con los lípidos membranales ocurre principalmente en el hígado y en la corteza y médula de los riñones (Rincón *et al.*, 1999).

Para neutralizar a los radicales libres y evitar daño a las células, los organismos aeróbicos tienen mecanismos de protección que funcionan como atrapadores de esas sustancias (mecanismos antioxidantes). Sin embargo, bajo diversas circunstancias estos mecanismos pueden fallar, por ejemplo cuando se producen radicales libres en exceso, apareciendo entonces el daño celular (Maxwell, 1995). Por lo anteriormente expuesto, en este trabajo se investigó la capacidad del extracto del *Ginkgo biloba* (antioxidantes) para prevenir o disminuir la magnitud de las alteraciones funcionales, moleculares y las lesiones histológicas producidas por el CCl_4 , en el hígado y los riñones de ratas Wistar.

1) TRATAMIENTO AGUDO

a) Estudios funcionales.

1.1 Manejo renal de sodio y agua

Bajo nuestras condiciones experimentales, en este trabajo no se encontraron cambios significativos en la excreción urinaria de Na^+ ni en el flujo urinario de los animales

expuestos sólo al CCl_4 y de los animales tratados de manera preventiva y terapéutica con Gb.

1.2 Efectos en células tubulares proximales

* Concentración de glucosa en la orina.

Al igual que otros nutrientes celulares (como los aminoácidos, el bicarbonato, ciertas vitaminas, etc.), la glucosa es filtrada libremente a través de los capilares glomerulares y es reabsorbida en el túbulo proximal, mediante un proceso de cotransporte con el sodio, a través de la membrana luminal y de manera pasiva por una proteína facilitadora localizada en la membrana basolateral (Guyton y Hall, 1997; Eaton y Pooler, 2004). Dado que, en este trabajo, la excreción urinaria de sodio no se modificó en ninguno de los grupos experimentales, con respecto al control, tampoco se encontraron cambios significativos en el manejo renal de la glucosa entre los mismos.

* Concentración de proteínas en orina.

Con respecto al manejo renal de las proteínas, cabe señalar que los péptidos de peso molecular alto no se filtran en los glomérulos, mientras que los de peso molecular bajo se filtran libremente y son reabsorbidos por las células proximales, mediante un proceso de transporte activo (endocitosis). Por ello, la proteinuria es indicativa de daño glomerular o del túbulo proximal (Eaton y Pooler, 2004). En la presente investigación, el grupo que recibió Gb de manera preventiva ($\text{Gb}+\text{CCl}_4$) presentó concentraciones de proteínas en orina similares a las del grupo control. En este contexto, la asociación entre los flavonoides antioxidantes del Gb y los elementos membranales de las células proximales y de los capilares glomerulares previno la pérdida urinaria de proteínas. Por su parte, el grupo que recibió solo CCl_4 y el grupo tratado con Gb de manera terapéutica (CCl_4+Gb) presentaron proteinuria. Con respecto a estos resultados, es importante mencionar que el proceso de captación de proteínas por las células proximales requiere de un aporte energético que puede verse comprometido cuando se daña la integridad funcional o estructural de las mitocondrias, por alteraciones del equilibrio redox o la presencia de radicales altamente reactivos, en este caso los radicales triclorometilo y peroxitriclorometilo derivados del metabolismo del CCl_4 (oxidación lipídica). Además, es conveniente señalar que no sólo el

aporte insuficiente de energía explica la presencia de proteínas en la orina, sino también la pérdida de células que sufren las nefronas por efecto de la lipoperoxidación causada por los radicales antes señalados y el daño directo sobre las membranas de células proximales que las incapacita para reabsorber proteínas.

* Actividad de TGG.

La enzima TGG se localiza en las membranas de borde en cepillo de las células proximales y transporta aminoácidos derivados del gama-glutamilo necesarios para la síntesis de GSH (Glossman y Neville, 1972; Griffith y Meister, 1979; Schulman *et al*, 1975; Meister, 1984; Iantomasi, *et al*, 1994; Guoyao, 2004). Por su localización, esta enzima es muy susceptible al daño provocado por los xenobióticos sobre la integridad de los fosfolípidos membranales. Por lo anterior, la actividad de la TGG es un buen indicador de necrosis tubular (El-Sharkawy, *et al*, 1994). Sin embargo, se debe señalar que, en las ratas, la pérdida del epitelio tubular es un proceso natural de renovación, lo que se traduce en la presencia de actividad urinaria basal de algunas enzimas (Esteller y Cordero, 2001).

En este trabajo, la actividad de la TGG aumentó significativamente en el grupo intoxicado con CCl_4 y en el tratamiento terapéutico. Al respecto, ha sido reportado que diversos xenobióticos dañan las células del epitelio tubular y aumentan la enzimuria (Griffith, 1979; Iantomasi, *et al*, 1994). En este contexto, los radicales tóxicos derivados de la biotransformación del CCl_4 generan una serie de alteraciones que conducen a la necrosis celular y, en consecuencia, aumentan la actividad de la TGG. Ahora bien, el tratamiento preventivo con Gb evitó la pérdida de TGG a través de la orina. Con relación a estos resultados, se debe mencionar que los flavonoides del Gb tienen la capacidad de asociarse con la cabeza polar de los fosfolípidos membranales (Erlejman *et al*, 2004; Oteiza *et al*, 2005) evitando así que los agentes oxidantes accedan a la fracción hidrofóbica de las membranas, esto protege a las células contra la lipoperoxidación, el suceso inicial de daño celular. De esta manera, nuestro trabajo demuestra que cuando el Gb es administrado de forma preventiva es capaz de proteger la integridad de las membranas de las células tubulares, evitando con ello la enzimuria inducida por el CCl_4 .

1.3 Acidificación urinaria

Los sistemas reguladores de la concentración de hidrogeniones en los líquidos orgánicos incluyen: a) los sistemas de amortiguamiento ácido-base de líquidos orgánicos, b) el centro respiratorio, que regula la eliminación de CO_2 y por lo tanto, de H_2CO_3 y c) los riñones, que excretan una orina ácida o alcalina (Guyton y Hall, 1997). De esta manera, ante una disminución o aumento de las concentraciones de HCO_3^- , se produce acidosis o alcalosis metabólica o respiratoria, cuando aumenta o disminuye la presión de CO_2 . Cuando esto ocurre, los mecanismos reguladores de la concentración de iones hidrógeno, se activan. Ahora bien, con base en nuestros resultados, la administración de una dosis única de CCl_4 no produce acidosis metabólica en los animales de experimentación, puesto que no hubo diferencias significativas entre la acidificación urinaria medida en los grupos que recibieron el CCl_4 y el grupo control.

1.4 Hemodinámica renal

El flujo plasmático renal (C-PAH), la velocidad de filtración glomerular (C-In) y la fracción de filtración no presentaron cambios significativos entre los grupos experimentales estudiados. Conviene señalar que la circulación sanguínea renal está sujeta a dos tipos de regulación: a) la autorregulación intrínseca o autónoma y b) la regulación extrínseca, nerviosa y humoral.

La autorregulación del flujo sanguíneo de un órgano consiste en la capacidad del mismo para mantener constante su flujo sanguíneo cuando se presentan alteraciones de la presión de perfusión. En los mamíferos, el flujo plasmático renal y la filtración glomerular no se alteran significativamente cuando la presión de perfusión oscila entre 80 y 180 mmHg. Este hecho se demostró en el riñón desnervado y aislado del perro, con independencia de los mecanismos humorales y neurogénicos, lo que demostró que es una propiedad intrínseca de los vasos renales (Pitts, 1976; Schnerman *et al.*, 1977). Además, en nuestro trabajo el grupo tratado únicamente con Gb presentó los valores más altos de flujo sanguíneo renal (C-PAH). Esto puede ser explicado por la presencia de ginkgólidos en el extracto, los cuales mejoran la circulación sanguínea relajando a las células musculares

lisas de los vasos sanguíneos, mediante la activación del factor relajante del endotelio y del óxido nítrico (DeFeudis, 2000; Chan *et al*, 2007).

b) *Daño oxidativo*

Los ácidos grasos insaturados que conforman las membranas celulares son particularmente susceptibles de ser oxidados por radicales tóxicos y ERO. En este contexto, el proceso de lipoperoxidación inicia cuando el compuesto tóxico, altamente reactivo, desprende un átomo de hidrógeno de un grupo metileno, dejando un electrón desapareado en el átomo de carbono $-C^{\bullet}H-$. Como resultado de la lipoperoxidación se forman hidroperóxidos de lípidos, que ante la presencia de metales de transición catalizan su descomposición a hidrocarburos alquílicos y aldehídos, entre estos, el malondialdehído (MDA) que, a su vez puede provocar alteraciones en otras macromoléculas (Esterbauer y Cheeseman, 1990; Rauen *et al* 1999). Por lo anterior, la cuantificación de MDA se emplea con frecuencia para evaluar el daño producido por la oxidación de lípidos membranales.

En la presente investigación, las concentraciones de MDA en corteza renal de ratas expuestas sólo a CCl_4 , estuvieron aumentadas significativamente, con respecto a los valores del grupo control. En efecto, los radicales triclorometilo y peroxitriclormetilo, son compuestos altamente reactivos, capaces de iniciar efectos oxidativos sobre los lípidos membranales y alterar, en consecuencia, la integridad de las células. Por otra parte, en los animales tratados de manera preventiva con Gb, el daño oxidativo disminuyó significativamente puesto que los valores obtenidos fueron muy similares a los del grupo control. Con respecto a lo anterior, Erlejman, *et al* (2004) mencionan que la quercetina presente en el extracto de Gb, tiene la capacidad de asociarse con las cabezas polares de los fosfolípidos y evita la entrada de compuestos oxidantes. Es muy probable que este sea el mecanismo por el cual el Gb previno el daño generado por los radicales tóxicos del CCl_4 . Asimismo, en el grupo que recibió el tratamiento terapéutico, las concentraciones de MDA estuvieron disminuidas de forma significativa, sin embargo estos valores no fueron tan bajos como los del grupo preventivo. Esto significa que en efecto, los flavonoides protegen la integridad de las membranas biológicas, sin embargo, la protección es mayor cuando la

asociación entre los agentes antioxidantes y los elementos membranales, ocurre antes de que se establezca el daño.

b) Estudio histológico y molecular de las cortezas renales.

Los riñones son el segundo órgano blanco del CCl_4 y de forma específica, la porción tubular proximal de las nefronas resulta seriamente afectada (Cotran *et al*, 1999; Jaramillo, *et al*, 2006). En efecto, las células proximales de la corteza renal de los grupos experimentales, mostraron características típicas de la necrosis: cambios nucleares, intensa vacuolización citoplásmica y pérdida del borde en cepillo.

El mecanismo de toxicidad del CCl_4 en los riñones inicia con la lipoperoxidación de membranas celulares, lo que trae como consecuencia pérdida de la permeabilidad selectiva, entrada descontrolada de agua y solutos, liberación del contenido lisosomal y pérdida de la homeostasis del calcio. Como resultado de estas alteraciones, los túbulos proximales pierden el borde en cepillo, lo que pone en riesgo no sólo la integridad física de las células sino la capacidad funcional de la nefrona, al desprenderse elementos transportadores de iones y bombas ATPásicas que regulan el manejo renal de electrolitos y solutos, como la glucosa. Con respecto a lo anterior, el grupo que recibió sólo CCl_4 mostró mayor cantidad de células y túbulos dañados, en comparación con los demás tratamientos, lo que a su vez provocó glucosuria, enzimuria y elevación de las concentraciones de malondialdehído, en mayor grado que el resto de los grupos experimentales. Con relación al grupo que recibió el tratamiento preventivo, el Gb logró disminuir el daño producido por el CCl_4 , al conservar un mayor número de células y túbulos sanos. En este contexto, Erlejman *et al*, (2004), afirma que los flavonoides, entre ellos la quercetina, componente principal del extracto de hojas del Gb, tienen la capacidad de asociarse con elementos fosfolipídicos, tanto hidrofóbicos como hidrofílicos, en las membranas biológicas, lo que evita que agentes antioxidantes dañen la integridad de los fosfolípidos membranales. Por otra parte, en el tratamiento terapéutico también se observó una disminución del daño producido por el CCl_4 , sin embargo la protección fue mayor en el tratamiento preventivo. Por lo anterior, se puede afirmar que el tratamiento preventivo con Gb permitió que los flavonoides se

relacionaran con los fosfolípidos de las membranas, evitando que los radicales triclorometilo y peroxitriclorometilo, ejercieran sus efectos tóxicos sobre las células mediante los procesos oxidativos previamente descritos.

Ahora bien, durante el análisis histológico se observó un daño mayor en la corteza interna de los riñones que en la externa, a pesar de haber recibido Gb. Con relación a lo anterior, la corteza externa es la zona que recibe la mayor cantidad del riego sanguíneo renal, en comparación con la corteza interna y con la médula (Guyton y Hall, 1997). Probablemente, al recibir un mayor suministro de oxígeno, la corteza externa se encuentra relativamente más protegida contra los efectos tóxicos del CCl_4 , contrario a lo que sucedió en la corteza interna, en donde los daños fueron más severos, en todos los grupos experimentales.

Con relación a la necrosis celular en los riñones, una vez que las células tubulares mueren, éstas se desprenden completamente de la membrana basal y se dirigen hacia la luz, donde son arrastradas por el fluido tubular y, finalmente, son eliminadas a través de la orina. Este proceso puede llegar a obstruir la luz del túbulo, si la pérdida celular es muy intensa (Cotran, *et al*, 1999; Esteller y Cordero, 2001). En nuestro estudio, la luz de algunos túbulos presentó una cantidad relativamente elevada de células muertas, que posteriormente fueron eliminadas a través de la orina, lo que se tradujo en un aumento de la actividad de la TGG (sobre todo en el grupo que recibió únicamente CCl_4). Ante la toxicidad producida por el CCl_4 , la eliminación de células muertas a través de la orina es la manera más sencilla de retirar los restos celulares de los túbulos, para que luego éstos puedan regenerarse. Debido a lo anterior, y aunado a que las membranas basales en los túbulos proximales permanecieron íntegras, el proceso inflamatorio estuvo ausente en las cortezas renales dañadas por el CCl_4 . A pesar de ello, se evaluó la expresión de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 (citocinas proinflamatorias), en las cortezas renales de todos los grupos experimentales para establecer las diferencias entre el daño renal y hepático a nivel molecular causado por el CCl_4 .

Expresión de genes

GAPDH

Con relación al estudio molecular, la expresión del transcrito del gen constitutivo (GAPDH) estuvo presente en todos los grupos experimentales, incluso en el que recibió sólo CCl₄, con intensidad similar a la del grupo control.

TNF- α

En las cortezas renales de ratas tratadas solo con CCl₄, la expresión del transcrito de TNF- α estuvo disminuida de forma significativa. Con relación a estos resultados, es importante mencionar que durante el análisis histológico se pudo apreciar que las células tubulares necróticas no estuvieron en contacto con el espacio intersticial y, de esta forma, no se desencadenó el proceso inflamatorio. La expresión de este mismo transcrito en los demás grupos estuvo presente y no se mostró disminuida, como en el grupo expuesto únicamente a CCl₄. Cabe señalar que la expresión de TNF- α fue más intensa en el grupo que recibió el tratamiento preventivo, en comparación con el resto de los grupos experimentales.

IL-6

Con respecto a IL-6, sólo las cortezas renales de ratas tratadas de forma preventiva expresaron el mensajero de esta citocina, además de una de las muestras correspondiente al tratamiento terapéutico, aunque la expresión fue muy débil.

Estos resultados indican que posiblemente los componentes del Gb favorecen la expresión de estas citocinas, bajo nuestras condiciones experimentales. Con relación a lo anterior, Gohil y Packer (2002), mencionan que los componentes del Gb tienen la capacidad de modificar la expresión de algunos compuestos, como el GSH, y de acuerdo con nuestros resultados, es posible que el Gb haya favorecido también el aumento en la expresión de las citocinas estudiadas.

c) Estudio histológico y molecular del hígado.

El estudio histológico reveló que, independientemente del tratamiento, las células hepáticas desarrollaron un proceso necrótico, caracterizado por cambios nucleares (picnosis) y

citoplásmicos (aspecto hialino e incremento de acidofilia citoplásmica), además de lisis celular. Los mecanismos que desencadenan la necrosis celular, ocurren por oxidación (radicales triclorometilo y peroxitriclorometilo) de las membranas lisosomales y mitocondriales, con la consiguiente liberación de su contenido al citoplasma (enzimas degradativas y calcio, respectivamente) y el inicio del proceso de muerte celular. Por otra parte, la presencia de un citoplasma acidofílico, característico del proceso necrótico, observado en las células hepáticas lesionadas, es indicativo de la asociación entre la eosina y las proteínas intracelulares que están siendo desnaturalizadas por acción de las proteasas lisosomales (Cotran *et al*, 1999). Asimismo, se pudo observar vacuolización citoplásmica en todos los grupos experimentales. Con respecto a lo anterior, cabe señalar que el daño oxidativo producido por los radicales $\text{Cl}_3\text{C}^\bullet$ y $\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$, altera la integridad membranal y favorece la entrada descontrolada de sodio (alteración de ATPasas de Na/K) y de agua a la célula (Klaassen, 986; Siller, 2006), lo que se traduce como vacuolización citoplásmica.

Ahora bien, el análisis histológico del hígado de ratas tratadas únicamente con CCl_4 reveló necrosis en la zona centrolobulillar con áreas extendidas hacia la periferia del lobulillo. En éste contexto, Klaassen *et al*, (2008), mencionan que la zona centrolobulillar es particularmente susceptible de sufrir daño por xenobióticos debido a que sus células contienen altas concentraciones de CYP450-2E1 (la isoforma de citocromo encargada de bioactivar al CCl_4), en comparación con la zona media y periférica. La extensión de áreas necróticas hacia la periferia del lobulillo, encontrada en la presente investigación, puede ser explicada por el hecho de que las otras zonas lobulillares también expresan esta isoforma de citocromo, aunque en menor proporción que la zona central.

Por otra parte, tanto el tratamiento preventivo como el terapéutico con Gb lograron disminuir las áreas necróticas y además, éstas estuvieron limitadas al área central de los lobulillos, lo que significa que los antioxidantes del Gb protegieron las células hepáticas de la zona periférica y media. Con relación a lo anterior, y de acuerdo con Erlejman y col. (2004), la quercetina presente en el extracto de hojas del Gb, tiene un coeficiente de partición octanol/buffer muy elevado, lo que facilita la interacción del flavonoide con la porción hidrofóbica de las membranas celulares y las protege contra la lipoperoxidación,

mientras que otros flavonoides del extracto como la isorramnetina, se pueden asociar con las cabezas polares de los fosfolípidos y los efectos protectores se potencian al limitar el acceso de los agentes oxidantes a la membrana. Por ello, podemos afirmar que el Gb ejerció efectos protectores sobre las células de las áreas periféricas de los lobulillos y logró disminuir la necrosis central ante la hepatotoxicidad producida por el CCl₄.

Cabe señalar que durante el daño hepático, las células muertas liberan su contenido hacia el espacio perisinusoidal hasta alcanzar la pared vascular de los sinusoides, desencadenándose de esta forma el proceso inflamatorio (Cotran *et al*, 1999). En efecto, el infiltrado inflamatorio estuvo presente en todos los grupos que recibieron CCl₄, como resultado de la lesión producida. Además, la inflamación no sólo se relaciona con la eliminación del agente causal de la lesión o, en este caso, la eliminación de las células hepáticas muertas, sino que además está ligada con el proceso de reparación del tejido; por ello, es posible que, de haber sido retirado el agente lesivo y dada la capacidad regenerativa del órgano, hubiera ocurrido regeneración. A pesar de esto, cabe señalar que ante intoxicaciones crónicas, el proceso inflamatorio y de regeneración en el hígado pueden conducir a la conformación de una arquitectura desorganizada y a la generación de tejido cicatrizal, características de la cirrosis hepática (Chávez *et al*, 2006).

Expresión de genes

GAPDH

La expresión del transcrito del gen constitutivo GAPDH estuvo disminuida de forma significativa en el grupo tratado sólo con CCl₄, mientras que en el resto de los grupos la expresión estuvo presente con intensidad parecida a la del grupo control.

TNF- α

El TNF- α es una citocina que participa de manera activa durante la inflamación aguda, favoreciendo la vasodilatación por liberación de ON, y el reclutamiento de neutrófilos y monocitos hacia zonas de lesión, así como la activación de células para erradicar células muertas mediante la activación endotelial (expresión de selectinas e integrinas membranales) (Esteller y Cordero, 2001; Cotran *et al*, 1999). El TNF- α es liberado por

diversos tipos de células, entre ellas, las células de Kupffer (fagocitos mononucleares activados), en el hígado, en donde la citocina favorece la liberación de enzimas proteolíticas por parte de las células mesenquimales, provocando lesión tisular. Debido a que esta citocina participa de manera importante durante el proceso inflamatorio, se realizaron estudios moleculares encaminados a evaluar la expresión de TNF- α en los hígados de todos los animales de experimentación. Los resultados muestran que, en el grupo que recibió sólo CCl₄, la expresión del ARNm de TNF- α , estuvo disminuida de forma significativa. Con relación a lo anterior, algunos autores como Salazar, *et al* (1999), han estudiado el nivel de expresión de TNF- α durante la intoxicación aguda con CCl₄ y encontraron que a partir de las 24 h éste aumenta significativamente y se mantiene hasta las 48 h para luego volver a niveles basales. Puesto que en esta investigación se encontró el efecto contrario al reportado por Salazar, *et al* (1999), es posible que, bajo nuestras condiciones experimentales, el CCl₄ evite la expresión adecuada de TNF- α , probablemente la alteración ocurre a nivel transcripcional. No obstante, durante el análisis histológico en este mismo grupo (tratados solo con CCl₄), se observó la presencia de infiltrado inflamatorio. Con relación a esto, se debe señalar que la IL-1 también puede desencadenar el proceso inflamatorio (Cotran *et al*, 1999), por lo que, probablemente fue esta citocina la que produjo la inflamación, en ausencia de TNF- α , en este grupo experimental.

Por otra parte, en el hígado de ratas que recibieron Gb de manera preventiva, la expresión de TNF- α aumentó significativamente, con respecto al resto de los grupos, este resultado guarda relación con el estudio histológico de estos mismos hígados, en los cuales se observó un aumento en el infiltrado inflamatorio, lo que evidencia el papel fundamental del TNF- α en el reclutamiento de células inflamatorias. Es importante señalar que diversas investigaciones (Yan *et al*, 2006; Kotakadi *et al*, 2008) han demostrado que el extracto de Gb disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α , en ratas con colitis ulcerativa, por lo que le han atribuido al Gb propiedades antiinflamatorias. Sin embargo, y de acuerdo con lo encontrado en esta investigación, es posible que el Gb ejerza efectos proinflamatorios que podrían estar relacionados con la aceleración del proceso de regeneración del órgano lesionado. Además, los constituyentes del extracto de Gb pueden estimular la síntesis de algunos compuestos como el GSH (Gohil y Packer (2002), por lo

que probablemente, el tratamiento preventivo con Gb causó este mismo efecto sobre la expresión de TNF- α .

Ahora bien, en el tratamiento terapéutico la expresión de esta misma citocina fue similar a la del grupo control. Es importante señalar que la presencia del mensajero de TNF- α en los grupos que recibieron Gb demuestra que, ante la intoxicación con CCl₄, los componentes del Gb son capaces de mantener la expresión de esta citocina.

Con respecto al efecto del CCl₄ sobre la expresión de GAPDH y TNF- α en este trabajo, Cartlidge y Standring (1991) encontraron que los radicales tóxicos del CCl₄, pueden atravesar la envoltura nuclear y formar aductos con el ADN. Estos mismos autores encontraron que los radicales Cl₃C \cdot y CCl₃OO \cdot , pueden producir alquilación de purinas y alteraciones en las cromátides de células de médula ósea, además de diversas aberraciones cromosómicas. Estos efectos pueden ocasionar la expresión inadecuada o disminuida de algunas proteínas. Por lo anterior, es posible que alguno de estos mecanismos de daño genético haya afectado la expresión normal de TNF- α y de GAPDH.

IL-6

Con respecto a la IL-6, también es una citocina de la fase aguda de la inflamación y es producida por fagocitos mononucleares, células endoteliales, y fibroblastos, en respuesta a IL-1 y TNF- α ; en el hígado, estimula la síntesis de proteínas de fase aguda de la inflamación por los hepatocitos, especialmente el fibrinógeno.

En el presente trabajo se encontró que el transcrito de IL-6 estuvo ausente en casi todas las muestras de hígado de todos los grupos experimentales, excepto en dos muestras, una del tratamiento preventivo y otra del grupo que recibió sólo Gb. Con relación a esto, Salazar, *et al* (1999), encontraron aumentada la expresión de IL-6 después de 24 h de la intoxicación con una dosis única de CCl₄ (0.5 ml/100 g de peso) mientras que en nuestro estudio el grupo que recibió sólo CCl₄, no expresó esta citocina. Debido a que el grupo control no expresó IL-6, no es posible atribuir al CCl₄ un efecto inhibitor sobre la expresión del transcrito de IL-6. ahora bien, una posible explicación a los resultados

obtenidos en las muestras que sí expresaron la citocina (tratamiento preventivo y grupo tratado sólo con Gb) es que el Gb favorece la expresión de IL-6, al igual que hace con otros compuestos, como el GSH y enzimas antioxidantes, tal como mencionan Gohil y Packer (2002).

Ahora bien, considerando los resultados obtenidos en la expresión del gen constitutivo GAPDH, en los riñones y en el hígado, podemos afirmar que, el daño que el CCl₄ produce sobre el hígado, a nivel transcripcional, es mucho mayor. En éste órgano la disminución de la expresión del gen constitutivo, inducida por la administración únicamente de CCl₄, se hizo evidente, mientras que en los riñones, se presentó con intensidad similar a la del grupo control. El mayor grado de afectación del hígado se debe a que es el principal órgano blanco del CCl₄ y está en contacto directo con los metabolitos tóxicos generados por la biotransformación de este hidrocarburo.

2) TRATAMIENTO CRÓNICO

a) Estudios funcionales.

1.1 Manejo renal de sodio y agua

La secreción y excreción de sodio en los distintos segmentos de la nefrona representan la vía principal de control de las concentraciones de este ión en el cuerpo. La porción tubular proximal reabsorbe el 65% del sodio filtrado, mientras que el resto es reabsorbido en otros segmentos de la nefrona (Eaton y Pooler, 2004); de esta forma, cualquier alteración producida en el túbulo proximal puede provocar la excreción anormal de sodio por la orina. Por ello, el incremento de sodio en la orina es indicativo de daño en las células tubulares proximales. En este trabajo, la excreción fraccionaria de sodio permaneció sin cambios significativos en el grupo expuesto sólo a CCl₄. Una posible explicación a este resultado es que a pesar de que el CCl₄ daña a las células renales, éstas tienen la capacidad de regenerarse, de tal manera que sus funciones pueden ser restituidas cuando las células del epitelio tubular incrementan su división o crecen para abarcar áreas desnudas que ha dejado las células necróticas. De esta manera la reabsorción de sodio en el grupo expuesto únicamente a CCl₄, pudo realizarse de manera normal (Cotran *et al*, 1999). Por otra parte en el grupo que recibió Gb+CCl₄ de forma simultánea, hubo un aumento significativo en la

excreción fraccionaria de este mismo ion, en comparación con el resto de los grupos. En este sentido, algunas investigaciones han demostrado que el consumo prolongado de agentes antioxidantes, como los flavonoides, produce efectos nocivos pro-oxidantes (Kleijnen y Knipschild, 1992; Weerdenbag y Van Beek, 1997; Bando *et al*, 2007). Existe además en el extracto del Gb, otro compuesto tóxico, el ácido ginkgólico, aunque en concentraciones bajas (Chan *et al.*, 2007). A pesar de que no están reportadas alteraciones renales producidas por el Gb, es posible que los resultados encontrados en el grupo tratado con Gb+CCl₄, reflejen algún tipo de sinergia entre ambos compuestos que dañe de manera específica el manejo renal de sodio.

Por otra parte, la presencia de acuaporinas (AQP's) determina de manera importante la cantidad de orina excretada. De acuerdo con Van Os y Deen (1998), la AQ1, que normalmente se localiza en la porción tubular proximal, se encuentra sobre-expresada y redistribuida en distintos segmentos de la nefrona, en riñones de ratas tratadas de manera crónica con CCl₄; asimismo, la AQP3 también se encuentra sobreexpresada pero su distribución permanece restringida al túbulo colector. De esta forma, existe una mayor reabsorción de líquido tubular que no ocurre necesariamente en la porción proximal, que se encuentra dañada por los efectos tóxicos del CCl₄, sino que la captura de líquido tiene lugar en otras porciones de la nefrona. De acuerdo a lo anterior, es de esperarse que la intoxicación crónica con CCl₄ provoque oliguria, sin embargo, a pesar de que se encontró disminuido el flujo urinario en el grupo que recibió este hidrocarburo, en comparación con el control, los resultados no tienen significancia estadística.

Ahora bien, al cuantificar el flujo urinario en el grupo tratado con Gb+CCl₄, se comprobó una vez más el efecto estimulante del Gb sobre el mejoramiento del flujo sanguíneo renal, que incrementó la cantidad de orina excretada de manera significativa, incluso con respecto al grupo control. De esta manera la presente investigación demuestra una vez más el efecto nefroprotector del Gb.

1.2 Efectos en células tubulares proximales.

a) Concentración de glucosa en orina.

La glucosuria es un signo característico de daño renal a nivel del túbulo proximal (Esteller y Cordero, 2001). Al respecto, debe señalarse que la glucosa es un compuesto que se filtra libremente en los capilares glomerulares y regresa a la circulación sanguínea mediante el proceso de reabsorción (Berry *et al*, 1996). La pérdida de glucosa en la orina puede ser explicada como consecuencia de daño estructural o funcional (inhibición de la síntesis de ATP) en las células proximales. Este efecto fue observado en las ratas que recibieron CCl_4 de manera crónica. Con respecto a este resultado, las alteraciones producidas los radicales triclorometilo y peroxitriclorometilo, sobre las membranas de las células proximales afecta el funcionamiento de los cotransportadores de glucosa/sodio y compromete el aporte energético necesario para el funcionamiento de las bombas de sodio-potasio que mantienen el gradiente necesario para que ocurra la entrada de sodio junto con glucosa (Guyton y Hall, 1997; Eaton y Pooler, 2004; Jaramillo *et al*, 2008).

El efecto nocivo del CCl_4 sobre el manejo renal de glucosa fue revertido de manera significativa en los animales tratados con Gb+ CCl_4 . Este efecto protector del Gb es debido a las propiedades antioxidantes de los compuestos presentes en el extracto (Chan, Xia y Fu, 2007; Erlejman *et al*, 2004), que al proteger la integridad de las membranas celulares, permiten que la reabsorción proximal de glucosa se lleve a cabo de forma adecuada.

b) Concentración de proteínas en orina.

La proteinuria es característica de alteraciones renales a nivel glomerular o de túbulo proximal, que es donde se lleva a cabo en mayor medida la endocitosis de proteínas (Berry, 1996; Mundel y Reiser, 2009). Con respecto a las concentraciones de proteínas en la orina, los grupos tratados con CCl_4 , Gb+ CCl_4 y Gb presentaron valores significativamente mayores a los del grupo control. Debido a que en el análisis del daño estructural de este trabajo, los glomérulos de los animales expuestos al CCl_4 no mostraron daño y sí en cambio lo hubo en las células proximales (pérdida del borde en cepillo y necrosis), la proteinuria puede ser explicada por la lipoperoxidación producida por los metabolitos derivados de la biotransformación del CCl_4 . Lo anterior provoca en primera instancia, la incapacidad de las

células para captar proteínas desde la luz tubular y, en última instancia, la muerte de estas células, que provoca pérdida de proteínas hacia la orina en mayor proporción. El daño de las células proximales producida por el CCl_4 concuerda con lo reportado por otros autores (Rincón *et al*, 1999; Jaramillo *et al*, 2008). Ahora bien, aunque de menor magnitud (17%), la proteinuria estuvo presente en los grupos tratados con Gb+ CCl_4 y Gb. Como ya fue descrito, algunos trabajos han demostrado que el consumo prolongado de agentes antioxidantes, como los flavonoides, produce efectos pro-oxidantes (Kleijnen y Knipschild, 1992; Weerdenbag y Van Beek, 1997; Bando *et al*, 2007). Debido a lo anterior, es posible que la administración crónica de Gb a los animales de experimentación produjera efectos pro-oxidantes sobre las células tubulares proximales, que provocaron la excreción de proteínas hacia la orina.

c) Actividad urinaria de TGG.

Por otra parte, durante la muerte de las células proximales de las nefronas se liberan componentes membranales, entre ellos, las enzimas localizadas en el borde en cepillo (como la TGG), cuya actividad urinaria es utilizada frecuentemente como indicativa de necrosis tubular proximal (El-Sharkawy *et al*, 1994). En nuestro trabajo, la actividad de la TGG se incrementó significativamente en la orina de las ratas que recibieron CCl_4 y, de manera no significativa, en los grupos tratados con Gb+ CCl_4 y Gb. Nuevamente, los radicales libres del CCl_4 , al generar lipoperoxidación, desencadenaron una serie de eventos que condujeron a la muerte de las células proximales, con lo que la TGG fue liberada hacia la orina. Ahora bien, Griffith y Meister, (1979) y Iantomasi, *et al*. (1994), señalan que los efectos tóxicos producidos por diversos xenobióticos aumentan la actividad urinaria de las enzimas presentes en el epitelio tubular reanal, lo que se relaciona con los resultados antes descritos. En función de lo anterior, el Gb disminuyó pero no evitó el daño celular provocado por la administración crónica de CCl_4 .

3. Acidificación urinaria

En condiciones normales, los mamíferos excretan una orina ácida debido al proceso de acidificación de este fluido en los diferentes trayectos de las nefronas: reabsorción o eliminación de HCO_3^- , secreción H^+ y a través de la acidez titulable. Al respecto, en los

mamíferos existen relaciones muy importantes entre las funciones hepática y renal y el equilibrio ácido-básico. El metabolismo celular produce ácidos orgánicos débiles derivados del metabolismo de carbohidratos y grasas (ácidos láctico y beta-hidroxibutírico) y sales ácidas derivadas de moléculas que contienen azufre y fósforo (lípidos y proteínas) y que dan origen a sulfatos y fosfatos, radicales de ácidos fuertes. Estas sustancias son eliminadas por los riñones durante el proceso de la acidificación urinaria, conjugándose con iones de H^+ y de NH_4^+ , secretados a lo largo de los túbulos renales e intercambiados por iones de sodio, lo que da como resultado la formación de orina más ácida que el plasma (Flores y Battle, 1997; Malnic y Jaramillo, 1998).

En este contexto, nuestros resultados demuestran que la intoxicación crónica con CCl_4 aumentó la masa ácida excretada en la orina (acidez titulable). Al respecto, ha sido reportado que en respuesta a la acidosis metabólica sistémica, la recuperación del equilibrio ácido/base de las células depende de la excreción urinaria de acidez titulable y de amoníaco (Holloway *et al*, 1986; Oster y Pérez, 1988). Debe subrayarse que, respecto al control, el grupo tratado con Gb+ CCl_4 no presentó diferencias significativas en la excreción de la masa ácida, lo que significa que el Gb ejerce un efecto preventivo o protector en el establecimiento de acidosis metabólica sistémica, posiblemente por neutralización de los radicales libres derivados de la biotransformación del CCl_4 .

4. Hemodinámica renal.

En lo referente a la velocidad de filtración glomerular (VFG) no hubo cambios significativos entre los grupos estudiados. Al respecto, ha sido descrito que en ratas cirróticas (tratadas con CCl_4), los valores medios de la presión arterial, concentración de creatinina sérica y VFG no cambian significativamente, al compararlos con los valores de los animales controles (Rincón *et al*, 1999; Jaramillo *et al*, 2008).

Por otra parte, el flujo plasmático renal aumentó significativamente en las ratas que recibieron Gb+ CCl_4 , comparado con los otros grupos experimentales. Esto puede estar relacionado con la capacidad de los riñones para mantener el flujo sanguíneo y la tasa de filtración adecuados (fenómeno de autorregulación), así como con la acción vasodilatadora

del Gb (DeFeudis y Drieu, 2000; Chang, Xia y Fu, 2007). Además, se deben destacar las propiedades antioxidantes del Gb y su capacidad para estimular el metabolismo energético de las células, lo que favorece su funcionamiento adecuado (DeFeudis, 2002).

Ahora bien, la fracción de filtración presentó un comportamiento similar al ocurrido en el estudio agudo, es decir, en el grupo tratado con CCl_4 hubo un aumento en este parámetro, mientras que el grupo tratado con Gb+ CCl_4 no mostró modificaciones con respecto al valor control. En este contexto, debido a sus propiedades vasodilatadoras, el Gb favoreció la presencia de un flujo plasmático renal (FPR) adecuado, lo que a su vez, permitió el mantenimiento de la FG. Esto proporciona el líquido requerido para que las células tubulares de las nefronas realicen su trabajo y formen la orina. Sin embargo, cuando el FPR es insuficiente, disminuye la tasa de filtración glomerular, lo que representa una señal de activación de los mecanismos compensadores que favorecen la vasodilatación de las arteriolas aferentes y vasoconstricción de las eferentes, de manera que se mantiene el proceso de filtración glomerular (fenómeno de autorregulación).

5. Efectos oxidativos

Ha sido reportado que el malondialdehído (MDA) es un compuesto utilizado para cuantificar el grado de oxidación de los lípidos membranales de las células, debido a que este compuesto se forma como consecuencia de la lipoperoxidación (Rauen *et al*, 1999). Los resultados de este trabajo mostraron un incremento significativo en las concentraciones de MDA en todos los grupos experimentales, comparados con el grupo control. Esto significa que el Gb no logró evitar el daño sobre las membranas biológicas producido por el CCl_4 y, además, que la administración crónica del antioxidante provocó efectos prooxidantes sobre los lípidos membranales, a pesar de no haber encontrado alteraciones funcionales en los parámetros fisiológicos medidos. Al respecto, se ha reportado que algunos flavonoides como la quercetina y la mirecitina pueden producir efectos prooxidantes en las células, en función de la dosis administrada (Sahu *et al*, 1991; Bando *et al*, 2007). Por ello, es posible que el consumo de Gb durante tiempos prolongados genere efectos nocivos.

b) Estudio histológico de los riñones.

La porción tubular de la nefrona es particularmente susceptible a la isquemia y también es vulnerable a los agentes nefrotóxicos. Los factores que predisponen a los túbulos a sufrir lesiones por agentes tóxicos son: la existencia de una extensa superficie de reabsorción tubular dotada de carga eléctrica, los sistemas de transporte activo de los iones y los ácidos orgánicos, y la capacidad para concentrar eficazmente la orina (Cotran *et al*, 1999). En efecto, la intoxicación crónica con CCl₄ produjo cambios morfológicos notables en los túbulos proximales de la corteza renal de los animales experimentales.

En este contexto, las células de los túbulos proximales afectados, mostraron características indicativas de necrosis: vacuolización citoplásmica intensa y pérdida del borde en cepillo, las mismas alteraciones observadas en cortezas renales de animales intoxicados de manera aguda.

De acuerdo con el análisis histológico, el grupo tratado solo con CCl₄ presentó mayor cantidad de células y túbulos proximales dañados, mientras que la administración simultánea de Gb conservó un mayor número de células y túbulos sanos, sin embargo la administración del antioxidante no revirtió los daños producidos sobre los túbulos proximales, puesto que entre el grupo tratado con CCl₄+Gb y el control, las diferencias entre número de células y túbulos sanos, fueron significativas. Cabe señalar que, nuevamente, al igual que en la intoxicación aguda, las cortezas internas presentaron mayor daño que las externas.

Es importante mencionar que, en el grupo que recibió sólo CCl₄, se observaron túbulos proximales en proceso de regeneración, caracterizados por tener un epitelio más bajo de lo normal y compuestos por una menor cantidad de células, las cuales se mostraban extendidas sobre la membrana basal. Con relación a lo anterior, y de acuerdo con Cotran *et al*, (1999), la evolución clínica de la necrosis tubular incluye una etapa de recuperación, en la que, afortunadamente, es posible la reconstrucción morfológica normal, contrario a lo que ocurre en el hígado, ante intoxicaciones crónicas.

Por otra parte, ya se ha mencionado anteriormente que la lipoperoxidación producida por los radicales tóxicos del CCl_4 generan una serie de alteraciones que conducen a la muerte celular. Con base en lo anterior, el análisis histológico guarda relación con las alteraciones funcionales observadas en los grupos experimentales, tales como el incremento de malondialdehído en todos los grupos experimentales, con relación al control, lo que significa que ante la intoxicación crónica, el Gb, aunque disminuye la cantidad de células y túbulos dañados (de forma no significativa), no evita por completo el daño producido sobre las membranas celulares, ni la pérdida de elementos membranales, como la TGG, efecto que coincide con la pérdida del borde en cepillo observada en todos los tratamientos.

Es importante mencionar que, las ratas que sólo recibieron Gb presentaron también daños similares a los encontrados en animales que recibieron CCl_4 . En este contexto, algunos autores han estudiado los efectos tóxicos del Gb y encontraron que el consumo prolongado de agentes antioxidantes, produce efectos nocivos pro-oxidantes (Kleijnen y Knipschild, 1992; Weerdenbag y Van Beek, 1997; Bando *et al*, 2007). Cabe señalar que la descripción morfológica de las cortezas renales de animales tratados solo con Gb, coincide con el aumento de las concentraciones de malondialdehído, también medido en corteza, y con la liberación de TGG hacia la orina. Además, Chi, Xia y Fu (2007) mencionan que el ácido ginkgólico, aunque está presente en el extracto en concentraciones muy bajas, puede producir efectos nocivos en organismos sensibles.

10. CONCLUSIONES

Tratamiento Agudo.

- ✓ Los radicales derivados de la biotransformación del CCl_4 provocan alteraciones en los túbulos proximales de las nefronas, que se traducen en proteinuria y enzimuria, y ocurren como resultado de la lipoperoxidación de las membranas celulares. La administración de Gb, principalmente de manera preventiva, revierte tales alteraciones, lo cual demuestra su efecto nefroprotector.
- ✓ La administración de Gb, bajo cualquier esquema de tratamiento, incrementa el flujo sanguíneo renal.
- ✓ Las alteraciones morfológicas producidas por los radicales triclorometilo y peroxitriclorometilo, consisten en vacuolización citoplásmica y pérdida del borde en cepillo en los túbulos proximales, con más intensidad en la corteza interna. El Gb ejerce su efecto nefroprotector al conservar un mayor número de células y túbulos proximales sanos.
- ✓ Los radicales tóxicos del CCl_4 modifican la expresión de $\text{TNF-}\alpha$, mientras que el Gb, al ser administrado de forma preventiva, favorece un aumento de la expresión de esta citocina, todo ello en la corteza renal.
- ✓ Las alteraciones morfológicas producidas por el CCl_4 sobre el hígado consisten en necrosis centrolobulillar extendida hacia la periferia. El Gb limita las áreas necróticas al área central y además disminuye las zonas dañadas.
- ✓ La administración de una dosis única de CCl_4 modifica la expresión del gen constitutivo GAPDH y de $\text{TNF-}\alpha$. El Gb previene el daño provocado por el CCl_4 , observándose menores cambios en la expresión de GAPDH y de $\text{TNF-}\alpha$ y además permite que las citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 se expresen sin cambios significativos respecto al control. El Gb modula la expresión de los mediadores de la inflamación estudiados.
- ✓ Los efectos tóxicos producidos por el CCl_4 son más graves en el hígado que en los riñones.

Tratamiento Crónico.

- ✓ La administración de CCl_4 durante ocho semanas produce diversas alteraciones funcionales en los riñones: glucosuria, proteinuria, enzimuria y acidificación urinaria. El Gb sólo revierte la liberación de glucosa.
- ✓ El daño producido por los radicales del CCl_4 activa los mecanismos compensatorios renales para mantener la FG.
- ✓ La administración simultánea de CCl_4 y Gb incrementa el flujo urinario y el FSR.
- ✓ El CCl_4 incrementa las concentraciones de MDA. El Gb no revierte este efecto.
- ✓ Los radicales triclorometilo y peroxitriclorometilo producen alteraciones morfológicas en la corteza renal que consisten en vacuolización citoplásmica y pérdida del borde en cepillo, incrementados en la corteza interna. El Gb, no revierte estos efectos pero logra conservar un mayor número de células y túbulos sanos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Anders MW, Jakobson J: Biotransformation of halogenated solvents. *Scand J. Work Environ Health*, 11: 23-32. 1985.
- Arendhorst WJ: Autorregulation of blood flow in the rat kidney. *Am Physiol*, 228:127-133. 1975.
- ATSDR: Agency for Toxic Substances & Disease Registry (www.atsdr.cdc.gov).
- Bando N, Wakamatsu S, Terao J: Effect of an excessive intake of quercetin on the vitamin E level and antioxidative enzyme activities of mouse liver under paraquat – induced oxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71: 2569-2572. 2007.
- Benedetti A, Fulceri R, Ferrali M, Ciccoli L, Esterbauer H, Comporti M: Detection of carbonyl formation in phospholipids of liver microsomes in carbon tetrachloride and bromotrichloromethane-poisoned rats. *Biochim Biophys Acta*, 712 (3): 628-638. 1982.
- Bergman K: Application and results of whole-body radiography in distribution studies of organic solvents. *Crit Rev Toxicol*, 12: 59-119. 1984.
- Berry CA Ives HE, Rector FC: Renal transport of glucose, amino acids, sodium, chloride and water. In: *The Kidney*, Fifth edition, (Brenner & Rector, eds.) W. B. Saunders, pp 334-370. 1996.
- Brezis M, Epstein FH: Cellular mechanisms of acute ischemic injury in the kidney. *Annu Rev Med*, 44: 27-37. 1993.
- Brezis M, Rosen S: Hypoxia of the renal medulla-its implications for disease. *N Engl J Med*, 332: 647-655. 1995.
- Buckhardt G, Bahn A, Wolff N: Molecular physiology of renal p-Aminohippurate secretion. *News Physiol Sci*, 16: 114-118. 2001.
- Cambon-Gros C, Deltour P, Boigegrain RA, Fernández Y, Mitjavilas. Short communications: Radical activation of carbon tetrachloride in foetal and maternal rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 35: 2041-2044. 1986.
- Castro GD, Díaz-Gómez M, Castro JA: Biotransformation of carbon tetrachloride and lipid peroxidation promotion by liver nuclear preparations from different animal species. *Cancer Lett*, 53: 9-15. 1990.
- Cartledge GD, Standring P: Carbon tetrachloride. *HSE Toxicity Review*, 23: 39. 1991.

- Chan P, Xia Q, Fu P: *Ginkgo Biloba* Leave Extract: Biological, Medicinal, and Toxicological Effects. J of Environ Sci and Health Part C, 25: 211–244. 2007.
- Chávez RM, Jaramillo F, Posadas FA, Martínez MC, Reyes MA, Rodríguez ML, Análisis del efecto del *Ginkgo biloba* sobre el daño hepático y renal producido por el tetracloruro de carbono. Tesis de Maestría. UAA. México. 58-98. 2006.
- Comporti M, Benedetti A, Ferrali M, Fulceri R: Reactive aldehydes (4-hidroxyalkenals) originating from the peroxidation of liver microsomal lipids: biological effects and evidence for their binding to microsomal protein, in CCl₄ or Br CCl₃ intoxication. Front Gastrointest Res, 8: 46-62. 1984.
- Cotran R, Kumar V, Collins T: Robbins: Patología Estructural y Funcional. Mc Graw Hill-Interamericana. Sexta edición. México. pp. 971-1037. 1999.
- Crookes MJ, Read SD, Willis B: Environmental hazard assessment: carbon tetrachloride. Vol. 21. Pp. 57. Toxic Substances Division. Department of the environment. London. 1994.
- Dai Y, Cederbaum A: Inactivation and degradation of human cytochrome P450 2E1 by CCl₄ in a transfected Hep G2 cell line. J Pharmacol Exp Ther, 275: 1614-1622. 1995.
- DeFeudis FV: Bilobalide and Neuroprotection. Pharmacol Res. 46: 565-568. 2002.
- DeFeudis F, Drieu K: *Ginkgo biloba* extract (Egb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. Curr Drug Targets. 1: 25-58. 2000.
- Dianzani MU: Lipid peroxidation and haloalkylation: two distinct mechanisms for carbon tetrachloride-induced liver damage. Int Congr Ser Excerpta Med, 632: 39-50. 1984.
- Díaz M, de Castro CR, D' Acosta N, de Fenos OM, de Ferreira EC, Castro JA: Species differences in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: the role of CCl₄ activation and of lipid peroxidation. Toxicol. Appl Pharmacol, 34: 102-114. 1975.
- Dreisbach RH, Robertson W: Manual de Toxicología Clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Manual Moderno. Sexta edición. México. pp. 136-138. 1999.
- Eaton DC, Pooler JP: Fisiología renal de Vander. En: Serie Lange de Fisiología. McGraw-Hill Interamericana. Sexta edición. México. pág. 214. 2004.
- Ebbing D: Química General. Quinta edición. Editorial McGraw Hill. México D.F. pp. 1024-1025. 1996.

- El-Sharkawy AM, Abdel-Rahman SZ, Hassan AA, Gabr MH, El-Zoghby SM, El-Sewedy SM: Biochemical effects of some insecticidas on the metabolic enzymes regulating glutathione metabolism. Bull Environ Contam Toxicol, 52: 505-510. 1994.
- EPA: Environmental Protection Agency (www.epa.gov).
- Erickson MD: Acquisition and chemical analysis of mother's milk for selected toxic substances. Gov Rep Announc Index US, 81: 5096. 1981.
- Erlejmán AG, Verstraeten SV, Fraga CG, Oteiza PI: The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. Free Radic Res, 38 (12): 1311-1320. 2004.
- Esteller PA, Cordero SM: Fundamentos de Fisiopatología. McGraw-Hill - Interamericana. España. pp. 295-311. 2001.
- Fang YZ, Yang S, Wu G: Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition, 18: 872-879. 2002.
- Flores G, Battle D: Biología molecular de los mecanismos de acidificación urinaria: implicaciones para el diagnóstico de la acidosis tubular renal. En: Nefrología. Vol. XVII. Núm. 3. 1997.
- Fűr J: Eine einfache colorimetrische methode zur inulinbestimmung fuer Nieren-Clearance untersuchungen bei stoffwechselgesunden und diabetikern. Klin Wschr, 33: 729-730. 1995.
- Glenn S, Jay GA: General Principles of Toxicology. In K. D. Curtis, A.O., Mary, and M. Doull (Eds.). Toxicology The Basic Science of poisons. USA. Editorial Mc Millan Publishing Company. 1986.
- Glossman H, Neville DM: γ -Glutamyltransferase in kidney brush border membranas. FEBS Letts, 19 (4): 340-344. 1972.
- Gohil K, Packer L: Global gene expression analysis identifies cell and tissue specific actions of *Ginkgo biloba* extract, Egb 761. Cell Mol Biol, 48: 625-631. 2002.
- Griffith OW: Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis . Free Radic Biol Med, 27: 922-935. 1999.
- Griffith OW, Meister A: Glutathione: Interorgan translocation, turnover and metabolism. Proc Nat Acad Sci, 76: 5606-5610. 1979.

- Gruebele A, Zawaski K, Kaplan D, and Novak RF: Cytochrome P450 2E1-and cytochrome P450 2B1/2B2-catalysed carbon tetrachloride metabolism. *Drug Metab Dispos*, 24: 15-22. 1996.
- Guoyao W: Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, 134(3):489-92. 2004.
- Guyton A, Hall J: *Tratado de Fisiología Médica*. Interamericana-Mc Graw Hill. Novena edición. México. pp 450-457. 1997.
- Harris RN, Anders MW: Effect of fasting, diethyl meleate, and alcohols on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 56: 191-198. 1980.
- He L, Cai Y, Chen ZH, Jiang JM, Wang NS: Alteration of renal hemodynamic in adriamycin-induced nephrosis rats administered with Wulingsan. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 31(16): 1358-1360, 2006.
- Hernando A, Aljama P, Arias M, Caramelo C, Lamas S: *Nefrología Clínica*. Ed. Panamericana. Segunda edición. pp 762 pp. 1997.
- Hinson AJ, Roberts WD: Role of covalent and noncovalent interactions in cell toxicity: Effects on proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 32: 471-510. 1992.
- Holloway JC, Phifer T, Henderson R, Welbourne TC: Renal acid-base metabolism after ischemia. *Kidney Int.*, 29: 989-994. 1986.
- Iantomasi T, Marraccini P, Favilli F, Vincenzini M, Ferreti P, Tonelli F: Glutathione metabolismo in Crohn's Disease. *Biochem Med Metab Biol*, 53: 87-91. 1994.
- IPCS: International Programme on Chemical Safety. *Enviromental Health Criteria 208*. Carbon tetrachloride. World Health Organization. Geneva. pp. 6, 7, 16-18, 36-42. 1999.
- Jakobson I, Wahlberg JE, Holmberg B, Johansson G: Uptake via the blood and elimination of 10 organic solvents following epicutaneous exposure of anesthetized guinea pigs. *Toxicol Appl Pharmacol*, 63: 181-187. 1982.
- Jaramillo F, Mello M, Malnic G: Urinary and proximal tubule acidification during reduction of renal blood flow in the rat. *H Physiol*, 421: 475-483. 1990.
- Jaramillo F, Rodríguez M, Reyes J: *Toxicología Renal*, Cap 10. En *Toxicología Básica*. Textos Universitarios (UAA), Ciencias Biomédicas. pp 137-166. 2006.

- Jaramillo F, Rodríguez M, Rincón A, Martínez M, Ortiz G, Llamas J, Posadas F, Reyes J: Acute renal failure induced by carbon tetrachloride in rats with hepatic cirrhosis. *Ann Hepatol.* 7(4): 331-338, 2008.
- Jaramillo F, Rincón AR, Rico R: Fundamentos de la Toxicología Ambiental. En: *Toxicología Ambiental.* pp 15-31. 2009.
- Kim HJ, Bruckner JV, Dallas CE, Gallo JM: Effect of dosing vehicles on the pharmacokinetics of orally administered carbon tetrachloride in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 102: 50-60. 1990.
- Klaassen, Curtis y Watkins. *Manual de Toxicología.* Quinta edición. Mc Graw Hill-Interamericana editores. México. pp. 14-15. 2001.
- Klaassen C, Amdur M, Doull J: *Toxicology, The Basic Science of Poisons.* Mc Millan Publishing Company. Seventh edition. USA. pp. 64-67, 319. 2008.
- Kleijnen J, Knipschild P: *Ginkgo biloba* for cerebral insufficiency. *Br J Clin Pharmacol*, 34(4): 352-358. 1992.
- Kluwe WM: Renal function tests as indicators of kidney injury in subacute toxicity studies. *Toxicol Appl Pharmacol*, 57: 414-424. 1981.
- Koppele JM, Mulder GJ: Stereoselective glutathione conjugation by subcellular fractions and purified glutathione-S-transferases. *Drug Metab Dispos*, 23: 331-354. 1991.
- Kotakadi V, Jin Y, Hofseth A, Ying L, Cui X, Volate S, Chumanevich A, Wood P, Price R, McNeal A, Singh U, Singh N, Nagarkatti M, Nagarkatti P, Matesic L, Auclair K, Wargovich J, Hofseth L: *Ginkgo biloba* extract EGb 761 has anti-inflammatory properties and ameliorates colitis in mice by driving effector T cell apoptosis. *Carcinogenesis*. 29: 1799-1806. 2008.
- Kubic VL, Anders MW: Metabolism of carbon tetrachloride to phosgene. *Life Sci*, 26: 2151-2155. 1980.
- Lu SC: Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul*, 36: 95-116. 2000.
- Malnic G, Jaramillo F: Regulación del equilibrio ácido-básico. En: *Fisiología, Células, Órganos y sistemas.* Eds. Muñoz J y García X. Fondo de Cultura Económica. vol. VI. pp 159-192. 1998.
- Maxwell RJ: Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 49: 345-361. 1995.

- McCay PB, Lai EK, Poyer JL, DuBose CM, and Janzen EG: Oxygen-and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. Observations of lipid radicals *in vivo* and *in vitro*. J Biol Chem, 259: 2135-2143. 1984.
- McGregor D, Lang M: Carbon tetrachloride: genetic effects and other modes of action. Mutat Res, 366: 181-195. 1996.
- Meister A: New aspects of glutathione biochemistry and transport: Selective alteration of glutathione metabolism. Fed Proc, 43: 3031-3042. 1984.
- Mundel P, Reiser J: Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte. In: Kidney International. 2009.
- Navarro JF, Milena FJ, Mora C, Leon C, Claverie F, Flores C, Garcia J: Tumor necrosis factor-alpha gene expression in diabetic nephropathy: relationship with urinary albumin excretion and effect of angiotensin-converting enzyme inhibition. Kidney Int Suppl, 99: S98-102. 2005.
- Neldner K: Complementary and alternative medicine. Dermatol Clin, 18: 189-193. 2000.
- Niesink R, de Vries J, Hollinger M: Toxicology Principles and Applications. CRC Press Boca Ratón. USA. pp. 17, 294-300, 708, 1087-1089, 1092-1098, 1141. 1996.
- Olsen S, Solex K: Acute tubular necrosis and toxic renal injury. In Tisher C.C. Brenner B. M. Eds. Renal Pathology with Clinical and Functional Correlations. Second edition. Philadelphia: JB. Lipincott. pp. 769-809. 1994.
- Oster JR, Pérez GO: Acid-base homeostasis and pathophysiology in liver disease. In: The kidney in Liver Disease. Third edition, (M. Epstein, ed), W. W. Baltimore, pp 119-129. 1988.
- Oraumbo IF, Van Duuren BL: Evidence for the covalent interactions of carbon tetrachloride with mouse liver chromatin DNA *in vivo*. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 9: 13-18. 1989.
- Orłowski M, Meister A: γ -Glutamyl-p-nitroanilide-a new convenient substrate for determination of the L-and-D γ -glutamyltranspeptidase activities. Biochim Biophys Acta, 73: 679-681. 1963.

- Oster JR, Pérez GO: Acid-base homeostasis and pathophysiology in liver disease. In: The Kidney in Liver Disease. M. Epstein ed. Third edition. W. W. Baltimore. pp 119-129. 1988.
- Oteiza PI, Erlejman AG, Verstraeten SV, Keen CL, Fraga CG: Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface? Clin Dev Immunol, 12 (1): 19-25. 2005.
- Packer JE, Slater TF, Willson RL: Reactions of the carbon tetrachloride-related peroxy free radical ($\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$) with amino acids: Pulse radiolysis evidence. Life Sci, 23: 2617-2620. 1978.
- Page DA, Carlson GP: The role of the intestinal tract in the elimination of carbon tetrachloride. Toxicol Appl Pharmacol, 124: 268-274. 1994.
- Pascal HE, Smeets R, Van Aubel A, Wouterse J, Van Den H, Frans GM: Contribution of Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2/ABCC2) to the Renal Excretion of *p*-aminohippurate (PAH) and Identification of MRP4 (ABCC4) as a Novel PAH Transporter. J Am Soc Nephrol, 15: 2828–2835, 2004.
- Paustenbach DJ, Christian JE, Carlson GP, Bom GS: The effect of an 11.5 hr/ day exposure schedule on the distribution and toxicity of inhaled carbon tetrachloride in the rat. Fundam Appl Toxicol, 6: 472-483. 1986.
- 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.
- Pitts RF: Fisiología del Riñón y Líquidos Corporales. Interamericana. Tercera edición. Cap 9. pp. 144-162. 1976.
- Plaa GL: Toxic Responses of the liver. In Toxicology The Basic Science of Poisons. Cassaret and Doull's, Mc Graw-Hill. Book Co. Fifth edition. Chapter 10. pp. 286-305. 1995.
- Pohl LR, Schulick RD, Highet RJ, George JW: Reductive-oxygenation mechanism of metabolism of carbon tetrachloride to phosgene by cytochrome P-450. Mol Pharmacol, 25: 318-321. 1984.

- Pribylova P, Kotsch K, Lodererova A, Viklicky O, Vitko S, Volk HD, Lacha J: TGF-beta1 mRNA upregulation influences chronic renal allograft dysfunction *Kidney Int*, 69 (10): 1872-1879. 2006.
- Racusen LC: Structural correlates of renal electrolyte alterations in acute renal failure. *Miner Electrolyte Metab*, 17: 72-88. 1999.
- Raucy JL, Kraner JC, Lasker JM: Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502-E1. *Crit Rev Toxicol*, 23: 1-20. 1993.
- Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H: Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.*, 13: 155-168. 1999.
- Reed JD: Glutathione-Toxicological Implications. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol*, 30: 603-631. 1990.
- Repetto M: *Toxicología Fundamental*. Editorial Científico-Médica. Primera edición España. pp. 30, 138, 154. 1981.
- Reynolds ES, Treinen RJ, Farrish HH, Treinen MM: Metabolism of [¹⁴C] carbon tetrachloride to exhaled excreted and bound metabolites. *Biochem Pharmacol*, 33: 3363-3374. 1984.
- Rincón AR, Covarrubias A, Pedraza-Chaverrí J, Poo JL., Armendáriz-Borunda J, Panduro A: Differential effect of CCl₄ on renal function in cirrhotic and non-cirrhotic rats. *Exp Toxic Pathol*, 51: 199-205. 1999.
- 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.
- Rubinstein D, Kanics L: The conversion of carbon tetrachloride and chloroform to carbon dioxide by rat liver homogenates. *Can J Biochem*, 42: 1577-1585. 1964.
- Sahu SC, Washington MC: Quercetin induced lipid peroxidation and DNA damage in isolated rat-liver nuclei. *Cancer Lett*, 58: 75-79. 1991.
- Salazar A, Delgado V, Armendariz J: Differential gene expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute and chronic liver injury. *Hepatol Res*, 16: 181-194. 1999.

- Sanzgiri UY, Kim HJ, Muralidhara S, Edallas E, Bruckner JV: Effect of route and pattern of exposure on the pharmacokinetics and acute hepatotoxicity of carbon tetrachloride. *Tox Appl Pharmacol*, 134: 148-154. 1995.
- Schnerman J, Stowe N, Yarimizu S, Magnusson M, Tingwald G: Feedback control of glomerular filtration rate in isolated blood-perfused dog kidneys. *Am J Physiol*, 233: F217. 1977.
- Schulman JD, Groodman SJ, Mace JM, Patrick AD, Tietze F, Butler EJ: Glutathionuria: Inborn error of metabolism due to tissue deficiency of gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochem Biophys Res Commun*, 65: 68-74. 1975.
- Shah H, Hartman SP, Weinhouse S: Formation of carbonyl chloride in carbon tetrachloride metabolism by rat liver *in vitro*. *Cancer Res*, 39: 3942-3947. 1979.
- Shertzer HG, Reitman FA, Tabol MW: Influence of diet on the expression of hepatotoxicity from carbon tetrachloride in IRC mice. *Drug-Nutr Interact.*, 5: 275-282. 1988.
- Siller F: Toxicología Hepática. Cap 11. En *Toxicología Básica. Textos Universitarios (UAA), Ciencias Biomédicas*. pp 117-136. 2006.
- Smith JV, Luo Y: Elevation of oxidative free radicals 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 of *Ginkgo biloba* extract. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64: 465-472. 2004.
- Soriano E: Los Metabolitos de las plantas y las células cancerosas. I: Los flavonoides, 22 (4): 191-197. 2003.
- Teschke R, Vierke W, Goldermann L: Carbon tetrachloride (CCl₄) levels and serum activities of liver enzymes following acute CCl₄ intoxication. *Toxicol Lett*, 17: 175-180. 1983.
- Tierney DJ, Haas AL, and Koop DR: Degradation of cytochrome P450 2E1: selective loss after labilization of the enzyme. *Arch Biochem Biophys*, 293: 9-16. 1992.
- Trinder P: Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem*, 6:24. 1969.

- 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.
- Van Os CH, Deen PT: Role of aquaporins in renal water Harding: physiology and pathophysiology. *Nephrol Dialysis Transp*, 13: 1645-1651. 1998.
- Veng-Pedersen P, Paustenbach DJ, Carlson GP, Suarez L: A linear systems approach to analysing the pharmacokinetics of carbon tetrachloride in the rat following repeated exposures of 8 and 11.5 h/ day. *Arch Toxicol*, 60: 355-364. 1987.
- Villarruel MC, de Toranzo EG, Castro JA: Carbon tetrachloride activation, lipid peroxidation and the mixed function oxygenase activity of varios rat tissues. *Toxicol Appl Pharmacol*, 41: 337-344. 1977.
- Wahlberg JE, Boman A: Comparative percutaneous toxicity of ten industrial solvents in the guinea pig. *Scand J Work Environ Health*, 5: 345-351. 1979.
- Watanabe A, Shiota T, Takei N, Fujiwara M, Nagashima H: Blood to brain transfer of carbon tetrachloride and lipoperoxidation in rat brain. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 51: 137-140. 1986.
- Weerdenbag HJ, Van Beek TA: *Ginkgo biloba*. Volumen 3. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp 51–66. 1997.
- Yan Z, Jie Y, Yi L, Xiao T, Mei M, Peng L, Ping A, Shi L, Hong Y: Effects of *Ginkgo biloba* Extract on Inflammatory Mediators (SOD, MDA, TNF- α , NF- κ Bp65, IL-6) in TNBS-Induced Colitis in Rats. *Mediat Inflamm*. 2006: 1-9. 2006.
- Zimmermann 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.
- www.atlasbiol/anatomiahumana/ADAM (accesado en noviembre del 2009).