

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES**  
**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS: ÁREA EN TOXICOLOGÍA**

**TESIS**

**ESTUDIO DE LA TOXICIDAD HEPÁTICA Y RENAL DEL  
GLIFOSATO-EFECTO DE LA QUERCETINA**

Que para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias en el área de toxicología**

Presenta

**BQ. Rosa Emilia Torrescano Ochoa**

**ASESORES:**

Dr. Fernando Jaramillo Juárez  
Dra. María Consolación Martínez Saldaña  
Dr. José Luis Reyes Sánchez

Aguascalientes, Aguascalientes.

Abril 2009

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

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

De mi mayor consideración:

Por este conducto, me permito comunicarle que el trabajo de tesis "*Estudio de la toxicidad renal y hepática del glifosato-Efecto de la quercetina*" realizado por la LBQ Rosa Emilia Torrescano Ochoa, estudiante de la Séptima Generación del programa de Maestría en Ciencias-Área Toxicología, ha sido revisado y corregido por los miembros de su Comité Tutoral, quienes están de acuerdo con su contenido. Por ello, y para dar cumplimiento a lo establecido en el Artículo 162 (Fracciones I, II y III) y Artículo 175 (Fracciones I y II) del Reglamento General de Docencia de la UAA, mucho he de agradecerle autorizar a la persona antes citada inicie los trámites administrativos para que se le fije fecha de examen de grado.

Aprovecho este conducto para saludarlo cordialmente.

ATENTAMENTE  
Aguascalientes, Ags., a 8 de Abril del 2009.  
"SE LUMEN PROFERRE"

  
DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ  
Secretario Técnico-Maestría en Ciencias

c.c.p.- Archivo,

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios, por permitirme llegar hasta este punto en la vida.

De forma muy especial, agradezco al Doctor Fernando Jaramillo por compartir su sabiduría y darme la confianza de realizar y ampliar este proyecto.

A los Doctores María Consolación Saldaña y Francisco Posadas por su apoyo, sabiduría, amistad y consejos, que ahora forman parte de mi educación profesional.

A Licha por todo el apoyo, amistad, tiempo, compañía, confianza, enseñanza y consejos, que han sido parte importante de esta etapa en mi vida.

Al Doctor José Luis Reyes por sus consejos y recomendaciones.

A mis compañeras, Cristy y Esther, que desde el primer día en la Maestría hemos recorrido este camino juntas, apoyándonos y aligerando preocupaciones y penas; por aquellos momentos entre los cuales tuvimos razones para reír, sufrir y ayudarnos.

Agradezco infinitamente a los Doctores, Químicos, Técnicos y todas las personas que con su valioso aporte, hicieron posible la realización de este trabajo.

## DEDICATORIAS

A mi Mamá por su invaluable amor, apoyo, soporte, inteligencia y sabios consejos, que me han ayudado a salir adelante y crecer. Por dejarme volar tan alto y lejos como me ha sido posible. Le agradezco por haberse levantado de la tristeza y sobrevivir por mi y mi hermana, por haber reconstruido su corazón para llenarlo de sus hijas.

A mi Papá que con su amor, gran apoyo, confianza y sabiduría, me ha ayudado a llegar tan lejos, me ha enseñado que un padre ama tan intensamente a sus hijos aunque no esté en casa.

A mi hermana, por su cariño, comprensión y amistad, por cuidar de mí cuando lo necesité.

A todas esas personas tan especiales que han formado parte de mi desarrollo profesional y personal.

## RESUMEN

Los plaguicidas son sustancias utilizadas a nivel mundial para destruir las plagas o mitigar sus efectos nocivos. El uso continuo e inadecuado de los plaguicidas ocasiona daños a corto y largo plazo, en la salud de la población expuesta, contamina el ambiente (agua y suelos) y las cadenas alimentarias (Henaó y Corey, 1991). Los programas de monitoreo han demostrado la presencia general de los plaguicidas en el ambiente (Gilliom, 2001). La exposición del humano, principalmente a través de las cadenas alimentarias, es difícil de ser evitada y puede tener un impacto negativo en la salud.

Investigaciones recientes han mostrado que el herbicida glifosato, uno de los plaguicidas aplicados con frecuencia a nivel mundial, induce cambios en el estado antioxidante de las células disminuyendo su contenido de glutatión (Géhin *et al.*, 2006). El glifosato (N-fosfonometilglicina) es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, utilizado para eliminar cultivos ilegales, malezas indeseables en ambientes agrícolas y forestales. Inhibe la ruta del ácido shikímico, importante en la biosíntesis de aminoácidos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Debido a que esta ruta metabólica no existe en los mamíferos, originalmente se consideró que la toxicidad aguda del glifosato era baja (Baylis, 2000). Sin embargo, en años recientes se han publicado trabajos que demuestran la toxicidad de este herbicida en animales de experimentación. Con relación a la toxicidad aguda, Benedetti y colaboradores (2004) reportan que la administración oral de glifosato a ratas Wistar, aumenta la actividad sérica de la transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y de la transaminasa glutámico oxalacética (TGO), lo que indica daño a los hepatocitos. Respecto a la toxicidad crónica, se ha encontrado que la administración de glifosato técnico a ratones retrasa el crecimiento, genera hipertrofia o necrosis de hepatocitos, así como hiperplasia del epitelio de la vejiga (WHO, 1994).

Por lo tanto, la exposición ocupacional o ambiental al glifosato puede causar daños a la salud de los seres humanos, afectando al hígado y a los riñones. Dado que estos órganos participan de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal, al ser afectados aparecen alteraciones fisiopatológicas serias que disminuyen la calidad de vida o conducen a la muerte. El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos tóxicos producidos por el glifosato sobre el hígado y los riñones de animales de

experimentación, así como la capacidad de la quercetina para disminuir y/o revertir los efectos nocivos causados por este herbicida.

Para ello, ratas Wistar machos (200-250 g) fueron divididas en cuatro lotes (n=10/lote): C) Control, Q) Quercetina (25 mg/Kg/día, cada tercer día, 30 días, ip), G) Tratados con Glifosato (25 mg/Kg/día, durante 30 días, sc), GQ) Tratados con glifosato (25 mg/Kg/día, durante 30 días, sc) y quercetina (25 mg/Kg/día, cada tercer día, durante 30 días, ip) . A los 10, 20 y 30 días de tratamiento se obtuvieron muestras de orina (24 h, jaulas metabólicas) y muestras de sangre de arteria caudal realizando las pruebas programadas para estos fluidos. Posteriormente, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de hígado y riñón para cuantificar las concentraciones de glutatión reducido (GSH) y de ATP, así como realizar el estudio histológico de ambos tejidos. Los resultados obtenidos fueron analizados con las pruebas de ANOVA y de Tukey-Kramer.

*Daño renal por glifosato-efecto quercetina:* Con relación al valor medio del grupo control, se observan disminuciones del volumen urinario, siendo estadísticamente significativas para el grupo Q a los 30 días de tratamiento, para el grupo G a los 20 y 30 días de tratamiento y, para el grupo GQ, a los 10 y 30 días de tratamiento. En los periodos 10 y 20 de tratamiento, la concentración plasmática de creatinina disminuyó de manera estadísticamente significativa para el grupo Q y para el grupo G se observó un incremento significativo. En cuanto a la masa excretada de sodio, se observan incrementos estadísticamente significativos para el grupo GQ a los 10 días de tratamiento y para el grupo Q a los 20 días. La concentración urinaria de glucosa aumentó significativamente a los 10 días de tratamiento para el grupo G, siendo mayor a los 20 días. La concentración urinaria de fosfatos disminuyó significativamente en los tres periodos de muestreo para el grupo G, y para el grupo GQ la disminución significativa se observa a los 30 días. La concentración de GSH disminuyó significativamente para los grupos Q y GQ, sin embargo, para el grupo G se observa un incremento significativo. La concentración de ATP disminuyó para los tres grupos, siendo altamente significativa la disminución para los grupos Q y G. La concentración de MDA incrementó significativamente para el grupo G, siendo mayor el incremento para el grupo GQ. En cuanto a la histología, el grupo Q muestra células tubulares con intensa vacuolización, de igual forma para el grupo G además de células con epitelio

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

barrido. Para el grupo GQ se observa desprendimiento de células hacia la luz tubular y células con intensa vacuolización.

*Daño hepático por glifosato-efecto quercetina:* Respecto al valor medio del grupo control, la concentración plasmática de albúmina disminuye significativamente a los tres periodos de muestreo para los tres grupos (Q, G, GQ), excepto para el grupo GQ a los 20 días. Se observan incrementos en las actividades de las TGO y TGP durante los tres periodos de muestreo, siendo estadísticamente significativos los observados a los días 10 y 20 para el grupo GQ, tanto para TGO como para TGP. Además, el incremento a los 20 días de tratamiento para el grupo G es estadísticamente significativo para TGO. En cuanto a la concentración de GSH, se observa un incremento significativo para el grupo G y una disminución significativa para grupo GQ. La concentración de MDA incrementa significativamente para los grupos Q, G y GQ siendo altamente significativo para el grupo G. La concentración plasmática de MDA muestra incrementos estadísticamente significativos para los grupos Q, G y GQ. Los tiempos de protrombina incrementan para los tres grupos, siendo estadísticamente significativo para el grupo G. En cuanto a la histología el grupo Q muestra algunas células con incremento en acidofilia citoplásmica y algunas de estas células con cambios nucleares. Para el grupo G se observa daño en los hepatocitos por necrosis, así como zonas con infiltrado inflamatorio. En el grupo GQ se observan algunos hepatocitos necróticos.

Bajo nuestras condiciones experimentales, el glifosato produce toxicidad renal debido a las alteraciones en los parámetros bioquímicos. Esto último puede estar relacionado con alteraciones hemodinámicas y en la reabsorción tubular de tales solutos. La disminución de la concentración de ATP en los riñones, puede relacionarse con el desacople de la fosforilación oxidativa producida por el glifosato. Los incrementos en las concentraciones de MDA se relacionan con daño renal por estrés oxidativo. Produce toxicidad hepática debido a los incrementos en las actividades séricas de TGO y TGP. Esto se relaciona con un proceso de necrosis de células hepáticas. Los incrementos en las concentraciones de MDA y en los TP, indican un daño por estrés oxidativo y bioquímico, respectivamente, a nivel hepático.

El efecto protector de la quercetina puede apreciarse, a nivel hepático, por no presentarse incrementos significativos en la concentración de MDA y en el TP. Sin

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

embargo, se presenta una disminución significativa de la concentración de GSH, similar a lo observado por Choi *et al* (2003) y a Boots *et al* (2007).



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



**ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. PLAGUICIDAS: ASPECTOS GENERALES.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. PROBLEMÁTICA DE LA EXPOSICIÓN A LOS PLAGUICIDAS.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. DAÑOS A LA SALUD POR LA EXPOSICIÓN A LOS PLAGUICIDAS.....</b>	<b>2</b>
<b>1.4. HOMEOSTASIS CORPORAL.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4.1. HÍGADO.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4.2. RIÑONES.....</b>	<b>4</b>
<b>1.5. DESTOXIFICACIÓN DE LOS XENOBIÓTICOS.....</b>	<b>5</b>
<b>1.6. COAGULACIÓN SANGUÍNEA.....</b>	<b>8</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. GLIFOSATO: GENERALIDADES.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.2. USOS.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.3. DEGRADACIÓN Y PERSISTENCIA EN EL AMBIENTE.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.4. MECANISMO DE ACCIÓN HERBICIDA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2. ASPECTOS TOXICOCINÉTICOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3. ASPECTOS TOXICODINÁMICOS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4. ESTRÉS OXIDATIVO: ASPECTOS GENERALES.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5. PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES POR XENOBIÓTICOS..</b>	<b>24</b>
<b>2.5.1. REACTIVIDAD DE LOS RADICALES LIBRES.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5.1.1. LÍPIDOS.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5.1.2. PROTEÍNAS.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5.1.3. ÁCIDOS NUCLÉICOS.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5.1.4. CARBOHIDRATOS.....</b>	<b>29</b>
<b>2.6. ESTRÉS OXIDATIVO POR GLIFOSATO.....</b>	<b>29</b>

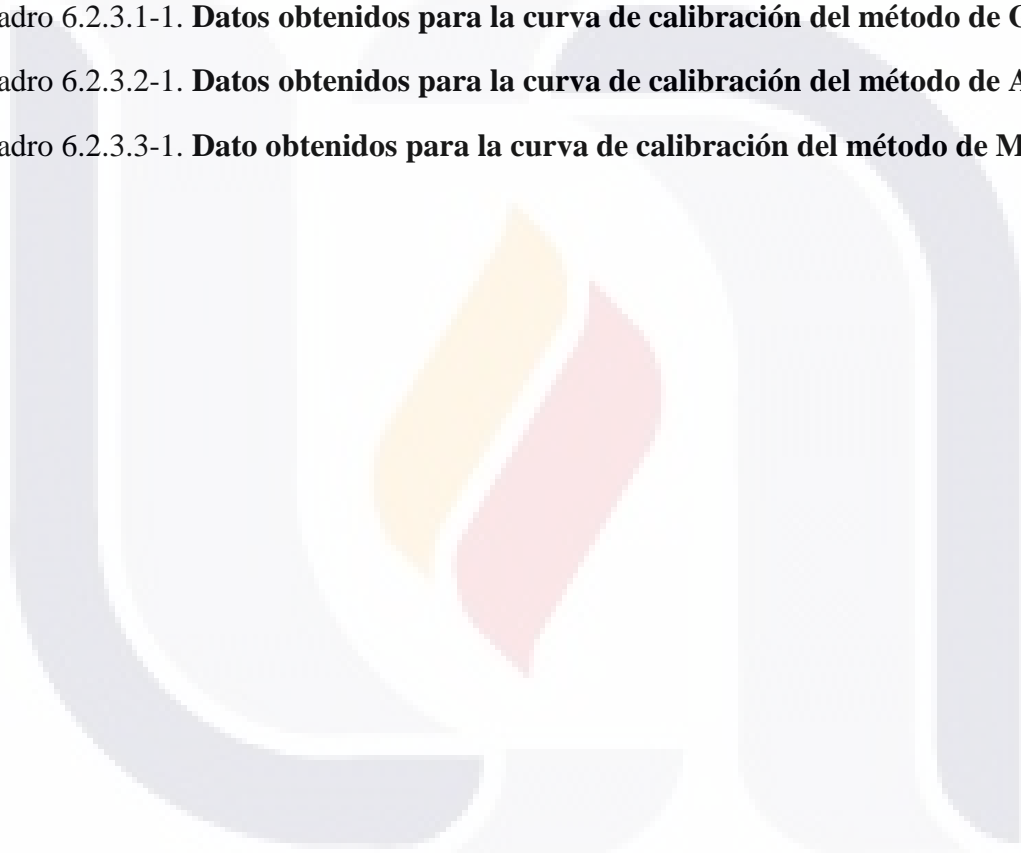
<b>2.7. MECANISMOS ANTIOXIDANTES DE LAS CÉLULAS.....</b>	<b>30</b>
<b>2.8. QUERCETINA.....</b>	<b>32</b>
<b>2.8.1. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS.....</b>	<b>36</b>
<b>2.8.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....</b>	<b>36</b>
<b>2.8.3. EFECTOS ADVERSOS: PROOXIDANTES.....</b>	<b>38</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>41</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1. GENERAL.....</b>	<b>41</b>
<b>5.2. ESPECÍFICOS.....</b>	<b>41</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>43</b>
<b>6.2. MÉTODOS. TRATAMIENTO DE MUESTRAS.....</b>	<b>44</b>
<b>6.2.1. PRUEBAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA.....</b>	<b>44</b>
<b>6.2.1.1. ACTIVIDADES DE LAS TGP Y TGO.....</b>	<b>44</b>
<b>6.2.1.2. CUANTIFICACIÓN DE ALBÚMINA.....</b>	<b>45</b>
<b>6.2.1.3. CUANTIFICACIÓN DE TP.....</b>	<b>46</b>
<b>6.2.2. PRUEBAS DE FUNCIÓN RENAL.....</b>	<b>46</b>
<b>6.2.2.1. CUANTIFICACIÓN DE VOLUMEN URINARIO.....</b>	<b>46</b>
<b>6.2.2.2. CUANTIFICACIÓN DE CREATININA.....</b>	<b>47</b>
<b>6.2.2.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....</b>	<b>48</b>
<b>6.2.2.4. CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA.....</b>	<b>50</b>
<b>6.2.2.5. CUANTIFICACIÓN DE FOSFATOS.....</b>	<b>51</b>
<b>6.2.2.6. CUANTIFICACIÓN DE SODIO.....</b>	<b>53</b>
<b>6.2.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....</b>	<b>54</b>
<b>6.2.3.1. CUANTIFICACIÓN DE GSH.....</b>	<b>54</b>
<b>6.2.3.2. CUANTIFICACIÓN DE ATP.....</b>	<b>56</b>

<b>6.2.3.3. CUANTIFICACIÓN DE MDA.....</b>	<b>58</b>
<b>6.2.4. ESTUDIO HISTOLÓGICO.....</b>	<b>59</b>
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
<b>7.1. DAÑO RENAL POR GLIFOSATO-EFECTO QUERCETINA.....</b>	<b>60</b>
<b>7.2. DAÑO HEPÁTICO POR GLIFOSATO-EFECTO QUERCETINA.....</b>	<b>66</b>
<b>8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>79</b>



**ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro 2.4.1-1. <b>Clasificación de los radicales libres</b> .....	24
Cuadro 2.7-1. <b>Clasificación de algunos antioxidantes según su origen</b> .....	31
Cuadro 6.2.2.3-1. <b>Datos obtenidos para la curva de calibración del método de proteínas totales</b> .....	49
Cuadro 6.2.2.5-1. <b>Datos obtenidos para la curva de calibración del método de fosfatos</b>	52
Cuadro 6.2.3.1-1. <b>Datos obtenidos para la curva de calibración del método de GSH</b> .....	55
Cuadro 6.2.3.2-1. <b>Datos obtenidos para la curva de calibración del método de ATP</b> .....	57
Cuadro 6.2.3.3-1. <b>Dato obtenidos para la curva de calibración del método de MDA</b> ....	58



**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.5-1. <b>Reacciones de biotransformación.....</b>	7
Figura 1.6-1. <b>Proceso en cascada de la coagulación sanguínea.....</b>	9
Figura 2.1-1. <b>Estructura molecular del glifosato.....</b>	11
Figura 2.1.3-1. <b>Unión el glifosato a las partículas del suelo.....</b>	13
Figura 2.1.3-2. <b>Metabolitos del glifosato.....</b>	14
Figura 2.1.4-1. <b>Vía del shikimato.....</b>	15
Figura 2.1.4-2. <b>Mecanismo de inhibición de la vía del shikimato por el glifosato.....</b>	16
Figura 2.4.1-1. <b>Metabolismo del oxígeno molecular hasta el agua.....</b>	23
Figura 2.5-1. <b>Ciclo redox de xenobióticos.....</b>	25
Figura 2.5.1-1. <b>Alteraciones estructurales en la membrana celular por radicales libres</b>	26
Figura 2.5.1.1-1. <b>Reacciones de la peroxidación lipídica.....</b>	27
Figura 2.8-1. <b>Estructura básica de los flavonoides.....</b>	34
Figura 2.8-2. <b>Estructura molecular de la quercetina.....</b>	35
Figura 6.2.2.3-1. <b>Curva de calibración para el método de proteínas totales.....</b>	50
Figura 6.2.2.5-1. <b>Curva de calibración para el método de fosfatos.....</b>	53
Figura 6.2.3.1-1. <b>Curva de calibración para el método de GSH.....</b>	56
Figura 6.2.3.2-1. <b>Curva de calibración para el método de ATP.....</b>	57
Figura 6.2.3.3-1. <b>Curva de calibración para el método de MDA.....</b>	59
Figura 7.1-1. <b>Análisis de peso corporal de ratas machos Wistar expuestos a glifosato- efecto quercetina.....</b>	60
Figura 7.1-2. <b>Análisis del volumen urinario de ratas machos Wistar expuestos a glifosato-efecto de quercetina.....</b>	60
Figura 7.1-3. <b>Curso temporal del daño renal por glifosato-efecto quercetina.....</b>	61
Figura 7.1-4. <b>Manejo renal de sodio.....</b>	61
Figura 7.1-5. <b>Evolución del daño renal producido por el glifosato-efecto quercetina durante el periodo de estudio.....</b>	62
Figura 7.1-6. <b>Análisis de la concentración de fosfatos urinarios de ratas Wistar machos expuestos a glifosato-efecto quercetina.....</b>	

	62
<b>Figura 7.1-7. Análisis de la concentración de proteínas totales urinarias de ratas Wistar machos expuestos a glifosato-efecto quercetina.....</b>	63
<b>Figura 7.1-8. Concentración renal de GSH a los 30 días de tratamiento.....</b>	63
<b>Figura 7.1-9. Concentración renal de ATP a los 30 días de tratamiento.....</b>	64
<b>Figura 7.1-10. Concentración renal de MDA a los 30 días de tratamiento.....</b>	64
<b>Figura 7.1-11. Fotografías microscópicas de riñón de ratas Wistar machos los 30 días de tratamiento. H-E.400x.....</b>	65
<b>Figura 7.2-1. Análisis de la concentración hepática de albúmina de ratas Wistar machos expuestos a glifosato-efecto quercetina.....</b>	66
<b>Figura 7.2-2. Evolución de la actividad plasmática de la TGO en los cuatro grupos durante el periodo de estudio.....</b>	66
<b>Figura 7.2-3. Evolución de la actividad plasmática de la TGP en los cuatro grupos durante el periodo de estudio.....</b>	67
<b>Figura 7.2-4. Concentración hepática de GSH a los 30 días de tratamiento.....</b>	67
<b>Figura 7.2-5. Concentración hepática de ATP a los 30 días de tratamiento.....</b>	68
<b>Figura 7.2-6. Concentración hepática de MDA a los 30 días de tratamiento.....</b>	68
<b>Figura 7.2-7. Concentración plasmática de MDA a los 30 días de tratamiento.....</b>	69
<b>Figura 7.2-8. Alteraciones en los tiempos de protrombina a los 30 días de tratamiento...</b>	69
<b>Figura 7.2-9. Fotografías microscópicas de hígado de ratas Wistar machos a los 30 días de tratamiento. H-E.400x.....</b>	70

# TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. PLAGUICIDAS: ASPECTOS GENERALES

Una de las principales preocupaciones del hombre es el control de una gran cantidad de organismos cuyos aumentos en sus poblaciones causan serios problemas, tales como destrucción de cultivos, enfermedades, entre otras cosas. El control de plagas es cualquiera de toda una gama de intervenciones ambientales cuyo objetivo sea una reducción en la incidencia de las plagas de insectos, de los organismos patógenos para las plantas y las enfermedades que las causan, y las poblaciones de malas hierbas, de forma que se pueda permitir una producción máxima de alimentos de alta calidad y otros cultivos (Badii y Landeros, 2007).

Los plaguicidas han sido diseñados para matar una gran variedad de organismos indeseables para el hombre. Esta clase de productos se ha utilizado en todo el mundo para la protección de cultivos agrícolas, y en la salud pública para el control de enfermedades transmitidas por vectores u hospederos intermediarios. (Waliszewki y Pardío, 1992).

Se entiende por plaguicida cualquier sustancia o mezcla de sustancias con la cual se pretende prevenir, destruir, repeler o atenuar alguna plaga. A su vez, se entiende por plaga a cualquier organismo que interfiera con la conveniencia o bienestar del hombre u otra especie de su interés. Los plaguicidas son un grupo de sustancias con características muy diversas, entre los que se distinguen dos grandes grupos. En un grupo, sus elementos están definidos por el tipo de uso del plaguicida según el organismo sobre el que actúan, así tenemos: los insecticidas, acaricidas, fungicidas, nematocidas, rodenticidas y herbicidas. Otro grupo está determinado de acuerdo a la estructura química de las sustancias con actividad plaguicida, y se encuentran los plaguicidas organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, ácidos carboxílicos, las amidas anilinas imidas, los fenoles, compuestos inorgánicos, entre otros (Badii y Landeros, 2007).

De acuerdo a otros efectos que causan, los plaguicidas se dividen en corrosivos, irritantes, fácilmente inflamables o explosivos. En cuanto a su grado de toxicidad se aprecian de baja peligrosidad, nocivos, tóxicos y muy tóxicos. Esta clasificación se realiza atendiendo básicamente a su toxicidad aguda, expresada en dosis letal 50 (DL50) por vía oral o dérmica para la rata, o en concentración letal 50 (CL50) por vía respiratoria para la rata (Cremlyn, 1985; OMS 1982). Los plaguicidas altamente tóxicos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

contaminan el ambiente persistiendo en el suelo y posteriormente se acumulan en el hombre u otros animales. Para que los plaguicidas sean considerados como contaminantes ambientales deben tomarse en cuenta propiedades como su toxicidad, estabilidad, liposolubilidad y persistencia (Duque *et al.*, 1986).

## **1.2. PROBLEMÁTICA DE LA EXPOSICIÓN A LOS PLAGUICIDAS**

En las últimas décadas, la lucha contra las plagas que afectan a cultivos agrícolas se ha basado esencialmente en el uso masivo de plaguicidas sintéticos. Por ello, los promedios mundiales de producción y consumo de plaguicidas han venido incrementándose de manera importante desde la década de 1940 (UNEP, 1987).

Es importante mencionar que el uso de plaguicidas ha sido un factor importante en el incremento de la productividad agrícola en muchas partes del mundo. Sin embargo, el hecho de que estos productos químicos tengan un papel trascendental en el desarrollo económico mundial, no quiere decir que sean inocuos. Aún cuando se utilicen debidamente, los plaguicidas producen efectos secundarios inevitables, debido a su alta actividad biológica y en algunos casos a su persistencia en el ambiente. Su uso continuado y a gran escala puede ocasionar daños a corto y largo plazo en la salud de la población expuesta, causa problemas ambientales como la contaminación de suelos y aguas, y contaminación de las cadenas alimentarias (Henao y Corey, 1991). La seguridad que se puede tener en su uso se relaciona directamente con la toxicidad del compuesto, el grado de contaminación y el tiempo de exposición al mismo (Duque *et al.*, 1986). Lamentablemente, se conoce poco sobre los efectos adversos de estas sustancias sobre los organismos y sobre el ambiente mismo, en general, sólo se conocen parcialmente y en muchos casos son desconocidos (Jaramillo y Acevedo, 2006).

## **1.3. DAÑOS A LA SALUD POR LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS**

Dada la amplitud en el uso de los plaguicidas, el contacto por parte de las personas y animales es inevitable. Se debe subrayar que la exposición de los seres humanos a los plaguicidas, a través de las cadenas alimentarias, es difícil de ser evitada y puede tener un impacto negativo en la salud. La contaminación del hombre por los plaguicidas se presenta de forma directa o indirecta. La primera es consecuencia de la exposición de los trabajadores de las industrias que sintetizan estos compuestos o del manejo de esas sustancias por las personas que las aplican (agricultores y jardineros). La forma



indirecta resulta de la exposición de la población a los plaguicidas por diferentes circunstancias: accidentes, contaminación del medio ambiente y de los alimentos, aplicaciones indiscriminadas de plaguicidas (Almeida, 1986; Gilliom, 2001).

Los plaguicidas difieren entre sí en el modo de acción, captación por el organismo, metabolismo, eliminación y toxicidad en el hombre (López, 2005). La intoxicación por plaguicidas se produce cuando estas sustancias se introducen al organismo ya sea por vía oral, respiratoria, ocular o cutánea, alterando la homeostasis corporal de las personas. Puede ser de forma aguda, cuando se producen efectos tóxicos inmediatos tras la ingestión de dosis únicas de un plaguicida. (Badii y Landeros, 2007). Por ejemplo, la ingestión de una dosis alta de secobarbital (barbitúrico) provoca rápidamente una profunda depresión respiratoria. La muerte por intoxicación barbitúrica aguda puede tardar en aparecer de una a dos horas y, normalmente, se debe a un paro respiratorio originado por la inhibición del centro cerebral que controla la respiración (Rodríguez y Jaramillo, 2006).

La intoxicación de forma crónica, es una intoxicación muy sutil resultado de exposiciones repetidas a muy bajas dosis durante períodos prolongados de tiempo. Los efectos se manifiestan por acumulación del agente tóxico en el organismo, debido a que la cantidad eliminada es menor que la absorbida, o por cambios en la estructura del compuesto debidos al metabolismo (Badii y Landeros, 2007). En este contexto, los agentes químicos del humo del tabaco se han relacionado con el desarrollo de cáncer pulmonar, debido a las lesiones irreversibles que han causado a estos órganos tras varios años de exposición continua a dichos agentes (Rodríguez y Jaramillo, 2006).

#### **1.4. HOMEOSTASIS CORPORAL. HÍGADO Y RIÑONES**

La vida de los organismos multicelulares depende de la constancia en la composición de su medio interno. En los mamíferos, esta constancia se debe en gran parte al funcionamiento correcto del hígado y los riñones. Las funciones de estos órganos hacen posible que la composición del medio extracelular se mantenga dentro de los límites adecuados para la vida de las células. Por ello, en la medida en que se afecta la homeostasis del medio interno se limitan las posibilidades del individuo para tener una vida normal. La integridad del hígado y los riñones es esencial para el mantenimiento de la homeostasis corporal de los seres humanos (Jaramillo *et al.*, 2006).

### **1.4.1. HÍGADO**

El hígado es el órgano sólido de mayor tamaño en el humano y constituye de 2 a 5% del peso corporal del adulto. Se localiza entre el tracto intestinal y la circulación venosa sistémica, lo que facilita el desarrollo de su función principal en el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis. Debido a esta localización anatómica, el hígado recibe un abastecimiento doble de sangre: está vascularizado por la arteria hepática y recibe sangre de la vena porta proveniente del estómago y de los intestinos, la cual posteriormente ingresa a la circulación sistémica. Al ser el primer órgano que recibe los nutrientes y xenobióticos provenientes del sistema digestivo, su capacidad metabólica y biotransformadora es de vital importancia. El hígado es el responsable de la incorporación y almacenamiento posterior de aminoácidos, lípidos, vitaminas, carbohidratos; de su conversión metabólica y de la liberación final a la sangre y bilis. Este órgano funciona como filtro de la sangre removiendo de ésta, nutrientes, productos anabólicos y catabólicos, y toxinas. Además, actúa como regulador del volumen del plasma sanguíneo, de niveles de glucosa, colesterol y amonio, así como un mediador de electrolitos y del balance de agua, todo esto debido a su alta capacidad vascular (Siller, 2006).

### **1.4.2. RIÑONES**

Los riñones son los órganos más importantes para la eliminación de xenobióticos y de sus metabolitos (Reyes y Jaramillo, 2008). Los riñones están situados fuera de la cavidad peritoneal, contra la pared abdominal posterior, uno a cada lado de la columna vertebral. En un corte longitudinal, en el riñón se identifican dos regiones: la región externa llamada corteza de apariencia granular, y la región interna llamada médula compuesta de 8-18 pirámides renales, en el humano (Jaramillo *et al.*, 2006).

Los riñones reciben aproximadamente el 25% del gasto cardíaco. Estos órganos participan de manera importante en el mantenimiento de la homeostasis corporal. Algunas funciones realizadas por los riñones son regular el contenido de agua y electrolitos corporales, excretar productos de desecho derivados del metabolismo celular, participan en la regulación de la presión arterial a través del sistema renina-angiotensina, reabsorben sustancias útiles para la célula como la glucosa y los aminoácidos, participan en la regulación del equilibrio ácido-base de los líquidos

corporales, eliminan sustancias extrañas (xenobióticos) del organismo (Reyes y Jaramillo, 2008; Jaramillo *et al.*, 2006).

La unidad básica estructural y funcional de los riñones es la nefrona, la cual consiste en un aparato de filtración o glomérulo, conectado a una porción tubular larga que reabsorbe y secreta, determinando la presencia de solutos en el líquido tubular. La porción tubular ha sido dividida en diferentes segmentos para su estudio, que incluyen: túbulo contorneado proximal, asa de Henle, túbulo contorneado distal y túbulo colector. Estas divisiones se basan en la morfología de las células epiteliales de la nefrona (Jaramillo *et al.*, 2006).

Las nefronas realizan tres procesos fundamentales: la filtración glomerular, la reabsorción tubular y la secreción tubular. Estos procesos se desarrollan de manera continua y simultánea (Reyes y Jaramillo, 2008).

## **1.5. DESTOXIFICACIÓN DE LOS XENOBIÓTICOS**

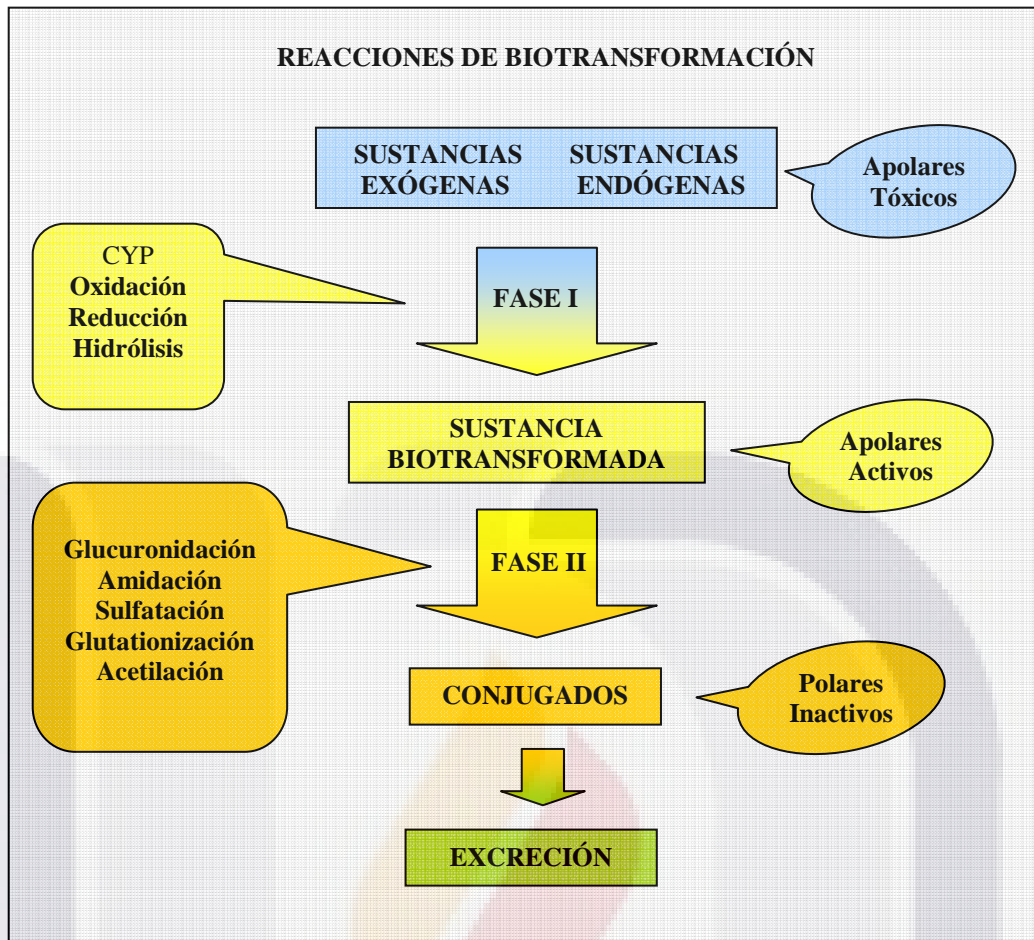
Una capacidad singular que los animales superiores y el ser humano han adquirido en el transcurso de la evolución, es la de metabolizar compuestos extraños para el organismo, para facilitar su eliminación. Estos compuestos, denominados xenobióticos, se encuentran presentes en los alimentos, en el medio ambiente, en el hogar, etc. con los que inevitablemente entramos en contacto con ellos. Suelen ser de naturaleza lipofílica, por lo que tienen una tendencia natural a acumularse en los entornos lipídicos del organismo. A diferencia de los compuestos volátiles (cuya eliminación se facilita mediante intercambio gaseoso en los pulmones) o los hidrosolubles (filtración renal), la eliminación de los compuestos lipofílicos es mucho más problemática, por lo que su acumulación en el organismo puede llegar a desencadenar fenómenos de toxicidad (Castell, 2008).

El hígado actúa como destoxicador debido a la alta tasa de biotransformación que ejerce, convierte a las sustancias hidrofóbicas en elementos hidrosolubles para así poder ser excretadas por la bilis y la orina. (Siller, 2006). Los procesos de biotransformación o destoxicación de xenobióticos, son esenciales, junto con la eliminación, para terminar los efectos tóxicos de estos compuestos. Por lo tanto, estos procesos de biotransformación se consideran como parte del mecanismo de defensa de los organismos para deshacerse de los compuestos tóxicos. Estos procesos son

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

relativamente específicos, son reacciones aceleradas por macromoléculas de las células o enzimas (Reyes y Posadas del Río, 2006).

Las reacciones de biotransformación se clasifican como de Fase I y de Fase II, como se muestra en la figura 1.5-1. Las reacciones de Fase I, que incluyen reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, disminuyen generalmente los efectos tóxicos, aunque pueden no modificarlos e incluso aumentarlos. Estas reacciones incluyen o desenmascaran algunos grupos hidrofílicos como el hidroxilo (-OH) y el amino (NH<sub>2</sub>). Las reacciones de oxidación (en presencia del oxígeno) y las de reducción (en ausencia del oxígeno), son catalizadas por el sistema del Citocromo P-450 (CYP), que se localiza en el retículo endoplásmico liso (fracción microsómica). Este sistema funciona como oxidasa de función mixta o monooxigenasa, donde las enzimas del mismo utilizan el oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) reduciendo uno de los átomos a agua (H<sub>2</sub>O) e incorporando el otro átomo al sustrato. También estas enzimas pueden catalizar, en ausencia del oxígeno, la reducción de los grupos nitro (NO<sub>2</sub>), principalmente cuando estos grupos se encuentran unidos a un anillo bencénico. Otro tipo de reducción es catalizada por la Reductasa del grupo Azo (RAzo). Las reacciones de hidrólisis son catalizadas por las Carboxiesterasas/Amidasas y también se localizan en el retículo endoplásmico liso (Reyes y Posadas del Río, 2006).



**Figura 1.5-1. Reacciones de biotransformación.** Se llevan a cabo en la destoxificación de compuestos endógenos y exógenos del organismo. Las reacciones de Fase I como las de la Fase II ocurren de manera simultánea.

Las reacciones de Fase II son de conjugación, donde el xenobiótico biotransformado se conjuga con compuestos hidrofílicos endógenos, dando como resultado aductos o conjugados más hidrofílicos que el compuesto original y que son eliminados con mayor rapidez. Los compuestos endógenos utilizados en las reacciones de conjugación son variados en su estructura química y, la mayoría, son derivados del metabolismo intermediario de la célula encontradas en el citosol. Las principales sustancias son: el ácido glucurónico, el sulfato, el glutatión, algunos aminoácidos (principalmente glicina), grupos acetilo (provenientes de la acetilCo-A) y grupos metilo (que provienen de la S-adenosilmetionina). Las reacciones de la Fase II son catalizadas por las transferasas de glucuronilo, las transferasas de glutatión, las transferasas de sulfato, las transferasas de acetilo, las transferasas de aminoácidos y las transferasas de metilo (Reyes y Posadas del Río, 2006).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Cabe mencionar que, tanto las reacciones de Fase I como las reacciones de Fase II suceden en forma simultánea. En este sentido, para algunos xenobióticos, las reacciones de Fase II pueden llevarse a cabo sin que necesariamente las preceda alguna de las reacciones de Fase I (Reyes y Posadas del Río, 2006).

## **1.6. COAGULACIÓN SANGUÍNEA**

Los animales han puesto en función mecanismos complejos para evitar la pérdida de la sangre. En el ser humano la salida de sangre se evita mediante una sucesión de reacciones químicas por las cuales se forma un coágulo sólido, con el fin de obturar la solución de continuidad.

La coagulación de la sangre comporta una cascada de activación proteolítica de proteasas específicas, que culmina con la transición de fibrinógeno a fibrina. La casada de activaciones proteolíticas puede iniciarse a partir del contacto de la sangre con superficies de tejido dañadas (vía intrínseca) o por un traumatismo interno de los vasos sanguíneos (vía extrínseca). En la vía intrínseca, las proteínas quininógeno y calicreína activan al Factor XII (Factor de Hageman), que a su vez activa al Factor XI y se produce la cascada de reacciones como se muestra en la Figura 1.6-1. La lesión de los vasos sanguíneos da lugar a la liberación del factor tisular (vía extrínseca) y a la activación del Factor VII. Las dos vías se unen en la activación del Factor X, que causara proteólisis y, por tanto, activará la protrombina (Mathews y Van Holde, 1998).

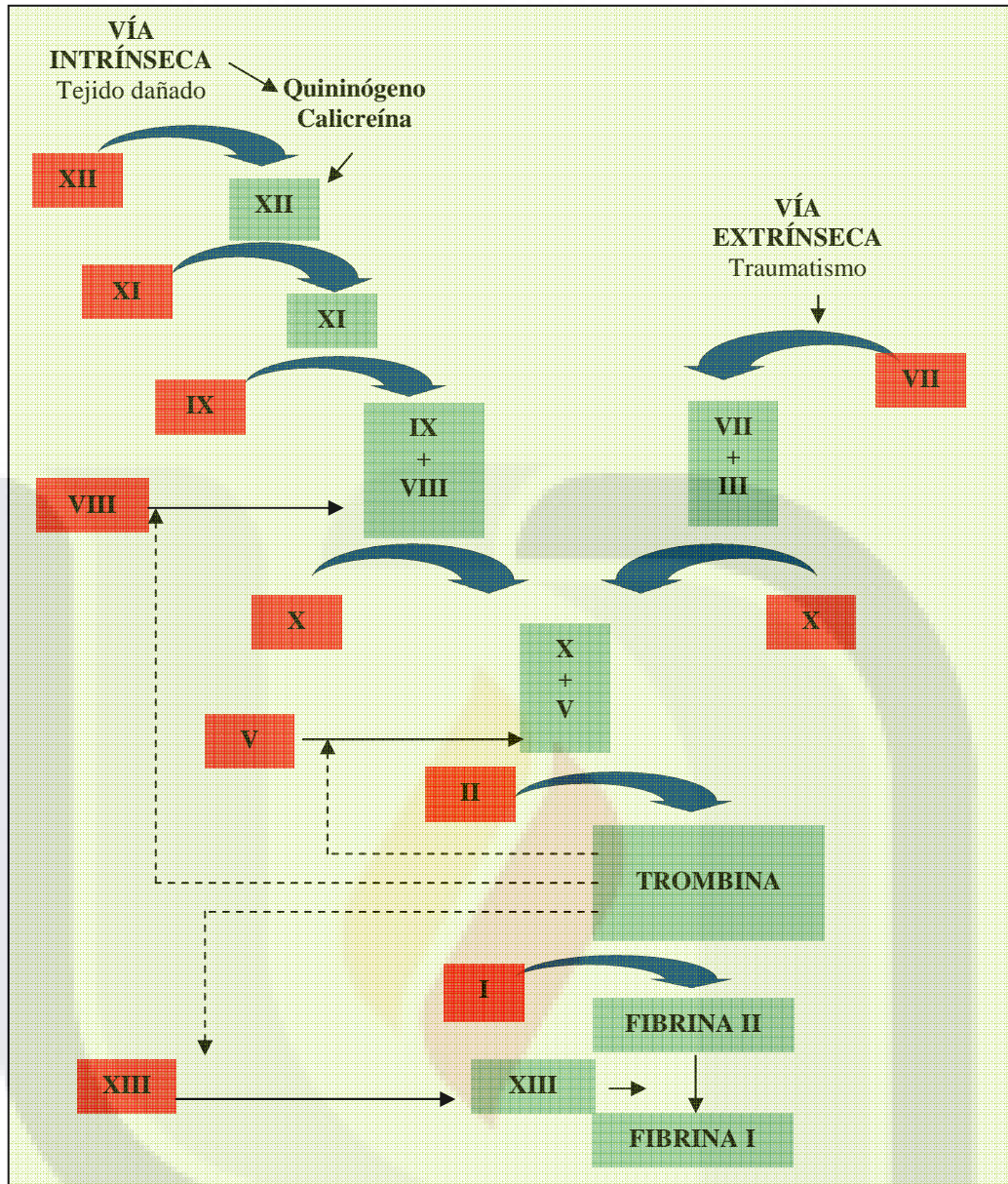


Figura 1.6-1. **Proceso en cascada de la coagulación sanguínea.** I. Fibrinógeno, II. Protrombina, III. Factor tisular (tromboplastina), V. Proacelerina, VII. Proconvertina, VIII. Factor antihemofílico A, IX. Factor de Christmas (antihemofílico B), X. Factor de Stuart-Prower, XI. Factor antecedente de tromboplastina (antihemofílico C), XII. Factor Hageman, XIII: Factor estabilizante de la fibrina. (Adaptado de Mathews y Van Holde, 1998).

## 2. ANTECEDENTES

El uso de agroquímicos como herramienta en labores agrícolas es una práctica común en el ámbito mundial que ha llevado a la contaminación de los suelos y de los cuerpos de agua. Los herbicidas constituyen un grupo muy importante de plaguicidas para este uso que, año tras año, han aumentado su volumen de uso y a la vez han sustituido el laboreo mecánico y manual en el campo. Si bien, estas sustancias químicas sintéticas son muy variadas y algunas de ellas con toxicidad muy elevada, en su gran mayoría son menos tóxicas que los insecticidas en general. El glifosato es uno de los plaguicidas más ampliamente utilizados en todo el mundo. Su uso incluye manejo agrícola, industrial, de jardinería ornamental y de manejo de malezas en las residencias (Varona *et al.*, 2006; Eslava *et al.*, 2007).

### 2.1. GLIFOSATO: GENERALIDADES

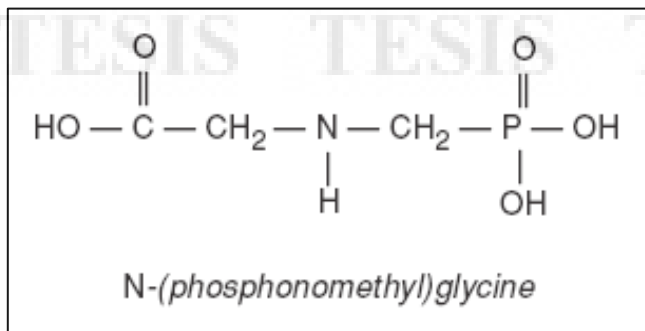
El glifosato (N-fosfometilglicina) es un plaguicida organofosforado de amplio espectro, no selectivo, de acción sistémica y de carácter ácido, con clase de toxicidad III y grupo D de oncogenicidad, por su relativa baja toxicidad aguda y por no existir indicios de carcinogenicidad en animales respectivamente, según la clasificación de la EPA-USA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos) (Martínez *et al.*, 2007; Eslava *et al.*, 2007). Es utilizado para eliminar cultivos ilegales o malezas indeseables en ambientes agrícolas y forestales. No actúa sobre las semillas que existen debajo del suelo y tampoco es absorbido por las raíces de los vegetales (Baylis, 2000). Como producto protector de cultivos, constituye uno de los descubrimientos agroquímicos más importantes de este siglo, siendo el herbicida de mayor uso en el mundo por ser efectivo, seguro y porque permite su aplicación de diversas maneras (Eslava *et al.*, 2007).

El glifosato fue introducido al mercado por la compañía Monsanto en 1971. Su patente se terminó cerca del año 1990, permitiendo que se produjera por otras compañías como Cheminova Canada y Syngenta (Takacs *et al.*, 2002).

El glifosato es una molécula formada por una fracción de glicina y un radical aminofosfato unido como sustituyente de uno de los hidrógenos del grupo amino (Figura 2.1-1).



**Figura 2.1-1.** Estructura molecular del glifosato. N-fosfonometil glicina. (Eslava *et al.*, 2007).



La toxicidad del producto ya formulado es moderada. Con relación a su toxicidad aguda está clasificado en el grupo III. La DL50 para el glifosato en grado técnico por vía oral es más de 5000 mg/kg, mientras que para las formulaciones es de 1950-2510 mg/kg. Por vía dérmica tanto para el glifosato técnico como formulaciones, la DL50 es mayor a 2000 mg/kg. Cuando es administrado por vía intraperitoneal la toxicidad del glifosato incrementa. Para dicha vía, la DL50 en ratas y ratones es de 134-740 mg/kg. Por vía inhalatoria para ratas la CL50 para el Roundup<sup>R</sup> es de 3180 mg/m<sup>3</sup> (Burger y Fernández, 2004; WHO/FAO, 1996).

Dentro de los síntomas de envenenamiento por glifosato se encuentran las irritaciones dérmicas y oculares, náuseas, mareos, descenso de la presión sanguínea, reacciones alérgicas, dolor gastrointestinal, pérdida masiva de líquido gastrointestinal, vómito, acumulación de fluido en los pulmones, congestión o disfunción pulmonar, neumonía, pérdida de la conciencia, destrucción de glóbulos rojos y daño renal (Cox, 1995).

### 2.1.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

El glifosato es un ácido orgánico débil formado por una molécula de glicina y otra de fosfometilo. Su nombre químico es N-fosfometil glicina con peso molecular (PM) de 167.09. Su fórmula empírica es C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub>P. La forma técnica es la sal de isopropilamina (sal de N-fosfometil glicina isopropilamina, PM= 226.16). La pureza del glifosato de calidad técnica suele ser superior a 90%. Es un polvo cristalino blanco e inodoro con un peso específico de 1,704. Es altamente soluble en agua con un coeficiente de partición octanol/agua de -3.2 a 25°C, presente en estado iónico en solución, no tiene volatilización significativa (Burger y Fernández, 2004; Solomon *et al.*, 2005; Eslava *et al.*, 2007).

El número del ácido en el Chemical Abstracts Registry (CAS) es el 114370-14-8 y para la sal de isopropilamina es el 1071-83-6 (Solomon *et al.*, 2005).

### **2.1.2. USOS**

El glifosato es uno de los plaguicidas más ampliamente utilizados en todo el mundo. Su uso incluye manejo agrícola, industrial, de jardinería ornamental y de manejo de malezas en las residencias. En la agricultura, el uso de glifosato se está incrementando y su uso en los cultivos de ciertas plantas es probablemente mayor desde la introducción de cultivos resistentes al glifosato. Otros usos en agricultura para los productos a base de glifosato incluyen su uso por agricultores como una etapa rutinaria en la preparación de los suelos antes de su siembra. Los usuarios que no pertenecen al campo de la agricultura incluyen las empresas públicas, los municipios y los departamentos regionales de transporte que usan el glifosato para el control de malezas y de otras plantas dañinas (Solomon *et al.*, 2005; Eslava *et al.*, 2007).

### **2.1.3. DEGRADACIÓN Y PERSISTENCIA EN EL AMBIENTE**

La química del glifosato es importante para determinar su destino en el ambiente. Químicamente y físicamente, el glifosato se parece mucho a sustancias que se encuentran en la naturaleza y no reacciona químicamente; no es móvil en el aire ni en los suelos; su persistencia biológica es baja y no es bioacumulable ni se biomagnifica a lo largo de la cadena alimenticia (Solomon *et al.*, 2005).

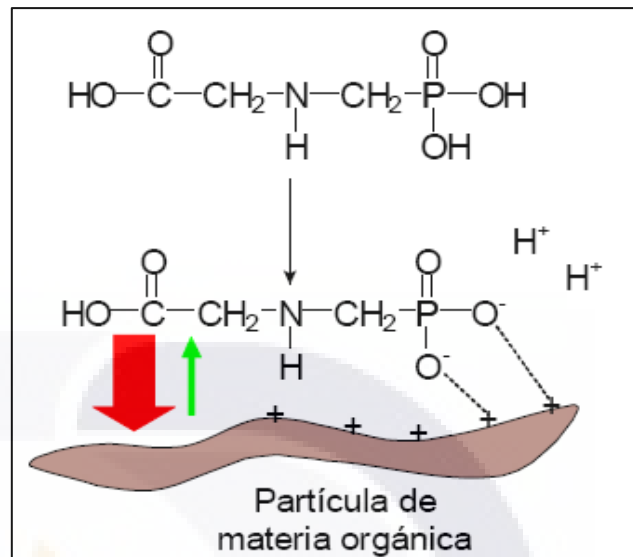
El glifosato se ioniza fácilmente y, como anión, se adsorbe fuertemente a la materia orgánica en los suelos con pH normal (Figura 2.1.3-1). Por consiguiente, posee poca movilidad en los suelos y es rápidamente removido del agua por la adsorción a los sedimentos y a las partículas de materia suspendidas (Solomon *et al.*, 2005). El glifosato puede tener una reducida movilidad en el suelo cuando coinciden condiciones de pH alto y presencia de fosfatos no orgánicos, en cantidades grandes (Eslava *et al.*, 2007). La fuerte unión del glifosato con el suelo origina una pérdida casi inmediata de la actividad biológica; sin embargo, los residuos de la unión se descomponen rápidamente y no se presenta acumulación, aún después de muchos años de uso regular. Como resultado del uso normal de glifosato, es poco probable que se contaminen las corrientes subterráneas excepto en el caso de un derrame apreciable o de otra liberación accidental o descontrolada de cantidades considerables al ambiente (Solomon *et al.*, 2005).

Pese a lo anterior, se pueden detectar partículas de glifosato en algunos depósitos de agua arrastrados hasta ellos por procesos de escurrimientos o por partículas

provenientes de áreas cercanas tratadas con este herbicida para controlar la maleza, mediante aplicaciones terrestres o aéreas (Eslava *et al.*, 2007).

**Figura 2.1.3-1. Unión del glifosato a las partículas del suelo.** El glifosato como anión, se adsorbe fuertemente a la materia orgánica en los suelos con pH normal. Su adsorción de correlaciona con la cantidad de sitios ligadores de fosfato disponibles, y parece ocurrir por ligado de la fracción del ácido fosfónico.

(Solomon *et al.*, 2005).



En el suelo, el glifosato parece ser degradado por los microorganismos a través de dos vías (Figura 2.1.3-2):

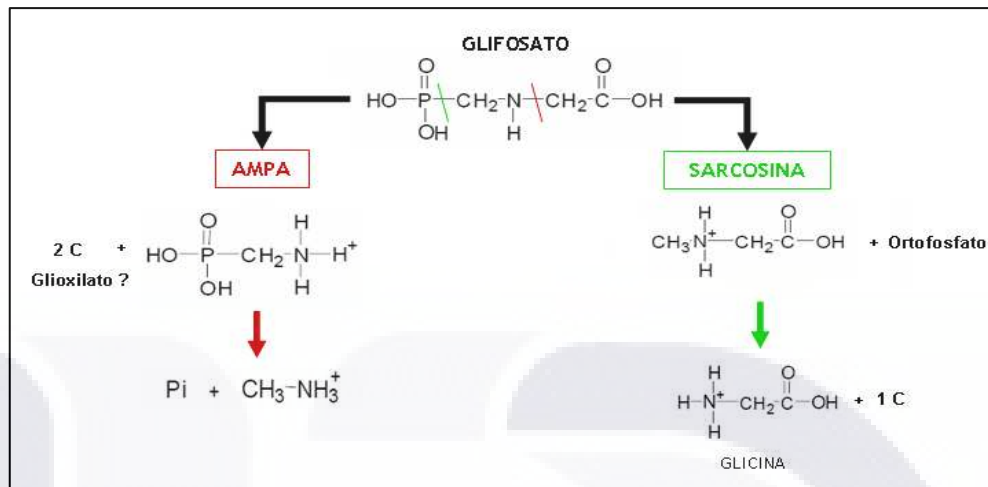
1) Vía formación de ácido aminometilfosfónico (AMPA) y un fragmento C2, probablemente glioxilato. En esta ruta, la ruptura de la unión C-N es la primera etapa.

2) Vía glicina, donde se forma la sarcosina (N-metilglicina) y otro fosfato, después la sarcosina es degradada a glicina y a una unidad de un carbono que eventualmente forme CO<sub>2</sub>, probablemente vía formaldehído. En esta ruta, la ruptura del enlace C-P es el primer paso (Jacob *et al.*, 1988).

En experimentos con <sup>14</sup>C-glifosato, los cultivos aislados de *Pseudomonas sp.*, cepa LBr, fueron capaces de degradar al glifosato por ambas rutas (Jacob *et al.*, 1988). En ambientes terrestres, el principal metabolito en la degradación del glifosato es el AMPA. El formaldehído es también un producto de descomposición del glifosato (Cox, 1995; Dinham, 1999; Williams *et al.*, 2000). El AMPA es más móvil en el suelo pero se descompone rápidamente, lo cual genera lixiviación de cantidades mínimas en los suelos destinados a la agricultura (Solomon *et al.*, 2005).

Existen investigaciones que demuestran que el glifosato es translocado a las partes de las plantas que se usan como alimento. Por ejemplo, se ha encontrado glifosato en fresas, moras azules, frambuesas, lechugas, zanahoria y cebada después de

su aplicación. Incluso se han encontrado residuos en lechugas, zanahorias y cebada, sembrados un año después de que el glifosato fue aplicado (Dinham, 1999).

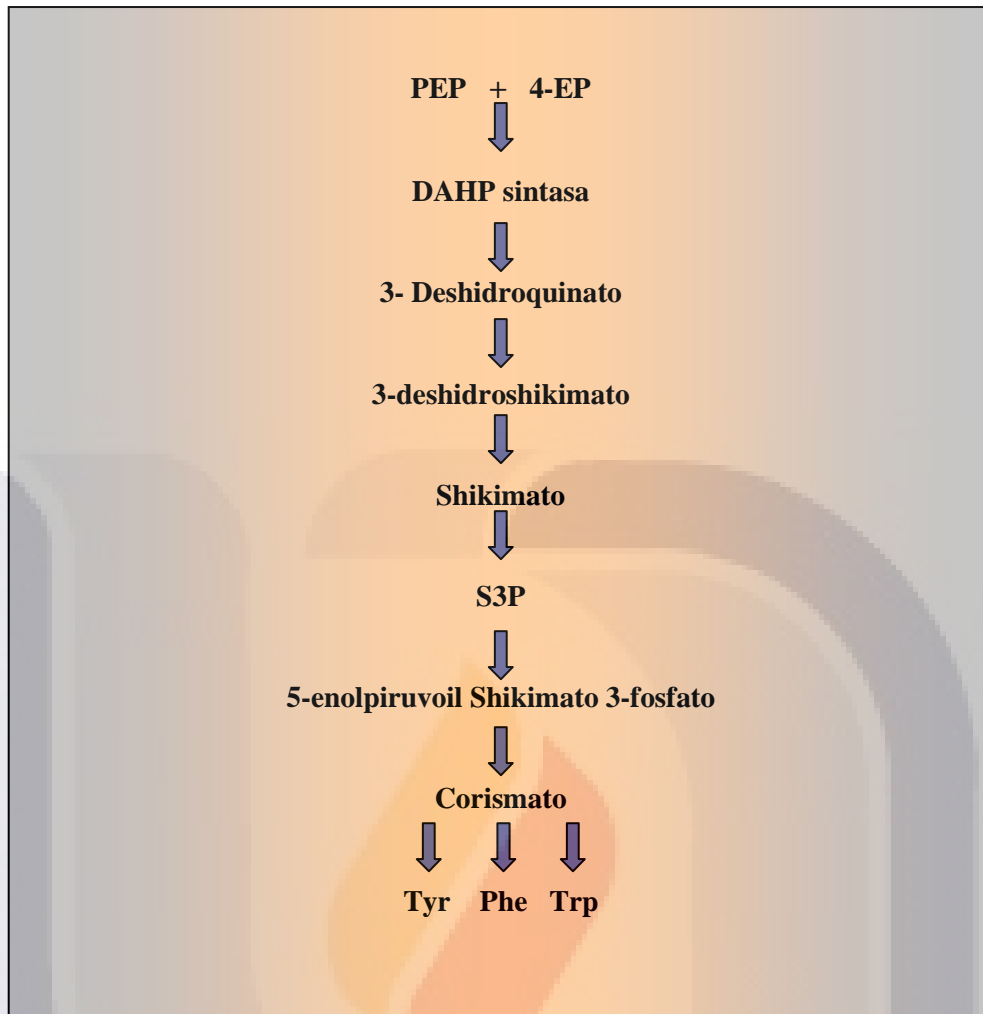


**Figura 2.1.3-2. Metabolitos del glifosato.** El principal metabolito en condiciones aerobias es el AMPA. Existe otra ruta de degradación del glifosato, vía glicina, donde se forma sarcosina, después degradada a glicina (Adaptado de Solomon *et al.*, 2005).

El glifosato no es un herbicida de acción residual prolongada y su efecto es de muy corta duración en los suelos tropicales. La molécula es biodegradada principalmente por la acción de los microorganismos del suelo. Por ser un representante de los compuestos conocidos como ácidos fosfóricos, contiene un enlace carbono-fósforo (C-P) y, aunque este enlace químicamente es muy estable, muchas bacterias, incluyendo las del grupo entérico como la *Escherichia coli*, tienen la capacidad enzimática de romper ese enlace para liberar el fosfato orgánico (Solomon *et al.*, 2005).

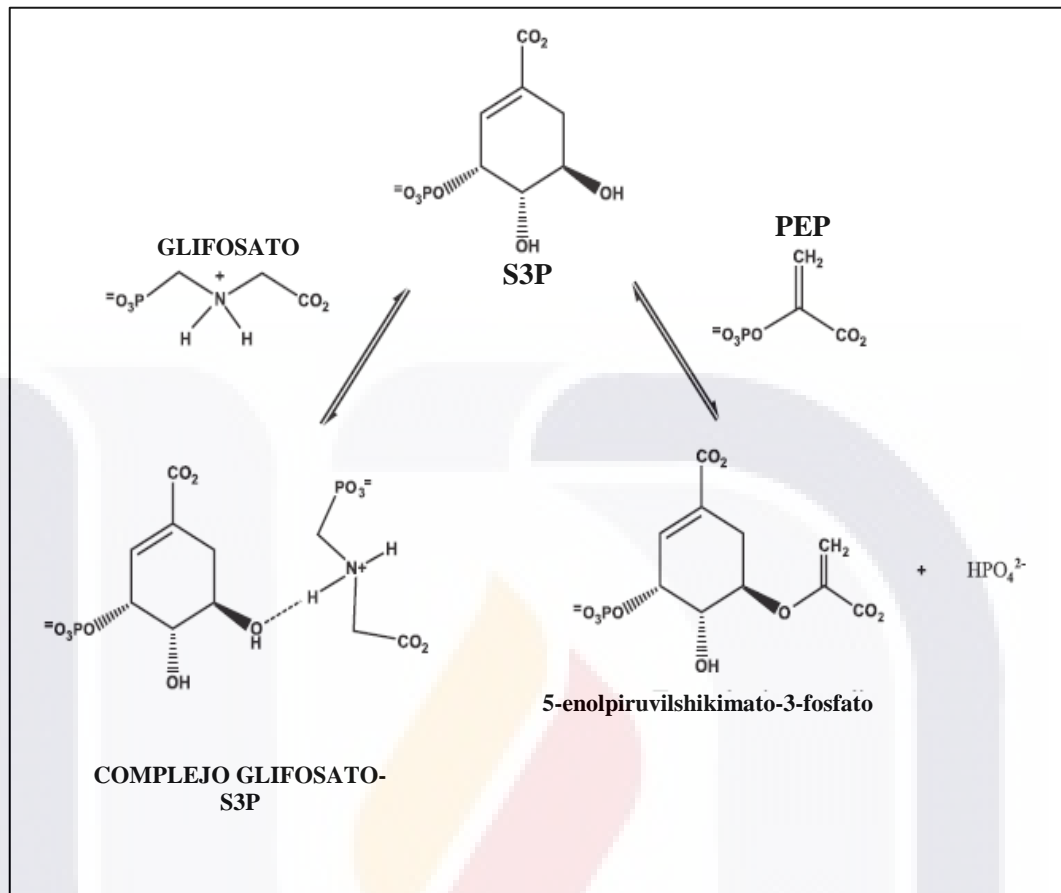
#### 2.1.4. MECANISMO DE ACCIÓN HERBICIDA

El glifosato ejerce su acción herbicida en la ruta metabólica del ácido shikímico, la cual es importante para la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, a partir de compuestos del metabolismo de los carbohidratos (Weaver y Herrmann, 1999; Eslava *et al.*, 2007). Aunque es referida como la ruta más común de síntesis de aminoácidos aromáticos, por esta vía no se sintetizan todos estos compuestos de forma natural. Esta vía está presente únicamente en las plantas, bacterias y hongos (Herrmann, 1995). En una secuencia de siete reacciones metabólicas, el fosfoenolpiruvato (PEP) y la eritrosa-4-fosfato (4-EP) son convertidos a corismato, precursor de los tres aminoácidos aromáticos (Weaver y Herrmann, 1999).



**Figura 2.1.4-1. Vía del Shikimato.** PEP: fosfoenolpiruvato, 4-EP: eritrosa-4-fosfato, DAHP: 3-Desoxy-D-arabinoheptulose-7-fosfato, S3P: Shikimato-3-fosfato, Tyr: tirosina, Phe: fenilalanina, Trp: triptófano. (Adaptada de: Herrmann, 1995)

El glifosato inhibe específicamente a la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS). Actúa como un inhibidor competitivo del PEP y se combina fuertemente al complejo formado por la enzima EPSPS con el shikimato-3-fosfato (EPSPS-S3P). Sin embargo, al igual que el PEP, el glifosato no presenta afinidad por la enzima aislada; es decir, el PEP o el glifosato no se combinan con EPSPS, sino al complejo que ésta forma con el S3P (Figura 2.1.4-2). Una gran diferencia entre PEP y el glifosato es que la tasa de disociación del complejo EPSPS-S3P-glifosato es 2300 veces más lenta que la tasa de disociación cuando se une el PEP. Debido a esto, una vez que el glifosato se une al complejo enzimático éste es virtualmente inactivado, por lo que no se lleva a cabo la síntesis de los aminoácidos (LCTL, 2008; Baylis, 2000; Schonbrunn *et al.*, 2001).



**Figura 2.1.4-2. Mecanismo de inhibición de la vía del shikimato por el glifosato.** El glifosato inhibe a la enzima EPSPS por su unión al S3P, lo cual reduce la producción de aminoácidos aromáticos esenciales en la planta, consecuentemente reduce la producción de proteínas inhibiendo de este modo el crecimiento de la misma (Adaptada de Eslava *et al.*, 2007)

## 2.2. ASPECTOS TOXICOCINÉTICOS

Los estudios realizados sobre la toxicocinética del glifosato concuerdan en que la absorción y el metabolismo de este compuesto son escasos, por lo que se elimina en su mayoría sin cambios en su estructura (Brewster *et al.*, 1991; Chan y Mehler, 1992; Baylis, 2000; Williams *et al.*, 2000; Uribe, 2001; Burger y Fernández, 2004). Al respecto, Brewster y colaboradores (1991) describieron que cuando se administra glifosato a una dosis oral única de 10 mg/kg a las ratas, la retención tisular del glifosato es relativamente débil y corta, el principal producto que se encuentra en los tejidos es el glifosato no modificado; además, es poco metabolizado, aunque identificaron un metabolito con tiempo de retención semejante al del AMPA.

Por otra parte, en estudios realizados en ratas machos (F344) se encontró que, luego de la administración oral de  $^{14}\text{C}$ -glifosato (5.6 o 56 mg/Kg) la radioactividad derivada de este herbicida se localizó en la sangre, orina y heces (Chan y Mehler, 1992). Además, después de administrar dosis repetidas en roedores (1-100 mg/Kg/día, durante 14 días), se observó una eliminación urinaria aproximada al 10% y una excreción fecal del 80%, en su mayoría sin metabolizar (Baylis, 2000).

Williams y colaboradores (2000) señalan que entre el 15% y el 36% del glifosato ingerido se absorbe a través del tracto intestinal y solamente el 2% por la piel. El glifosato no absorbido se excreta por las heces, pero el glifosato absorbido se excreta por la orina y solamente con una pequeña cantidad de metabolitos. En ratas, el tiempo de vida media es bifásico, con una vida media inicial de 6 horas y una terminal de 79 a 337 horas. La depuración en la mayoría de los tejidos fue rápida. Claramente, el glifosato no se bioacumula y cualquier dosis que se haya absorbido se excreta en la orina en forma relativamente rápida.

Después de administrar una dosis única de 10 mg/kg en ratas se determinó la distribución tisular del glifosato encontrando niveles mayores del 1% en intestino delgado, colon, riñón y hueso. La máxima concentración en intestino delgado se observó a las dos horas, el pico de concentración en otros órganos fue a las 6 horas. Los niveles declinaron rápidamente, encontrando que el hueso fue el órgano con eliminación más lenta, al parecer por una unión reversible del ácido fosfónico con el calcio de la matriz ósea. A las 168 horas después de la administración la eliminación fue del 100%. En este contexto, la administración de dosis únicas de  $^{14}\text{C}$ -glifosato mostraron una eliminación del 94% al 98% en machos y 82% a 84% en hembras a las 48 horas, para una eliminación del 99% a las 120 horas en ambos sexos (Uribe, 2001).

La penetración dérmica de glifosato es muy baja según estudios realizados en monos Rhesus y estudios *in vitro* con muestras de piel humana. Después de aplicar glifosato no diluido en monos, la absorción fue de 0,4% a las 24 horas y 1,8% a los siete días. Al aplicar glifosato diluido (1:29) en monos la absorción fue de 0,8% para una dosis de  $500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  y 2,2% para una dosis de  $5400 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Los estudios con piel humana reportaron una absorción menor al 2% empleando el producto concentrado y diluido (Uribe, 2001).

En animales de experimentación, los estudios toxicocinéticos del glifosato muestran una absorción de 30% a 36% a nivel del tubo digestivo y una escasa absorción

por vía cutánea. Una vez absorbido, el herbicida se distribuye ampliamente en todo el organismo y la concentración más alta (1% de la dosis oral) fue encontrada en los huesos. De la cantidad absorbida, 15% a 29% se excreta por la orina, 2% por el aire espirado y 70% restante por las heces. Como ya se señaló es poco metabolizado ya que el 97% de la dosis oral se elimina sin cambiar y su único metabolito es el AMPA. Tiene una vida media de aproximadamente dos días. El tiempo necesario para la biodegradación de 50% del glifosato en los suelos es de dos a tres días en condiciones aeróbicas (Burger y Fernández, 2004).

### **2.3. ASPECTOS TOXICODINÁMICOS**

Dado que la ruta metabólica sobre la que actúa el glifosato no existe en los mamíferos, originalmente se consideró que la toxicidad aguda de este herbicida era baja. En efecto, su toxicidad aguda en ratas es muy baja por vía oral y dérmica, con una DL50= 5000 mg/Kg. La exposición ocupacional (dérmica e inhalatoria) puede ser mayor que en casos de ingestión (Williams *et al.*, 2000).

En los humanos, se han presentado diversos efectos tóxicos derivados de la exposición accidental o deliberada a los herbicidas que contienen glifosato. Al respecto, en Taiwán, en 131 sujetos intoxicados con glifosato se presentaron: leucocitosis, bicarbonato sérico bajo, acidosis y varias complicaciones graves como dificultades respiratorias, edema pulmonar, choque, alteraciones de la conciencia y falla renal. Con relación a la exposición crónica, existe preocupación por los efectos adversos potenciales ya que los humanos y los animales pueden entrar en contacto con el glifosato (y los aditivos presentes en las formulaciones comerciales) a través de las prácticas rutinarias en la agricultura, la cadena alimenticia o el consumo de aguas contaminadas (Martínez *et al.*, 2007).

Aunque existen reportes de que este plaguicida es poco tóxico para los mamíferos, en el hombre y en los animales el glifosato puede desacoplar la fosforilación oxidativa (Nunkes *et al.*, 1991; WHO, 1993, 1994). Al respecto, esta acción nociva ha sido encontrada en las mitocondrias hepáticas (Olorunsogo *et al.*, 1980; Burger y Fernández, 2004). Además, se ha descrito que el glifosato: a) afecta el ciclo y la transcripción de las células (Marc *et al.*, 2004a; Marc *et al.*, 2005b), b) es un compuesto tóxico para las células de la placenta humana, en las cuales afecta la actividad de la aromatasas (enzima que participa en la síntesis de estrógenos) interactuando con su sitio



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

activo (Richard *et al.*, 2005), c) daña otros sistemas enzimáticos ya que en las ratas, disminuye la actividad del citocromo P-450 y de la aril-hidrocarbono-hidroxilasa (Cox 1995), d) aumenta la actividad de la ATPasa y e) en ratas Wistar (500 mg/Kg, 4 primeros días, luego 300 mg/Kg, durante dos semanas, oral) disminuye la concentración hepática de citocromo P-450 (Hietanen *et al.*, 1983).

Ahora bien, la toxicidad del glifosato técnico administrado por vía intraperitoneal parece mas importante que la observada por vía oral. Según los datos disponibles acerca de la toxicidad aguda por vía cutánea, el producto técnico y la formulación de Roundup<sup>MD</sup> son considerados como muy poco tóxicos y ligeramente tóxicos, respectivamente. El glifosato técnico no produjo irritación en la piel de los conejos pero pudieron observarse irritaciones que iban desde moderadas a severas en el conejillo de indias, después de aplicaciones repetidas. Además, luego de un estudio de exposición por inhalación a la fórmula comercial (12,2 mg/L, durante 4 horas) ninguna de las ratas falleció y tampoco se observó ninguna reacción anormal. Estos resultados indican que la CL50 sería superior a 12,2 mg/L. En el humano, no se observó ninguna irritación primaria luego de la aplicación cutánea única o repetida de glifosato (Onil, 2001).

Por otra parte, en estudios de toxicidad subcrónica, Chan y Mahler (1992) reportaron que la administración de glifosato a ratas machos F344 durante 13 semanas (0, 3125, 6250, 12500, 25000 o 50000 ppm, en el alimento) incrementó la concentración plasmática de ácidos biliares y las actividades de la fosfatasa alcalina y de la transaminasa glutámico pirúvica (TGP). Estas observaciones fueron corroboradas por Benedetti y colaboradores (2004) quienes encontraron que la administración oral de glifosato a ratas Wistar (4.87, 48.7 o 487 mg/Kg, cada 2 días, durante 75 días) aumentó la actividad sérica de la TGP y de la TGO, lo que indica necrosis de los hepatocitos.

En este contexto, en un estudio de toxicidad subcrónica por inhalación, las ratas fueron expuestas 6h/día, 5días/semana durante 22 días a concentraciones de 0, 0.05, 0.16 o 0.36 mg/L de una solución acuosa de Roundup<sup>MD</sup> (33%). Terminado el estudio, no se observaron signos de toxicidad, aunque el examen microscópico mostró áreas de irritación a nivel de los pulmones (infiltración), de la nariz (inflamación) y de la tráquea (Onil, 2001). En la rata la administración de AMPA a dosis de 400 a 4800 mg/kg/día, durante 90 días, provocó irritación de las vías urinarias (dosis de 1200 y 4800 mg/kg/día). Un NOAEL de 400 mg/kg/día fue determinado para este estudio. En el

perro no se observó ningún efecto a la dosis más alta de 263 mg/kg/día (Williams *et al.*, 2000).

En estudios de toxicidad crónica, se ha encontrado que la administración de glifosato técnico a ratones (30,000 mg/Kg, en el alimento) retrasa el crecimiento, genera hipertrofia, necrosis de hepatocitos, así como hiperplasia del epitelio de la vejiga (WHO, 1994). Además, en perros Beagle la administración oral de glifosato (cápsulas de gelatina) a dosis de 0, 20 o 500 mg/kg/día, durante un año, produjo una ligera disminución de las concentraciones de sodio y de potasio sérico en los machos (100 y 500 mg/kg) y en las hembras este fenómeno pudo observarse durante el tercer mes (500 mg/kg); la disminución aparente de los pesos absolutos y relativos de las glándulas pituitarias también se observó a dos de las dosis más altas, pero estos efectos no fueron correlacionados con ningún efecto histopatológico. Según Salud y Bienestar Social de Canadá (SBSC), una degeneración de los túbulos renales, cuyo significado clínico es discutible, pudo observarse en todos los grupos. Este organismo precisa que un aumento de la incidencia de nódulos linfoides en el epidídimo fue observado a la dosis de 500 mg/kg/día (Onil, 2001). Por otra parte, el glifosato técnico demostró ser negativo luego de muchas pruebas de mutación génica *in vitro*, de modificaciones cromosómicas *in vitro* y de daños al ADN (*in vivo* e *in vitro*) (Williams *et al.*, 2000; WHO, 1994).

No se ha determinado la dosis letal del glifosato en humanos, aunque se acepta que su toxicidad aguda es baja y se correlaciona con la toxicidad aguda en las ratas. En pacientes que ingirieron dosis de 200 y 250 ml no se presentó letalidad; sin embargo, hay reportes según los cuales una dosis de 184 mL fue fatal. Los síntomas observados en los casos de suicidio sugieren que el choque hipovolémico inducido por el efecto depresor cardiaco, secundario a altas dosis de surfactante, fue la causa de la muerte (Uribe *et al.*, 2001).

#### **2.4. ESTRÉS OXIDATIVO. ASPECTOS GENERALES**

Desde el punto de vista fisicoquímico, la oxidación consiste en la pérdida de electrones por parte de un átomo o una molécula, de manera que disminuye su carga negativa y aumenta la carga positiva. Lo contrario, es decir, en la reducción, tiene lugar la adquisición de electrones con el consiguiente aumento en la carga negativa. Por tanto, son oxidantes aquellas especies que aceptan electrones y reductoras las que los ceden.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Toda oxidación implica una reducción; si un átomo cede electrones otro los capta (López, 2005).

En las reacciones de oxidación y reducción tiene lugar una transferencia de electrones y esto conlleva a una generación de radicales libres. Estos son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado en su orbital más externo lo que les confiere la característica de ser altamente reactivos, ya que tienden a “robar” un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesitaba, la molécula estable que se lo cedió se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena (López, 2005).

Los procesos metabólicos normales producen grandes cantidades de radicales libres que pueden dañar células a través de numerosos mecanismos. La vida media de un radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas y membranas celulares. Pese a lo anterior, los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos, puesto que nuestro propio cuerpo los fabrica en cantidades moderadas por diferentes vías, entre ellas el transporte electrónico mitocondrial, la reacción de Fenton y Haber Weiss durante el proceso inflamatorio por la actividad de los macrófagos, y también por reacciones dependientes de oxígeno de diferentes enzimas (monoamino oxidasa, ciclooxigenasa y xantina oxidasa, entre otras). Otras fuentes son productos del metabolismo de fármacos y sustancias tóxicas que ocurren fundamentalmente por la actividad de la monooxigenasa, de función mixta-citocromo P-450, y por el ciclaje redox de los xenobióticos, las radiaciones ionizantes, los rayos UV, la contaminación ambiental, entre otras. Sin embargo, este mecanismo debe ser controlado y, para ello, existen también mecanismos para neutralizar a los radicales libres, existiendo un equilibrio entre los mecanismos prooxidantes (formación de radicales libres) y los mecanismos antioxidantes (neutralización de radicales libres) (Novas *et al.*, 2007; López, 2005).

Cuando se altera dicho equilibrio, las células de nuestro organismo se encuentran expuestas a un ambiente prooxidante, donde el contenido intracelular de radicales libres sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula. Es entonces, cuando se induce un daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos;

alterando la funcionalidad celular (Novas *et al.*, 2007). A esta alteración del equilibrio oxidativo celular a favor de las especies oxidantes se conoce como estrés oxidativo.

El estrés oxidativo puede originarse por dos situaciones:

a) Disminución de niveles antioxidantes debido a una ingesta deficiente en vitaminas y/o minerales, o a toxinas que causan depleción de las defensas antioxidantes. Por ejemplo, muchos xenobióticos son metabolizados mediante su conjugación con GSH, así, en altas dosis pueden disminuir los niveles de GSH y causar estrés oxidativo incluso si el xenobiótico en si mismo no es un generador de especies reactivas

b) Incremento en la producción de especies oxidantes.

Las células pueden tolerar estados de estrés oxidativo leve, sin embargo, en situaciones severas se afecta el metabolismo celular (Abilés, 2007). Por ello, el estrés oxidativo es de gran interés para los investigadores debido a que se ha encontrado que se relaciona con diferentes estados patológicos. En la actualidad, existe controversia si es la causa o consecuencia de diferentes enfermedades, y si la terapia con compuestos que presentan actividad antioxidante pudiera prevenir su progresión (Novas *et al.*, 2007).

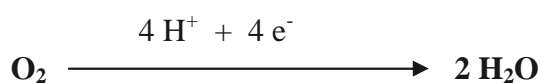
Se distinguen dos tipos de radicales libres:

I. Metabolitos Reactivos: se unen de forma covalente a sitios nucleofílicos de macromoléculas celulares.

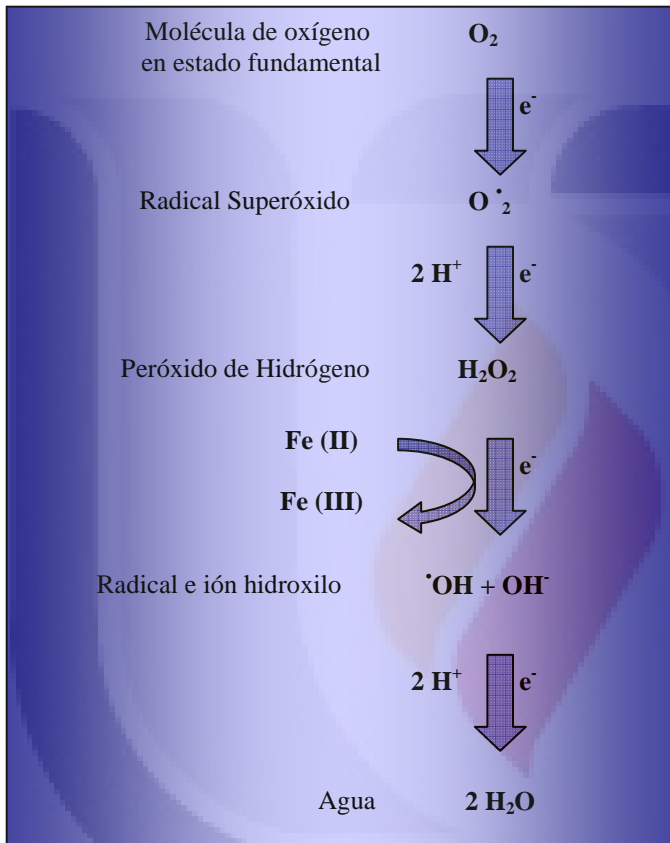
II. Especies Reactivas de Oxígeno: se unen de forma no covalente con estructuras celulares y pueden generar reacciones en cadena tipo redox (Banerjee *et al.*, 2001).

#### **2.4.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

La mayoría de los organismos vivos necesitan de oxígeno para poder vivir, ya que este elemento es utilizado por las células para oxidar compuestos orgánicos. El oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) actúa como elemento oxidante al aceptar hasta cuatro electrones en su orbital más externo (reducción tetravalente) para dar lugar a dos moléculas de agua por acción del complejo citocromo oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial:



Normalmente, el 2% del oxígeno es reducido en forma incompleta (reducción univalente, divalente o trivalente) originando compuestos intermedios inestables, el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el intermediario peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), denominadas Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) (Figura 2.4.1-1). ERO es un término global que incluye tanto especies radicales como especies no radicales (pro-radicales) (Abilés, 2007).



**Figura 2.4.1-1. Metabolismo del oxígeno molecular hasta el agua.** El  $O_2$  se metaboliza al final de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, donde los electrones ( $e^-$ ) y protones ( $H^+$ ) que han completado el proceso de transporte se acumulan. Para una reducción completa del oxígeno molecular hasta el agua, es necesario añadir  $4 e^-$  y  $4 H^+$ .

(Abilés, 2007)

De acuerdo al principal tipo de átomo del cual provienen, las ERO se clasifican en especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno. A su vez, cada una de ellas presenta varios tipos de radicales libres tal como se ilustra en el cuadro 2.4.1-1 (Gutiérrez, 2006).

ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL OXÍGENO	ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL NITRÓGENO
Superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ )	Óxido Nítrico ( $NO^{\bullet}$ )
Radical Hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ )	Dióxido de Nitrógeno ( $NO_2^{\bullet}$ )
Radical Peroxilo ( $R-O_2^{\bullet}$ )	Ácido Nitroso ( $HNO_2$ )
Radical Alcoxilo ( $RO^{\bullet}$ )	Catión Nitrosilo ( $NO^+$ )
Hidroperoxilo ( $HO_2^{\bullet}$ )	Anión Nitrosilo ( $NO^-$ )
Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ )	Tetróxido de Dinitrógeno ( $N_2O_4$ )
Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )	Trióxido de Dinitrógeno ( $N_2O_3$ )
Ácido hipobromoso ( $HOBr$ )	Peroxinitrito ( $ONOO^-$ )
Ozono ( $O_3$ )	Ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ )
Oxígeno singulete ( $^1O_2$ )	Catión nitrilo ( $NO_2^+$ )

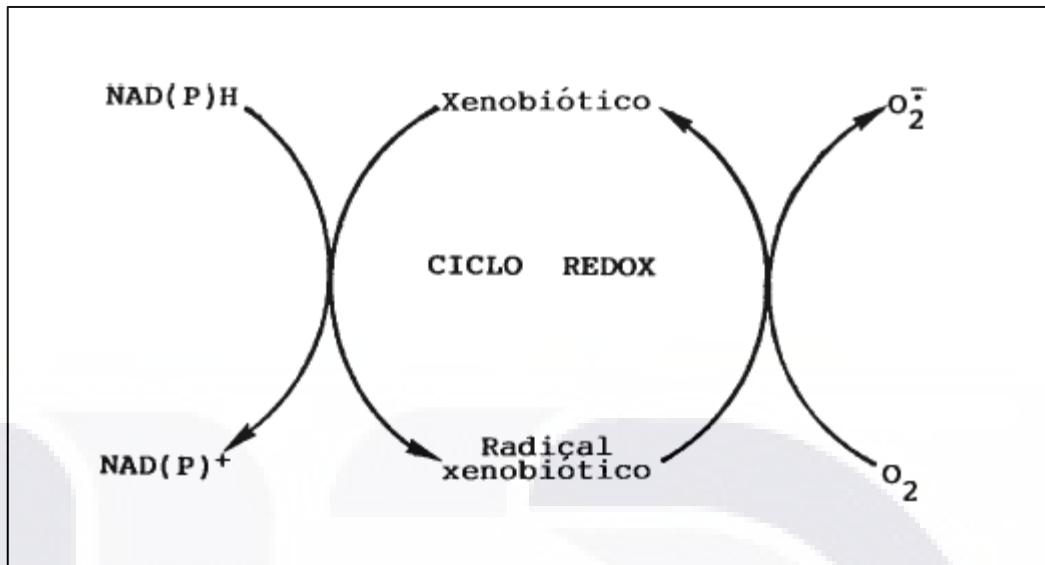
**Cuadro 2.4.1-1. Clasificación de los radicales libres.** De acuerdo al átomo principal del cual provienen. A su vez, cada especie presenta varios tipos de radicales libres y varios pro-radicales (color azul), que son sustancias que no siendo radicales libres, al contacto con otras especies químicas y/o por su alta inestabilidad química, tienen la posibilidad de convertirse o generar radicales libres (Adaptado de Gutiérrez, 2006).

Las ERO establecen enlaces no covalentes con estructuras celulares, generando reacciones en cadena tipo redox y produce la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Banerjee *et al.*, 2001).

## 2.5. PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES POR XENOBIÓTICOS

El estrés oxidativo juega un papel importante en la toxicidad de numerosos agentes químicos. Muchos de ellos, tras interactuar con diversos componentes tisulares, generan radicales libres responsables de las disfunciones observadas (López, 2005).

Para ejercer su acción tóxica, muchos compuestos químicos requieren una activación metabólica a intermediarios reactivos que pueden ser radicales libres. Dicha activación se puede realizar por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, sin embargo, la mayor parte de los compuestos se activan por una vía catalizada enzimáticamente. La formación de intermediarios (radicales libres) de muchos compuestos químicos está catalizada por la NADPH-citocromo P<sub>450</sub> reductasa, una flavoproteína que utiliza NADPH como dador electrónico. En estos casos, se establece un ciclo redox en el que hay un gran consumo de NADPH y oxígeno y generación de radicales superóxido y otras especies de oxígeno reactivo (Figura 2.5-1). Este ciclo redox conduce a una situación de estrés oxidativo y, en casos extremos, a la muerte celular (Martínez, 1998).



**Figura 2.5-1. Ciclo redox de xenobióticos.** Este ciclo redox conduce a una situación de estrés oxidativo y, en casos extremos a la muerte celular. (Martínez, 1998)

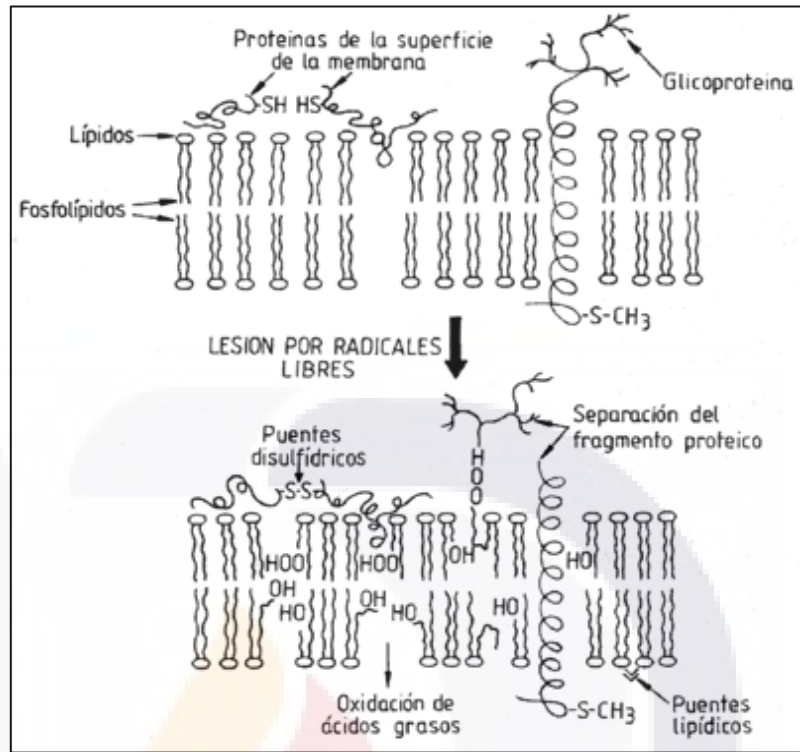
Algunos xenobióticos, como los plaguicidas, pueden ejercer su efecto por medio de ataque electrofílico sobre constituyentes celulares, proceso donde se generan ERO. Por tanto, las ERO pueden estar implicadas en la toxicidad (Banerjee *et al.*, 2001). Se ha sugerido que el mecanismo molecular implicado en la toxicidad por xenobióticos es la peroxidación lipídica. Los eritrocitos son más susceptibles al daño oxidativo por peroxidación lipídica, debido a su riqueza de ácidos grasos poliinsaturados, hierro del grupo hemo y en oxígeno, elementos todos ellos capaces de producir cambios oxidativos. Por tanto, es probable que mientras los xenobióticos son transportados por la sangre hasta el hígado, donde se van a metabolizar, produzcan daño celular a los eritrocitos (López, 2005).

### 2.5.1. REACTIVIDAD DE LOS RADICALES LIBRES

Cuando un radical libre reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros radicales libres, de manera que es posible que se generen reacciones en cadena y den lugar a efectos biológicos lejos del sistema que originó el primer radical. Los lípidos insaturados, las proteínas, los ácidos nucleicos y los carbohidratos son los blancos fundamentales de las reacciones de los radicales libres (Figura 2.5.1-1) (Martínez, 1998). A continuación, se describen los daños por radicales libres que pueden sufrir estas moléculas.

**Figura 2.5.1.-1.**

**Alteraciones estructurales en la membrana celular por radicales libres.** Los efectos principales de los radicales libres se producen en los lípidos de las membranas celulares y en los enlaces sulfhidrilos de las proteínas. En particular, dichos radicales pueden provocar peroxidación de los lípidos dentro de las membranas de la célula y organelos, con lo que se dañan las mitocondrias y retículo endoplasmático. En las proteínas pueden producirse puentes de enlaces disulfídicos. En el ácido desoxirribonucleico pueden producir mutaciones (Adaptado de Chuaqui y González).



### 2.5.1.1. LÍPIDOS

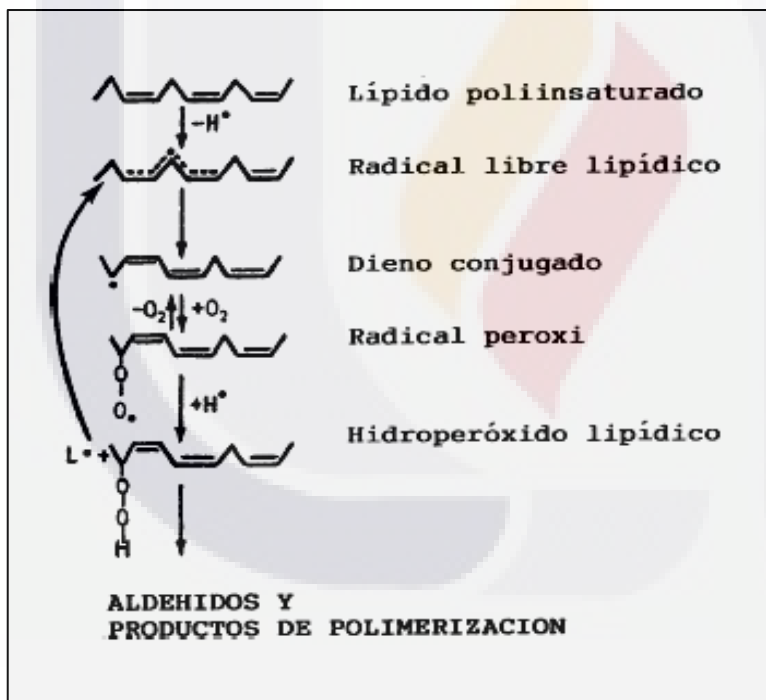
El proceso oxidativo más frecuente en el organismo es el que ocurre sobre los lípidos, debido a que los ácidos grasos poliinsaturados son más sensibles al ataque de los radicales libres (Abilés, 2007). Los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana son especialmente susceptibles puesto que contienen grupos metileno separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno. Una vez generado, el radical lipídico sufre inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose un dieno conjugado que puede reaccionar con el  $O_2$  y formar un radical hidroxiperoxilo. Este radical libre da a lugar a endoperoxidos, o bien, tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente para formar, nuevamente, un radical libre lipídico y un hidroperóxido (Ver Figura 2.5.1-1). El primero de ellos se combina con otra molécula de oxígeno y así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo. Por otra parte, el hidroperóxido, que es un compuesto estable, si entra en contacto con iones metálicos de transición, producirá más radicales libres que iniciaran y propagaran otras reacciones en cadena. De este modo, las membranas resultan



seriamente dañadas y, por tanto, su funcionalidad se ve alterada. (López, 2005; Martínez, 1998).

Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema celular e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis. Estos productos pueden también alterar la actividad fosfolipasa e inducir la liberación de ácido araquidónico y la subsecuente formación de prostaglandinas y distintos endoperóxidos (Martínez, 1998).

Productos finales de la peroxidación lipídica tales como el malondialdehído (MDA), el 4-hidroxi-nonenal (HNE) producen lesiones en las proteínas al interactuar con restos de lisina, cisteína e histidina. Estas interacciones generan entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana. Así pues, las propiedades de las membranas resultan aún más alteradas (Martínez, 1998; Abilés, 2007).



**Figura 2.5.1.1-1. Reacciones de la peroxidación lipídica.**

La secuencia de la reacción se inicia por la acción de un oxidante energético, como el radical hidroxilo, que extrae un átomo entero de hidrógeno (electrón y protón) de uno de los átomos de carbono de un ácido graso poliinsaturado. Ello crea un radical libre lipídico que luego se transforma en un radical peroxi, el cual a su vez puede extraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso adyacente e iniciar así una reacción en cadena autoalimentada, que prosigue hasta que se agote el sustrato, es decir, se agote el ácido graso o algo interfiera en la reacción de propagación. (Martínez, 1998).

La detección y cuantificación de la peroxidación lipídica ha sido muy utilizada en el estudio de la participación del estrés oxidativo en distintas patologías. Al respecto, para determinar el grado de peroxidación lipídica de un tejido se puede cuantificar el contenido de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS), así como el contenido de MDA (Abilés, 2007).

### 2.5.1.2. PROTEÍNAS

Las proteínas son modificadas de diferente manera por las ERO, ya que pueden oxidar directamente a las proteínas o bien originar derivados oxidados de tipo lipídico o glucídico, que reaccionan con los grupos funcionales de las proteínas (Abilés, 2007). Por ejemplo, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. Se ha comprobado que el hierro de la oxihemoglobina puede reaccionar con el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno para formar metahemoglobina. Otra importante hemoproteína citoplasmática, la catalasa, es inhibida por el  $O_2^{\bullet-}$ , que la convierte en sus formas inactivas ferroxí y ferrilo. Por último, el peróxido de hidrógeno, producto de la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$ , también puede reducir el  $Cu^{2+}$  de la superóxido dismutasa CuZn a  $Cu^{1+}$ , reaccionando después con él y generando radical hidroxilo. A su vez, este radical hidroxilo ataca un residuo adyacente de histidina del centro activo del enzima, necesario para la actividad catalítica (Martínez, 1998).

Una primera etapa implica la oxidación de los residuos aminoacídicos de la proteína por la acción de un sistema oxidante. Modificación que conlleva a una desaminación o descarboxilación del aminoácido proteico, además de generar fenómenos de pérdida de actividad de la proteínas por una progresiva desnaturalización, un incremento de la hidrofobicidad y/o una agregación de proteínas (Abilés, 2007).

Debido a la reactividad de los radicales libres con las moléculas que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones aminoacídicas mediadas por radicales libres. En este sentido, enzimas tales como la papaína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa e incluso la superóxido dismutasa, que dependen todas ellas de estos aminoácidos para presentar actividad, se inhiben en presencia de radicales libres. Las reacciones de los radicales libres con estos aminoácidos dan lugar también a alteraciones estructurales en las proteínas provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares. Además, los enlaces peptídicos también son susceptibles de ser atacados por los radicales libres. Estos enlaces pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o superóxido (Martínez, 1998).

Finalmente, la reacción de los radicales libres con las proteínas puede generar subproductos que amplificarían el daño inicial. Un ejemplo lo constituye la oxidación

del triptófano hasta  $H_2O_2$  y N-formil kinurenina, un compuesto que, al reaccionar con grupos amino, provoca entrecruzamientos entre proteínas y/o lípidos (Martínez, 1998).

### **2.5.1.3. ÁCIDOS NUCLÉICOS**

Los ácidos nucleicos también pueden ser atacados por los radicales libres. Realmente la citotoxicidad de estas especies químicas, en gran parte, es una consecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del DNA al reaccionar con los radicales libres. Las modificaciones químicas de los nucleótidos provocan, en muchos casos, la ruptura de las hebras del DNA. Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, se produce una mutación, o bien, la célula muere. Por ejemplo, la ruptura del DNA que ocurre durante la explosión respiratoria producida por los neutrófilos en respuesta a determinados estímulos, puede causar la muerte de estas células e inducir procesos autoinmunes (Martínez, 1998).

### **2.5.1.4. CARBOHIDRATOS**

Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical  $OH^{\bullet}$  para producir sustancias reactivas. Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándolos a unidades más sencillas (Martínez, 1998; López, 2005).

## **2.6. ESTRÉS OXIDATIVO POR GLIFOSATO**

En años recientes, se ha encontrado que el glifosato daña las células alterando el sistema antioxidante y generando estrés oxidativo. En efecto, se ha descrito que la administración oral de glifosato (1%) a ratas Wistar preñadas, aumenta la lipoperoxidación hepática de las madres y de los productos, a los 21 días de edad (Beuret *et al.*, 2005).

Por otra parte, Géhin y colaboradores (2006) reportan que el glifosato, sólo o mezclado con los ingredientes del Roundup 3 Plus<sup>®</sup>, induce cambios significativos en el equilibrio antioxidante de las células al disminuir la concentración de glutatión, así como por desórdenes enzimáticos (Catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) y un incremento en la peroxidación lipídica en células cutáneas de humano.

## 2.7. MECANISMOS ANTIOXIDANTES DE LAS CÉLULAS

Todos los sistemas biológicos han desarrollado mecanismos de defensa antioxidante tanto a nivel fisiológico como bioquímico. A nivel fisiológico destaca el sistema microvascular cuya función es mantener niveles titulares adecuados de  $O_2$ , siempre dentro de presiones parciales relativamente bajas. A nivel bioquímico están los mecanismos de defensa antioxidante (López, 2005).

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al interactuar más rápido con los radicales libres que con el resto de las moléculas presentes en un determinado microambiente (membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular). La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas (lípidos, proteínas, ADN, carbohidratos) funcionalmente vitales o más importantes. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos actuando como eliminadores (Scavengers), con el objetivo de mantener el equilibrio oxidativo celular (Venereo, 2002).

Según su origen los antioxidantes se pueden clasificar como exógenos y endógenos (Cuadro 2.7-1). Los antioxidantes exógenos son introducidos por la dieta y actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen (Venereo, 2002). Además, los antioxidantes pueden clasificarse según su modo de acción:

\*Primarios: son los que impiden la formación de radicales libres (como los quelantes de metales de transición)

\*Secundarios: interrumpen la reacción de propagación por inactivación (como el ácido ascórbico) o desplazan a las ERO (como el glutatión o carotenoides)

\*Terciarios: reparan el daño causado a las moléculas o eliminan aquellas que se han estropeado (Fitó, 2003).

De los sistemas enzimáticos, la enzima SOD convierte al radical  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$ , el cual es posteriormente metabolizado tanto por la CAT como por la GPx convirtiéndolo en agua (Abilés, 2007).

ORIGEN	ANTIOXIDANTE
EXÓGENO	Vitamina C
	Vitamina E
	Betacarotenos
	Flavonoides
	Licopenos
ENDÓGENOS ENZIMÁTICOS	Superóxido dismutasa (SOD)
	Catalasa (CAT)
	Glutación peroxidasa (GPx)
NO ENZIMÁTICOS	Glutación
	Coenzima Q

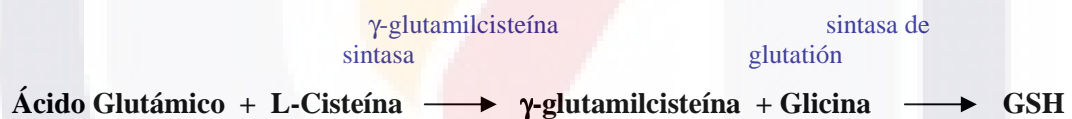
**Cuadro 2.7-1. Clasificación de algunos antioxidantes según su origen.** (Adaptado de Venereo, 2002).

La SOD es una enzima distribuida en todo el organismo. Hay dos tipos intracelulares de SOD: la que está presente en la mitocondria, que contiene manganeso en su centro activo (Mn-SOD) y la del citosol, que contiene iones de cobre y zinc (Cu-Zn-SOD). También existe la SOD extracelular. A su vez, la CAT es una enzima intracelular que se localiza en el interior de los glóbulos rojos. El equilibrio entre la actividad de la CAT respecto de SOD es fundamental para mantener el balance redox. En este contexto, la GPx es un complejo enzimático y existen cuatro formas diferentes de esta enzima, todas ellas tienen selenio en su centro activo. La GPx celular elimina al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado por la SOD, transformando el glutatión reducido (GSH) en glutatión disulfuro oxidado (GSSG). La GPx gastrointestinal es una enzima intracelular que actúa de manera similar a la anterior y podría metabolizar los hidroperóxidos absorbidos de la dieta. La GPx plasmática o extracelular, reduce hidroperóxidos libres y los esterificados en los fosfolípidos (López, 2005; Abilés, 2007).

De los sistemas no enzimáticos (endógenos o exógenos), destacan diversos compuestos biológicos con función antioxidante, unos de tipo soluble y otros liposolubles, tanto de pequeño como de gran tamaño molecular. Entre ellos se encuentran el glutatión reducido (GSH), la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina A (siendo su precursor el β-caroteno), vitamina E (tocoferol), Coenzima-Q10, ciertos ácidos grasos, polifenoles (flavonoides), fitoestrógenos (resveratrol), nitróxidos, metionina, NADPH, ADP, adenosina, taurina, metalotioneína, albúmina, transferrina, ferritina, ceruloplasmina y mioglobina, entre otras. Estas sustancias reaccionan

directamente con los radicales libres impidiendo que actúen sobre las moléculas críticas (López, 2005).

Es importante señalar que el GSH es un importante antioxidante que participa en la detoxificación de xenobióticos y sustancias endógenas en las células. Desde el punto de vista de la oxidorreducción, el GSH es capaz de ceder electrones desde su grupo sulfhidrilo (SH) a una especie oxidada (Benítez, 2006). Por ello, previene y repara el daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Deneke y Fanburg, 1989; Davis *et al.*, 2001; Pastore *et al.*, 2003). El GSH también se conoce como tiol porque su capacidad de donación de electrones está ligada a su sulfhidrilo o grupo de azufre. La habilidad de esta molécula está en donar un electrón, que hace posible su bioactividad. De hecho, funciona como un agente reductor no enzimático. El GSH es un tripéptido sintetizado en dos reacciones que dependen de ATP: 1) la formación de  $\gamma$ -glutamilcisteína, que resulta de la unión entre el ácido glutámico y la L-cisteína, reacción catalizada por la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintasa; 2) la formación del péptido GSH que resulta de la unión entre la  $\gamma$ -glutamilcisteína y la glicina, reacción catalizada por la sintasa de glutatión.



Los aminoácidos que componen al GSH deben estar disponibles para su producción o síntesis. En las células existen sistemas enzimáticos para sintetizarlo, usarlo y regenerarlo. La regeneración permite mantener concentraciones adecuadas y disponibles en todo momento. La concentración mayor de GSH se encuentra en el hígado, el cual puede enviarlo a otras áreas del cuerpo (Meister, 1988; Deneke y Fanburg, 1989).

## 2.8. QUERCETINA

Desde hace siglos, los fármacos obtenidos de los vegetales han sido utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades. Por ello, representan la fuente de importantes investigaciones farmacológicas y toxicológicas (Rodríguez y Jaramillo, 2006). Al respecto, el Ginkgo biloba (Gb), planta vascular que pertenece a la familia

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Ginkgoaceae, se ha utilizado en la medicina china tradicional para tratar el asma, la enuresis y la tos. Sin embargo, a partir de 1990, el extracto de las hojas de este árbol fue ampliamente conocido y consumido, una vez descubierta su capacidad potenciadora de la memoria (Ziemmerman *et al.*, 2002). Los efectos antioxidantes del Gb se han corroborado por la reducción de la lipoperoxidación en diferentes tejidos animales (Pietri *et al.*, 1997).

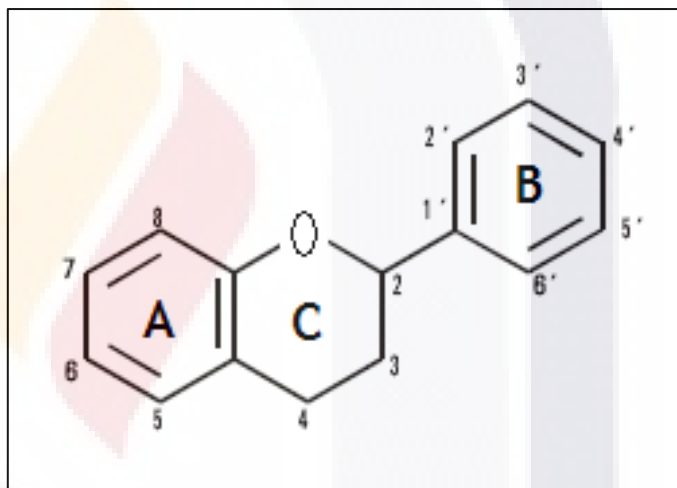
En la década de los 1950, se inició una investigación de las propiedades químicas y farmacológicas de las hojas de Gb y se estandarizó el extracto concentrado conocido como EGb 761. Los principales constituyentes del Gb son: lactosas sesquiterpénicas (bilobálide) y diterpénicas (ginkgólidos A, B, C, J y M), bioflavonas (ginkgetina, isoginkgetina y bilbobetina), flavonoides (quercetina, camferol) y pequeñas cantidades de ácido ginkgólico. Los extractos estandarizados contienen dos fracciones principales: flavonoides (24%) y de lactosas terpénicas (6%) (Jacobs y Browner, 2002). Estas dos fracciones tienen acciones farmacológicas diferentes lo que permite al extracto actuar de manera sinérgica. Los ginkgólidos contribuyen a mejorar la circulación ya que son antagonistas del factor activador de las plaquetas reduciendo así la activación y agregación plaquetaria. El compuesto bilobalide reduce el edema cerebral y zonas infartadas de la región cortical en ciertos tipos de apoplejía, reduciendo así el daño por isquemia cerebral (DeFeudis, 2002).

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo. Pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30 000 Da. Existen 13 subclases de flavonoides con un total de más de 5 000 compuestos, 10 todos presentando un esqueleto hidrocarbonato del tipo C6-C3-C6 (difeníl-propano) derivado del ácido shikímico y de 3 restos de acetato (Pérez, 2003). Su estructura básica (flaván) consta de dos grupos fenilo (A y B) unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C) (Figura 2.8-1) (Manach *et al.*, 2004; Russo y Sánchez, 2006).

Poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, calmodulina, ornitina decarboxilasa, hexoquinasa, aldosa reductasa, fosfolipasa C y topoisomerasa II.

De todas ellas, las propiedades biológicas de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes (Nijveldt *et al.*, 2001; Pérez, 2003; Drago *et al.*, 2006).

Los flavonoides reaccionan con los radicales libres actuando como “atrapadores” de los mismos. Logran la estabilización de estos radicales al ceder un hidrógeno de sus grupos hidroxilo, formando un puente de hidrógeno entre dos grupos cercanos (Fitó, 2003). Además, son agentes quelantes de metales prooxidantes (como el  $Fe^{++}$ ) inhibiendo, de esta manera, sus acciones nocivas (Gohil y Packer, 2002). La presencia de grupos hidroxilo en sus moléculas favorecen la actividad antioxidante y el grado en que la realicen está determinado por la cantidad de dichos grupos (Fitó, 2003; Roberfroid y Buc Calderón, 1995).



**Figura 2.8-1. Estructura Básica de los flavonoides.** La estructura básica (flavan) consta de 2 grupos fenilo (A y B) unidos por un puente de 3 carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (C). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde 2' al 6'. (Adaptada de Russo y Sánchez, 2006)

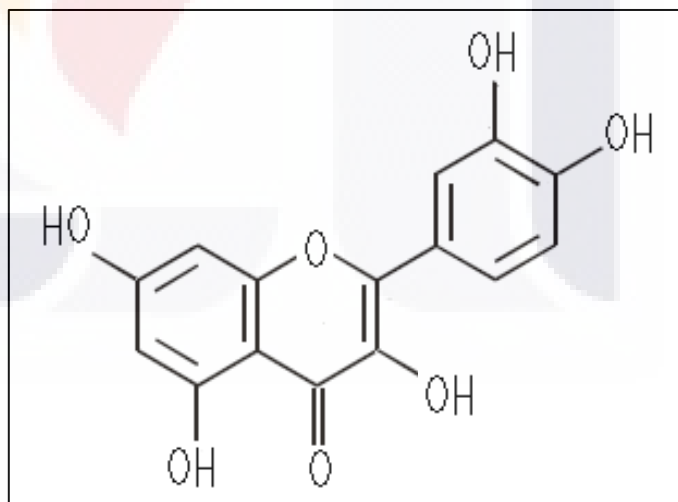
La transformación de los flavonoides ocurre en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares y en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II (glucuronidación, sulfatación o metilación), en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos. Una parte importante de los flavonoides ingeridos y metabolizados se excreta por la orina en forma de conjugados solubles en agua (Russo y Sánchez, 2006).

En la conjugación por metilación, la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina hacia los flavonoides (quercetina), es catalizado por la catecol-O-metil transferasa. La metilación generalmente ocurre en el C3', aunque también puede



ocurrir en el C4'. La actividad de la enzima catecol-*O*-metil transferasa es mayor en hígado y riñones, aunque está presente en varios tejidos. A su vez, la sulfotransferasa cataliza la transferencia de la fracción sulfato del 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato hacia los grupos hidroxilo de los flavonoides. La sulfatación ocurre principalmente en el hígado. Finalmente, las UDP-glucuronosiltransferasas son enzimas unidas a las membranas del retículo endoplásmico en muchos tejidos, las cuales catalizan la transferencia de ácido glucuronido del ácido UDP-glucuronido hacia los flavonoides. La glucuronidación ocurre en el intestino y el hígado, y el mayor índice de conjugación se da en el C3 (Massimo *et al.*, 2007).

La quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona) es uno de los flavonoides más abundantes de su tipo (Figura 2.8-2). Se encuentra comúnmente en frutas y vegetales (cebolla, lechuga, etc.), en su forma glucosada (Moon *et al.*, 2000; Shirai *et al.*, 2002). Los mayores niveles de quercetina se encuentran en las cebollas (280-490 mg/Kg de porción comestible), en las cerezas (10-15 mg/Kg) y en la grosella negra (37 mg/Kg de quercetina y 1 mg/Kg de canferol). La grosella roja contiene de 8 a 13 mg/Kg de quercetina, las uvas rojas de 15 a 37 mg/Kg y las uvas blancas entre 2 y 12 mg/Kg (García, 2005).



**Figura 2.8-2. Estructura molecular de la quercetina.**  
(Russo y Sánchez, 2006)

Es importante señalar que la quercetina es un poderoso antioxidante que ha sido utilizado en diversos estudios farmacológicos y toxicológicos (Francescato *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2006).

La albúmina plasmática es el principal sitio de unión y, por lo tanto, del transporte de los compuestos fenólicos en el torrente sanguíneo. Así, el grado de unión de estos compuestos a la albúmina determinará su velocidad de distribución en los tejidos. De este modo, los cambios conformacionales en la albúmina, que facilitan la disociación de los flavonoides ligados, permitirían la incorporación de dichos compuestos a las células y tejidos (Manach *et al.*, 2004). A este respecto, un estudio *in vitro* ha revelado la posibilidad de un flujo bidireccional de quercetina entre la albúmina y la hemoglobina. Esta observación sugiere que los eritrocitos pueden desempeñar un papel importante en la distribución y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos circulantes, al actuar como reservorios naturales de estas sustancias (Fiorani *et al.*, 2003).

### **2.8.1. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS**

A los flavonoides se les atribuyen muchas propiedades farmacológicas, entre ellas: antioxidantes, antiasmáticas, inhibidores de enzimas (hidrolazas, ciclooxigenadas, fosfodiesterasas, ATP-etasas, transferasas, oxidoreductasas, etc.), antiinflamatorias, anticancerígenas, antibacterianas, antivirales, vasodilatadoras, previenen la agregación plaquetaria e inhiben los síntomas alérgicos (Nijveldt *et al.*, 2001; Drago *et al.*, 2006).

### **2.8.2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Los flavonoides son oxidados por las ERO, resultando radicales más estables y menos reactivos. Es decir, los flavonoides estabilizan a las ERO porque reaccionan con el radical, siendo inactivados gracias a la alta reactividad de los grupos hidroxilo de los flavonoides de acuerdo a la siguiente reacción:



Siendo  $\text{R}\bullet$  el radical libre y  $\text{O}\bullet$  un radical libre de oxígeno (Nijveldt *et al.*, 2001).

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes y secuestradoras de radicales libres. Además, la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO) evita la generación de ERO *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(FLA2), al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, las CAT y SOD. De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de radicales libres y en la formación del radical en sí. En este contexto, los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y que este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4; como sucede con la quercetina (Pérez, 2003).

La inhibición sobre determinadas oxidasas representa otro de los mecanismos a través de la quercetina ejerce su actividad antioxidante. Existen evidencias de que la quercetina inhibe la NADPH del sistema de la citocromo P<sub>450</sub> en microsomas hepáticos. Este efecto pudiera impedir el metabolismo de una gran diversidad de xenobióticos que emplean esta vía para generar radicales libres (Pérez, 2003).

Da Silva y colaboradores (1998) sugieren que algunos metabolitos conjugados de la quercetina, básicamente conjugados glucuronido y/o sulfato, actúan como efectivos antioxidantes cuando se induce peroxidación lipídica con sulfato de cobre en ratas.

Los principales metabolitos de la quercetina detectados en el plasma humano son en forma de glucuronidos y/o sulfato con o sin metilación adicional. Uno de los metabolitos principales la quercetina 3-O-β-D-glucuronido, ha mostrado actividad protectora frente a la inducción de daño oxidativo por cobre sobre lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Murota *et al.*, 2007).

En un estudio realizado en ratas, se demostró el efecto protector de la quercetina contra la nefrotoxicidad por estrés oxidativo, causada por un quelato de hierro (nitriltriacetato férrico, Fe-NTA). El pre tratamiento con este flavonoide (2 mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes de la administración única de Fe-NTA (8 mg Fe/Kg, i.p.) disminuyó marcadamente la disfunción renal, las alteraciones morfológicas, redujo los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y restableció las enzimas antioxidantes depletadas (Singh *et al.*, 2004). Además, se ha reportado que el tratamiento con quercetina (50 mg/Kg) disminuye las alteraciones funcionales, histológicas e inmunohistoquímicas producidas por el cisplatino (Francescato *et al.*, 2004).

Por otra parte, la administración oral de quercetina (10 mg/Kg/día) durante 4 semanas a ratas diabéticas, disminuyó significativamente la disfunción renal y el estrés

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

oxidativo (Anjaneyulu y Chopra, 2004). También ha sido descrito que el pre tratamiento de ratas Wistar con este compuesto disminuye el daño y la lipoperoxidación hepática producida por la N-dietilnitrosamina (Sánchez *et al.*, 2005). Además, se ha visto que la administración de quercetina a ratas Wistar disminuye el daño tubular renal y el estrés oxidativo inducido por el cadmio (Morales *et al.*, 2006). En años recientes, Amália *et al.* (2007) reportaron efectos benéficos sobre la fibrosis hepática en ratas cirróticas, debido al incremento en la actividad antioxidante y la disminución de efectos prooxidantes. Finalmente, Yao y colaboradores (2007) encontraron que la quercetina protege a los hepatocitos contra el estrés oxidativo causado por el etanol.

### **2.8.3. EFECTOS ADVERSOS PROOXIDANTES**

Los compuestos polifenólicos, y dentro de estos los flavonoides, ocupan un lugar destacado dentro de los antioxidantes. Los mecanismos a través de los cuales ejercen su acción antioxidante resultan de una combinación de sus propiedades quelantes y sequestradoras de radicales libres, así como de la inhibición de oxidasas y la acción sobre otras enzimas. Sin embargo, estos compuestos pueden actuar también como agentes prooxidantes. Algunos de los mecanismos a través de los cuales ejercen sus acciones prooxidantes incluyen la reducción temporal de Cu (II) a Cu (I), la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), así como la afectación de las funciones de los componentes del sistema de defensa antioxidante (glutatiión reducido) (Pérez, 2003).

Ferraresi y colaboradores (2005) analizaron los efectos anti y prooxidantes de la quercetina en función del tiempo de exposición. Encontraron que en periodos cortos de tratamiento este flavonoide ejerce efectos antioxidantes, observando una disminución de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que en periodos prolongados muestra una actividad prooxidante (incrementándolos). Además, en estos periodos prolongados, el contenido de GSH se redujo, hecho correlacionado con la falta de actividad antioxidante de la quercetina.

Robaszkiewicz y colaboradores (2007) encontraron que la quercetina disminuye la producción de ERO en las células, pero induce estrés oxidativo por la producción de peróxidos en el medio extracelular. Esto lo estudiaron en cultivos celulares *in vitro* y en con relación a las concentraciones administradas de quercetina. Así, a concentraciones bajas se estimula la proliferación celular y se incrementa la capacidad antioxidante total de las células; mientras que a concentraciones altas, disminuyen la supervivencia y

viabilidad celular, el contenido de tioles, la capacidad antioxidante total y las actividades de las enzimas SOD, CAT y glutatión S-transferasa.

Choi y colaboradores (2003) investigaron los efectos de la administración crónica de quercetina (2 a 20 mg/Kg/día, durante 4 semanas) sobre la peroxidación lipídica y la concentración de GSH en hígados de ratas macho Sprague-Dawley. Observaron una disminución del 55-60% en la concentración hepática de MDA, indicador de la peroxidación lipídica; sin embargo, la concentración hepática de GSH disminuyó en un 40%.

Es pertinente señalar que la quercetina incrementa la generación de radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton; causa la ruptura del ADN del timo de carnero en presencia de cobre (Cu) y oxígeno molecular, debido al ataque sobre los residuos de timina y citosina. Teniendo en cuenta que estos daños fueron revertidos por un agente quelante de Cu y no así por los secuestradores de radicales hidroxilo libres, se ha sugerido que el daño al ADN es más bien inducido por el complejo oxígeno-Cu-ADN, más que por los radicales hidroxilo. Al parecer, la sustitución orto 3'-4'-dihidroxi en el anillo B resulta esencial para la formación de quelatos de Cu y, el OH de la posición 3 aumenta la oxidación de la quercetina en presencia del mismo metal, cosa que no ocurre con otros flavonoides que carecen de este grupo. Por último, la conjugación entre los anillos A y B resulta importante también para la acción prooxidante de un flavonoide iniciada por el Cu, mientras que la O-metilación de las sustituciones hidroxílicas inactiva dicha acción (Pérez, 2003).

En ausencia de metales, la quercetina protege los grupos sulfidrilo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (enzima glicolítica con residuos de cisteína). Sin embargo, en solución acuosa a pH 7.5, la quercetina produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la cual reduce los residuos de la enzima. Además, la quercetina incrementa significativamente la oxidación de la GAPDH en presencia de iones de hierro. Al respecto, ha sido descrita la formación de radicales hidroxilo luego de añadir FeSO<sub>4</sub> a una solución de quercetina (Schmalhausen *et al.*, 2007).

Según Pérez (2003), los flavonoides con un grupo pirogalólico en el anillo B tienen una mayor actividad antioxidante que los que presentan un núcleo catecólico pero, al mismo tiempo, son más susceptibles a mostrarse como agentes prooxidantes, lo que neutraliza los referidos efectos antioxidantes.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Se ha descrito que cuando la quercetina ejerce su actividad antioxidante es convertida a un producto potencialmente tóxico (Boots *et al.*, 2007). Este producto es la orto-quinona (QQ), la cual forma dos aductos con el GSH (6-GSQ y 8-GSQ). En ausencia de GSH, los GSQ pueden llevar a cabo reacciones de arilación con los grupos tiol de las proteínas. Esto quiere decir que los productos formados, cuando la quercetina ejerce su actividad antioxidante, son tóxicos en ausencia de GSH (Boots *et al.*, 2003). Sin embargo, el GSQ no es estable y se disocia continuamente en GSH y QQ, con una vida media de 2 minutos. En presencia de ácido ditiol dihidrolipóico, la quercetina se forma del GSQ. Lo anterior indica que el GSQ actúa como un transportador y acumulador del QQ. En este sentido, la elevada toxicidad inicial del QQ es dispersada por la formación del GSQ el cual, finalmente, propaga la toxicidad inducida por QQ en más células (Boots *et al.*, 2005).

La quercetina oxidada en las células puede unirse a las proteínas de manera covalente. La unión de la quercetina, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peroxidasas, es altamente selectiva para la albúmina sérica humana (HSA). Esta unión es drásticamente disminuida en presencia de GSH. En muestras de sangre, la liberación de mieloperoxidasa por el éster de forbol, incrementa 3 veces la unión de quercetina a la HSA. En resumen, la quercetina en presencia de peroxidasa y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se une de forma covalente a proteínas con una afinidad particular por la HSA (Kaldas *et al.*, 2003).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La exposición ocupacional o ambiental al glifosato puede causar daños a la salud de los seres humanos, afectando al hígado y 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 serias que generan una calidad de vida baja o conducen a la muerte. Por ello, consideramos importante analizar la toxicidad hepática y renal del glifosato y la posible capacidad de la quercetina para contrarrestar los efectos nocivos de este herbicida.

### **4. HIPÓTESIS**

“La administración de quercetina a los animales de experimentación puede disminuir la magnitud de los efectos tóxicos producidos por el glifosato sobre el hígado y los riñones”.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1. GENERAL**

Analizar la toxicidad del glifosato en el hígado y los riñones así como la capacidad de la quercetina para revertir o disminuir los efectos nocivos producidos por este herbicida.

#### **5.2. ESPECÍFICOS**

En este estudio se plantearon dos objetivos específicos:

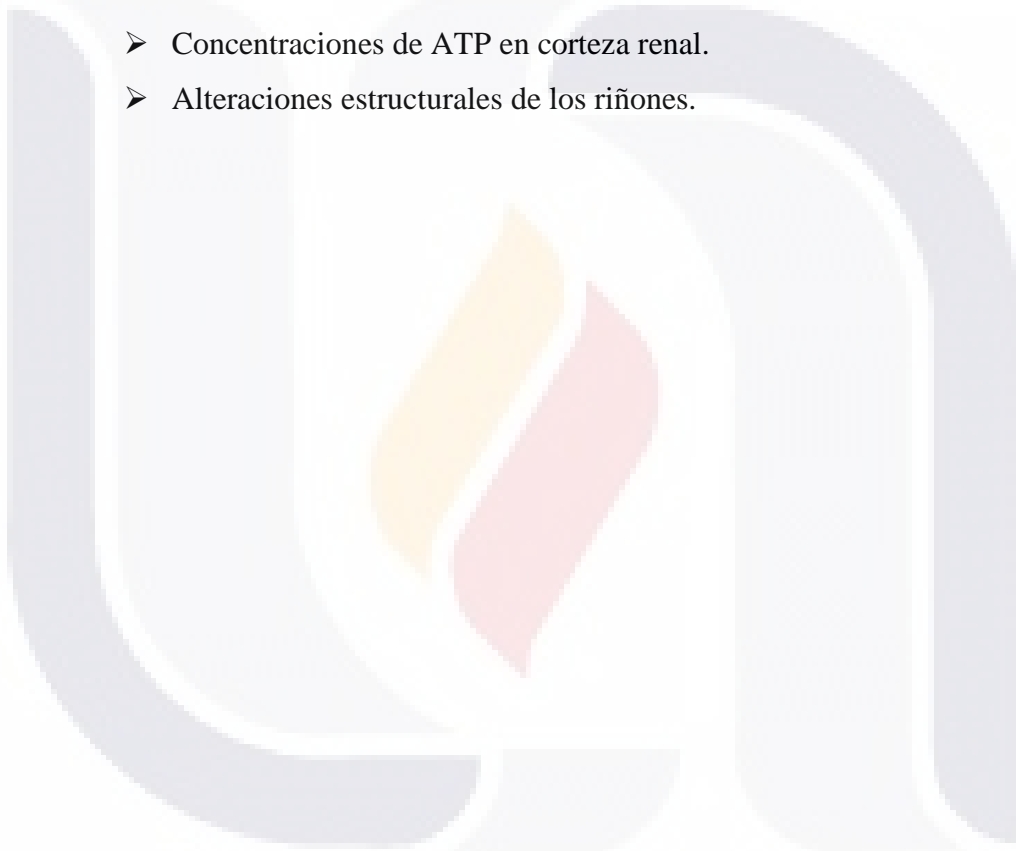
A) Estudiar el efecto de la quercetina sobre el daño hepático producido por el glifosato, en ratas Wistar machos adultos, mediante el análisis de:

- Actividades séricas de transaminasas glutámico-pirúvica (TGP) y glutámico oxalacética (TGO).
- Concentraciones de albúmina en sangre.
- Concentraciones hepáticas de glutatión reducido (GSH).
- Concentraciones hepáticas de ATP.
- Alteraciones estructurales del hígado.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

B) Analizar el efecto de la quercetina sobre el daño renal producido por el glifosato, en ratas Wistar machos adultos, mediante el análisis de:

- Concentraciones de creatinina en sangre.
- Volumen urinario.
- Concentraciones de proteínas totales y sodio en orina.
- Concentraciones urinarias de glucosa y fosfatos.
- Concentraciones renales de GSH.
- Concentraciones de ATP en corteza renal.
- Alteraciones estructurales de los riñones.





## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio se realizó en ratas Wistar machos con un peso de 200-250 g. Estos animales fueron divididos en cuatro grupos (n=10/lote): Grupo control (A), se le administró el vehículo del glifosato diariamente, vía subcutánea (sc) durante 30 días para obtener los valores controles de los parámetros a determinar; Grupo control quercetina (B), se le administró este antioxidante a una dosis de 25 mg/Kg/día cada tercer día y durante 30 días, vía intraperitoneal (ip), para evaluar sus efectos; Grupo tratado con glifosato (C), se le administró este herbicida a una dosis de 25 mg/Kg/día durante 30 días, vía sc, para evaluar la toxicidad hepática y renal de este herbicida; Grupo tratado con glifosato + quercetina (D), recibió el herbicida glifosato (25 mg/Kg/día, sc) y el antioxidante quercetina (25 mg/Kg/día, cada tercer día, ip), con el fin de evaluar el efecto de la quercetina sobre el daño hepático y renal causado por el glifosato.

A los 10, 20 y 30 días de tratamiento, los animales se colocaron en cajas metabólicas para obtener muestras de orina (24 horas). Posteriormente, se anestesiaron con pentobarbital para obtener muestras de sangre de la arteria caudal. Al finalizar el período del respectivo tratamiento, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de tejido del hígado y los riñones.

Adicionalmente y, en base a los resultados obtenidos, se trataron dos grupos más (n=10/ grupo): Grupo control quercetina, el cual recibió quercetina (12.5 mg/Kg/día ip, cada tercer día y durante 30 días) y Grupo tratado con glifosato + quercetina, el cual recibió glifosato (25 mg/Kg/día, sc, durante 30 días) y quercetina (12.5 mg/Kg/día, ip, cada tercer día, durante 30 días), para evaluar el efecto de la quercetina sobre el daño renal causado por el glifosato.

#### *ANÁLISIS ESTADÍSTICO*

Los datos obtenidos se analizaron mediante las pruebas de ANOVA y Tukey Kramer, así como t student en los dos grupos adicionales que fueron estudiados. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media.

## 6.2. MÉTODOS. TRATAMIENTO DE MUESTRAS

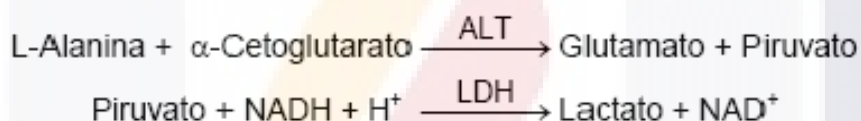
### 6.2.1. PRUEBAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA

El daño hepático fue valorado cuantificando las actividades plasmáticas de las transaminasas glutámico pirúvica (TGP) y glutámico oxalacética (TGO) y la concentración plasmática de albúmina. Además, se llevó a cabo la determinación de los tiempos de protrombina (TP).

#### 6.2.1.1. ACTIVIDADES DE LAS TGP Y TGO

La TGP o alanina aminotransferasa es una enzima intracelular, se encuentra principalmente en células de hígado y riñón. Se aplica en el diagnóstico de las enfermedades del hígado. Niveles elevados se observan en enfermedades hepáticas como hepatitis, enfermedades de los músculos y traumatismos.

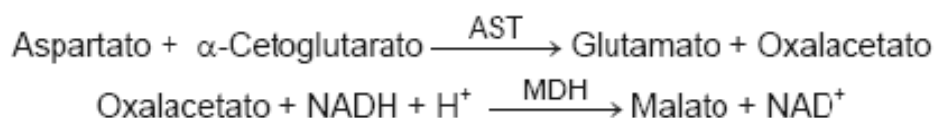
La TGP cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al  $\alpha$ -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenada (LDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de TGP en la muestra (Murray, 1984).

La TGO o aspartato aminotransferasa es una enzima intracelular, se encuentra en niveles altos en el músculo del corazón, células hepáticas, células del músculo esquelético y en menor cantidad en otros tejidos. Aunque un nivel elevado en suero de esta enzima no es específico de enfermedad hepática, se emplea principalmente para su diagnóstico junto con otras enzimas como la TGP. También se utiliza en el control post-infarto, en pacientes con desordenes de músculo esquelético, y en otras enfermedades.

La TGO cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al  $\alpha$ -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenas (MDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de TGO en la muestra (Murray, 1984).

#### **6.2.1.2. CUANTIFICACIÓN DE ALBÚMINA**

Las proteínas son compuestos orgánicos macromoleculares ampliamente distribuidos en el organismo. La albúmina es el principal constituyente de las proteínas totales plasmáticas. Entre sus principales funciones se puede mencionar el transporte de sustancias como hormonas, ácidos grasos, bilirrubina, catecolaminas, que en forma libre son insolubles en medio acuoso; además, el mantenimiento de la presión coloidosmótica, que estaría relacionado con su bajo peso molecular y su gran carga neta.

Dado que la albúmina es producida por el hígado, la disminución de su concentración en el plasma sanguíneo puede ser producto de una enfermedad hepática, pero también puede ser el resultado de una enfermedad renal que permite que la albúmina se elimine con la orina. Los aumentos anormales de albúmina son ocasionales y se relacionan con estados de deshidratación. La hipoalbuminemia ocurre en condiciones patológicas tales como pérdida excesiva de proteínas en el síndrome nefrótico, desnutrición, infecciones prolongadas, quemaduras severas. Otras causas son disminución en la síntesis por una dieta deficiente, enfermedad hepática o mala absorción.

La albúmina reacciona específicamente con la forma aniónica de la 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfonftaleína (BCF), en presencia de un exceso de colorante, en medio tamponado a pH 3.9. El aumento de absorbancia a 625 nm respecto del blanco de reactivo, es proporcional a la cantidad de albúmina presente en la muestra (Doumas *et al.*, 1971).

En nuestro estudio, se realizó la lectura (por duplicado) de una solución estándar de albúmina (5 g/dL), adicionando 10  $\mu$ L de esta solución estándar a 2.5 mL del reactivo (solución de bromo cresolsulfon ftaleína, 0.3 mmol/L) y se agitó. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para después leer en un espectrofotómetro a 625 nm. Una vez obtenido el promedio de las absorbancias, se hizo el cálculo de un factor de multiplicación el cual se utilizó para calcular las concentraciones de albúmina de las muestras analizadas.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

**FACTOR**= concentración del estándar / Absorbancia= (5 g/dL) / (0.446)= 11.21 g/dL

### **6.2.1.3. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE PROTROMBINA (TP)**

La coagulación de la sangre puede desencadenarse por la vía extrínseca (lesión tisular) o por la vía intrínseca (contacto de la sangre con tejidos distintos al vascular normal). La determinación del tiempo de protrombina es una prueba global para evaluar la coagulación extrínseca. Esta prueba es sensible a deficiencias en la sangre de los factores: II, V, VII y X. El TP prolongado es indicativo de un nivel disminuido de uno o más de los factores antes señalados, cuya causa puede deberse a trastornos hereditarios de la coagulación, deficiencia de vitamina K, a la administración de medicamentos, enfermedad biliar obstructiva, hepatitis y cirrosis o necrosis hepática. Esta determinación analítica se efectúa antes de una intervención quirúrgica para determinar problemas hemorrágicos potenciales o como indicadora de la función hepática, ya que existe una correlación entre las anomalías en la coagulación sanguínea medidas por el TP y el grado de disfunción hepática (Ladero, 2006).

El reactivo utilizado en esta prueba (Simplastin Excel) es un reactivo de tromboplastina tisular (cerebro de conejo) que contiene iones de calcio y estabilizantes en un tampón adecuado. Se utiliza en la prueba monofásica modificada del tiempo de protrombina (Quick *et al.*, 1935).

### **6.2.2. PRUEBAS DE FUNCIÓN RENAL**

El daño renal fue valorado cuantificando el volumen urinario, las concentraciones urinarias de proteínas totales, fosfatos, glucosa y sodio, así como la concentración plasmática de creatinina.

#### **6.2.2.1. CUANTIFICACIÓN DEL VOLUMEN URINARIO**

El volumen de orina excretado depende del estado de hidratación de un individuo y de la cantidad de agua eliminada por los riñones. Los factores que influyen sobre el volumen urinario incluyen: la ingesta de líquidos, la pérdida de agua a partir de fuentes renales, sudoración excesiva o diarrea; variaciones en la secreción de la hormona antidiurética y la necesidad de excretar cantidades elevadas de sólidos disueltos, como

glucosa o sales. La cuantificación del volumen urinario está indicado para valorar el equilibrio hídrico y la función renal.

En algunas condiciones patológicas, el volumen urinario excretado es muy elevado (poliuria) como en la glomerulonefritis crónica y la pielonefritis, entre otras. Por el contrario, en otros procesos patológicos se presenta la situación inversa, disminución del volumen urinario (oliguria), como ocurre en la nefrosis o en la glomerulonefritis aguda; además, en casos extremadamente graves como la obstrucción de las vías urinarias o la glomerulonefritis severa ocurre el paro en la formación de orina (anuria). La emisión de orina durante la noche disminuye debido a una reducción fisiológica de la filtración renal. Un aumento de la orina nocturna puede reflejar cardiopatías, hipertensión u otras enfermedades renales (Bello y López, 2001; Simerville *et al.*, 2005).

#### **6.2.2.2. CUANTIFICACIÓN DE CREATININA**

La creatinina es el resultado de la degradación de la creatina, componente de los músculos y puede ser transformada en ATP, fuente de energía para las células. La producción de creatinina depende de la modificación de la masa muscular. Varía poco y los niveles suelen ser muy estables. Se elimina a través del riñón. La creatinina es filtrada a través del glomérulo, por lo que un aumento de su concentración en sangre sugiere una disminución de la tasa de filtración glomerular. En una insuficiencia renal progresiva hay una retención en sangre de urea, creatinina y ácido úrico. Niveles altos de creatinina son indicativos de patología renal. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

El ensayo de la creatinina está basado en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino descrito por Jaffé. La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojizo. El intervalo de tiempo escogido para las lecturas permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra ensayada (Bauer, 1982).

La obtención del factor de multiplicación de esta técnica, se realizó mezclando los reactivos pícrico (R1, ácido pícrico 17.5 mmol/L) y alcalinizante (R2, hidróxido sódico 0.29 mol/L) en volúmenes iguales. A 1 mL de la mezcla anterior se adicionaron 0.2 mL del patrón primario acuoso de Creatinina (2 mg/dL). Se colocaron en la celda

del espectrofotómetro y se tomaron las lecturas a los 30 segundos y a los 5 minutos a 510 nm. Las lecturas se hicieron por duplicado, se restó el valor obtenido a los 5 minutos con su valor correspondiente a los 30 segundos y, obtenido el promedio se hizo el cálculo para el factor.

**FACTOR**= concentración estándar / absorbancia= (20 mg/L)/(0.155)= 129 mg/L

### 6.2.2.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Las proteínas son compuestos macromoleculares que se encuentran disueltos en el plasma o suero y que desempeñan funciones tales como actuar en defensa de agentes invasores formando los anticuerpos, transportando metabolitos, hormonas y sustancias relativamente insolubles; actúan como elementos estructurales. De las pruebas químicas de rutina practicadas en orina, la determinación de proteínas es de las más indicativas de enfermedad renal. La orina normal contiene muy poca proteína, principalmente proteínas de bajo peso molecular filtradas de manera selectiva en el glomérulo y proteínas producidas por vías genitourinarias. Las causas patológicas principales de proteinuria incluyen daño a la membrana glomerular, trastornos que afectan la resorción tubular y aumento en las concentraciones séricas de bajo peso molecular. Se observan hipoproteinemias en situaciones patológicas como desnutrición, infecciones prolongadas y en casos de pérdidas renales.

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas. Este método consta de dos etapas:

a) Los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

b) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas,

actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso. La intensidad del color depende del número de aminoácidos presentes en especial tirosina y triptófano (Lowry *et al.*, 1951).

#### Curva de calibración del Método de Cuantificación de Proteínas Totales.

Para el desarrollo de la curva de calibración de este método, se prepararon los siguientes reactivos:

Solución A: 20 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 4g de NaOH, 0.2 g de tartrato de sodio aforar a 1 L.

Solución B: 0.5 g de sulfato cúprico en 100 mL de agua bidestilada.

Solución C: mezclar 50 mL de la solución A con 1 mL de la solución B.

Solución Madre: solución de BSA al 0.1%.

Se prepararon 4 tubos de ensayo con 1 mL de la solución C y se agregaron 6, 15, 35 y 50  $\mu\text{L}$  de la solución madre de BSA a cada tubo. Se agitó y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, adicionaron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N y se agitó vigorosamente. Se dejaron 30 minutos incubando a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo de incubación se realizó la lectura de las absorbancias en un espectrofotómetro a 750 nm, ajustando el aparato a cero con la solución C. Con los valores obtenidos se realizaron los cálculos para obtener el factor de multiplicación de esta técnica. En el cuadro 6.2.2.3-1 se muestran los valores obtenidos de las absorbancias, el volumen adicionado de la solución madre a cada tubo de ensayo y la concentración corregida. Se representaron gráficamente los resultados de las absorbancias contra las concentraciones de cada solución.

**Cuadro 6.2.2.3-1. Datos obtenidos para la curva de calibración del método de proteínas totales.** Volúmenes de solución madre, concentraciones corregidas y absorbancias obtenidas en la técnica para cuantificar proteínas totales.

VOLUMEN DE SOLUCIÓN MADRE ( $\mu\text{L}$ )	CONCENTRACIÓN CORREGIDA ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABSORBANCIA
6	5.42	0.134
15	13.45	0.263
35	30.83	0.47
50	43.43	0.645

Utilizando la ecuación para calcular la pendiente de una recta tenemos:

$$m = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1) = (0.645 - 0.134) / (43.43 - 5.42) = 0.0134$$

Calculando la inversa:  $1/m = 1 / 0.0134 = 74.38$ , el factor se obtiene multiplicando la inversa de la pendiente por la dilución de la muestra que es 56:

$$\text{FACTOR} = 56 \times 74.38 = 4165 \mu\text{g/mL} = 4.165 \text{ mg/mL.}$$

En la siguiente figura se muestra la curva de calibración graficada a partir de los datos de absorbancia obtenidos contra los de concentración.

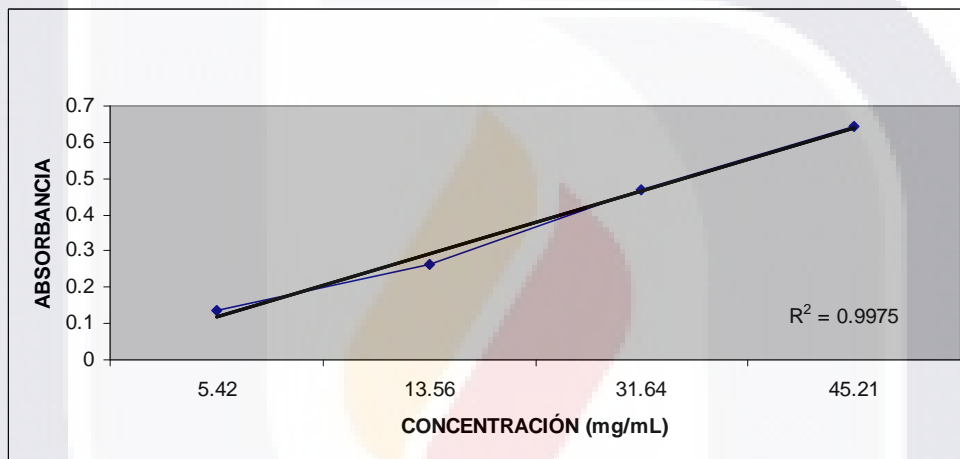


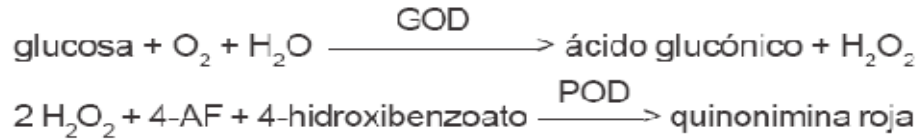
Figura 6.2.2.3-1. Curva de calibración para el método de proteínas totales.

#### 6.2.2.4. CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA

En condiciones normales, la glucosa filtrada en los glomérulos se resorbe en el túbulo contorneado proximal; por lo tanto, la orina contiene cantidades diminutas de esta molécula. La resorción tubular de glucosa es mediante transporte activo en respuesta a las necesidades corporales para conservar una concentración adecuada de glucosa. Sin embargo, en algunas enfermedades (como, por ejemplo, en la diabetes mellitus) el aumento de glucosa contenida en la sangre hace que lleguen al túbulo renal grandes cantidades de este azúcar, parte del cual no puede ser reabsorbido, siendo por tanto, eliminado.



El esquema de la reacción para la cuantificación de glucosa es el siguiente:



GOD: glucosa oxidasa

POD: peroxidasa

4-AF: 4-aminofenazona (Simerville *et al.*, 2005; Trinder, 1969).

Para obtener el factor de multiplicación para esta técnica se colocaron en tubos de ensaye 10  $\mu\text{L}$  del estándar (solución de glucosa 1g/L) con 1 mL del reactivo (enzimas GOD, POD, 4-AF reconstituidas en buffer fosfatos pH 7.0 con hidroxibenzoato). Se realizó por duplicado, incubando durante 25 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se leyeron en un espectrofotómetro a 505 nm. Una vez promediados los valores de absorbancia se hizo el cálculo para el factor de la siguiente manera:

$$\text{FACTOR} = \text{concentración estándar} / \text{absorbancia} = (1 \text{ g/L}) / (0.401) = 2.49 \text{ g/L}$$

#### 6.2.2.5. CUANTIFICACIÓN DE FOSFATOS

El fósforo se encuentra en el organismo formando parte de compuestos orgánicos (proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos) o como fosfatos inorgánicos cumpliendo diversas funciones, tanto en el transporte de energía, como en la estructura de tejidos y mantenimiento del pH de los líquidos corporales. Los tejidos óseo y muscular lo contienen como constituyente esencial y participa en la composición del tejido nervioso. Su cuantificación es útil para evaluar el equilibrio de fósforo en el organismo, evaluar el balance de calcio-fósforo o para el diagnóstico de hiperparatiroidismo y pérdida renal de fósforo. Sus valores aumentados pueden deberse a daño tubular renal, acidosis tubular renal proximal, hipervitaminosis D, degeneración hepatocelular, diabetes mellitus, mieloma múltiple, entre otras.

La determinación colorimétrica de fósforo se hizo agregando ácido sulfúrico y molibdato a la muestra, además de un agente reductor como el sulfato ferroso. La solución azul resultante fue leída en un espectrofotómetro contra su blanco (Sumner, 1944).

Curva de calibración para la cuantificación de fosfatos.

Para calcular el factor de multiplicación y realizar la curva de calibración de este método se realizó lo siguiente. Se preparó una solución estándar de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . De la solución anterior, se colocaron en tubos de ensaye 0.5, 1, 1.5 y 2 mL y se llevó cada muestra a un volumen final de 2.88 mL con agua tridestilada. Se adicionaron a cada tubo 0.4 mL de una solución de molibdato de amonio 6.6%, 0.4 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  7.5N, 0.32 mL de una solución de  $\text{FeSO}_4$  10%. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. La lectura de las absorbancias se llevó a cabo en un espectrofotómetro a 700 nm de longitud de onda. Los valores obtenidos de las absorbancias se promediaron y, mediante la ecuación de la pendiente de una recta, se calculó el factor de multiplicación. Además, se graficaron las concentraciones de cada solución contra su correspondiente absorbancia. En el siguiente cuadro se encuentran las concentraciones utilizadas y su correspondiente lectura en el espectrofotómetro como absorbancia.

**Cuadro 6.2.2.5-1. Datos obtenidos para la curva de calibración del método de fosfatos.**  
Concentraciones y absorbancias obtenidas en la técnica para cuantificar fosfatos.

CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ABSORBANCIA
5	0.151
10	0.309
15	0.459
20	0.614

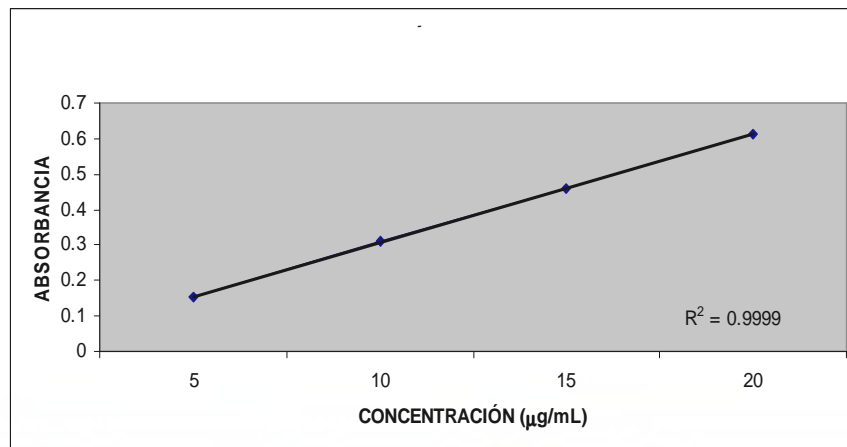
Utilizando la ecuación para calcular la pendiente de una recta tenemos:

$$m = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1) = (0.614 - 0.151) / (20 - 5) = 0.0309$$

El factor se obtiene calculando la inversa de la pendiente:

$$\text{FACTOR} = 1/m = 1/0.0309 = 32.39 \text{ mg/MI}$$

En la figura siguiente encontramos la gráfica para la curva de calibración del método para cuantificar fosfatos.



**Figura 6.2.2.5-1. Curva de calibración para el método de Fosfatos.**

### 6.2.2.6. CUANTIFICACIÓN DE SODIO

Este examen se utiliza para determinar el estado de hidratación y la capacidad del riñón para conservar o excretar el sodio. El sodio es el principal catión del líquido extracelular y la principal partícula osmótica fuera de la célula. Este electrolito es liberado en el filtrado glomerular y es resorbido isotónicamente por el túbulo proximal. La aldosterona, hormona producida por la corteza suprarrenal, juega un papel importante en la regulación de los niveles de sodio en el cuerpo. Específicamente, la aldosterona aumenta la reabsorción de sodio por parte de los riñones a costa de la pérdida de potasio e hidrógeno. La reabsorción de sodio ayuda a retener agua en los tejidos corporales y el torrente sanguíneo. Los valores de sodio en orina por encima de lo normal pueden indicar una ingesta excesiva de sal, acidosis diabética, insuficiencia suprarrenal, acidosis tubular renal, diabetes sacarina. Por el contrario, los valores por debajo de lo normal pueden indicar aldosterismo, insuficiencia cardíaca congestiva, diarrea, insuficiencia renal, síndrome nefrótico. En el método flamométrico, la muestra se diluye y es aspirada hacia una flama de aire-propano que suministra suficiente energía en forma de calor para excitar a los iones de sodio. Cuando estos iones térmicamente excitados regresan a su nivel basal, emiten luz que se mide con un fotodetector. La intensidad de la energía radiante es directamente proporcional a la concentración de los iones en la muestra (Simerville *et al.*, 2005).

### 6.2.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Fue valorada determinando las concentraciones hepáticas y renales de glutatión reducido (GSH) y trifosfato de adenosina (ATP), concentraciones hepáticas, renales y plasmáticas de malondialdehído (MDA).

#### 6.2.3.1. CUANTIFICACIÓN DE GSH

El glutatión es un tripéptido constituido por tres aminoácidos: glicina, cisteína y ácido glutámico. Es sintetizado dentro de las células del cuerpo mediante dos reacciones dependientes de ATP:



Los aminoácidos que componen el GSH deben estar disponibles para la producción del GSH. El GSH también se conoce como tiol porque su capacidad de donación de electrones está ligada a su sulfhidrilo o grupo de azufre. La habilidad de esta molécula está en donar un electrón, que hace posible su bioactividad. De hecho, funciona como un agente reductor no enzimático. Unos sistemas de enzimas lo sintetizan, lo usan y luego lo regeneran para mantener niveles adecuados disponibles en todo momento. La concentración mayor de GSH se encuentra en el hígado. El hígado también puede exportar GSH a otras áreas del cuerpo, siempre y cuando se mantengan los niveles adecuados de GSH. El GSH es llamado el antioxidante intracelular principal ya que participa en la destoxificación de xenobióticos y sustancias endógenas, razón por la cual, previene y repara el daño oxidativo de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Meister, 1988; Deneke y Fanburg, 1989).

La determinación de GSH intracelular se llevó acabo mediante la reacción del GSH con un fluorocromo específico que es el *o*-ftaldehído (OPT), formando un producto fluorescente OPT-GSH. La intensidad de fluorescencia para este complejo es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra. (Hissin y Hilf, 1976).

Curva de Calibración para la cuantificación de GSH en tejidos.

Para calcular el factor de multiplicación y realizar la curva de calibración de este método se realizó lo siguiente. Se preparó una solución estándar de GSH 50 µg/mL. De la solución anterior, se tomaron alícuotas para preparar 10 soluciones de concentraciones conocidas mostradas en el cuadro 6.2.3.1-1. Se les adicionó buffer de fosfatos pH 8.0 y 100 µL de OPT. Se obtuvieron las intensidades de fluorescencia y se promediaron.

**Cuadro 6.2.3.1-1. Datos obtenidos para la curva de calibración del método de GSH.** Concentraciones e intensidades de fluorescencia obtenidas en la técnica para cuantificar GSH.

CONCENTRACIÓN (µg/mL)	FLUORESCENCIA
0.5	78.627
1.0	144.077
1.5	200.138
2.0	293.12
2.5	361.999
3.0	413.65
3.5	543.551
4.0	619.997
4.5	739.059
5.0	785.555

Utilizando la ecuación para calcular la pendiente de una recta tenemos:

$$m = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1) = (785.555 - 78.627) / (5.0 - 0.5) = 157.095$$

Calculando la inversa:  $1/m = 1 / 157.095 = 0.0064$

Y el factor se obtiene multiplicando la inversa de la pendiente por la dilución de la muestra que es 800.

$$\text{FACTOR} = 800 \times 0.0064 = 5.12 \text{ µg GSH/ g de tejido}$$

En la figura 6.2.3.1-1 se encuentra la gráfica obtenida de la curva de calibración para el método de cuantificación de GSH.

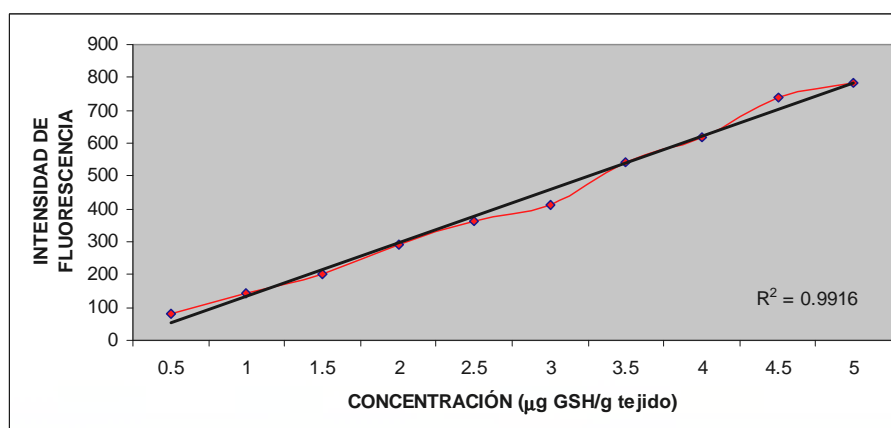
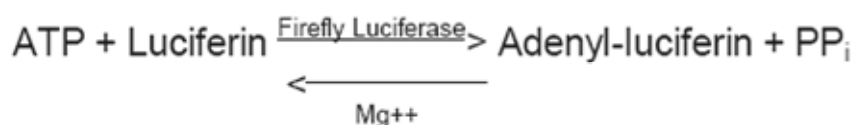


Figura 6.2.3.1-1. Curva de calibración para el método de GSH en tejidos.

### 6.2.3.2. CUANTIFICACIÓN DE ATP

En las células eucariotas diferenciadas, las mitocondrias son los orgánulos celulares encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular, actúan por tanto, como centrales energéticas. Gran parte de la energía química se genera en forma de ATP a expensas de carburantes metabólicos (glucosa, ácidos grasos y proteínas). Una disfunción en la producción de ATP causa la alteración de las funciones celulares dependientes de energía y por tanto puede originar la muerte celular (Bernardi, 1998). El contenido en ATP se mide con un luminómetro utilizando el sistema enzima/sustrato (luciferasa/ luciferina). Este sistema se basa en una reacción química que necesita la concurrencia de cuatro elementos que son; oxígeno, luciferina; luciferasa y ATP. El mecanismo de reacción es el siguiente, el oxígeno oxida la luciferina, la luciferasa acelera la reacción y el ATP proporciona la energía para que esta se convierta en una nueva sustancia (luciferina oxidada), capaz de descomponerse para volver a su estado inicial. En este último proceso se libera el exceso de energía captado, esta vez, en forma de luz (Strehler, 1974).



### Curva de calibración para la cuantificación de ATP.

Se llevó a cabo preparando seis soluciones estándar de concentración conocida a partir de una solución stock de ATP. Se realizaron las lecturas de la intensidad de bioluminiscencia y se graficaron contra la concentración de cada solución estándar (Figura 6.2.3.2-1). Se realizaron los cálculos para obtener el factor con el cual se multiplicaron los valores de cuantificados de las muestras para obtener directamente la concentración. En el cuadro 6.2.3.2-1 se muestran los valores obtenidos de bioluminiscencia así como las concentraciones de cada solución estándar.

**Cuadro 6.2.3.2-1. Datos obtenidos para la curva de calibración del método de ATP.** Concentraciones e intensidades de bioluminiscencia obtenidas en la técnica para cuantificar ATP en tejidos.

CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{mol/mL}$ )	INTENSIDAD DE BIOLUMINISCENCIA
25	275.97
50	315.42
100	369.38
150	458
175	523.23
200	587.06

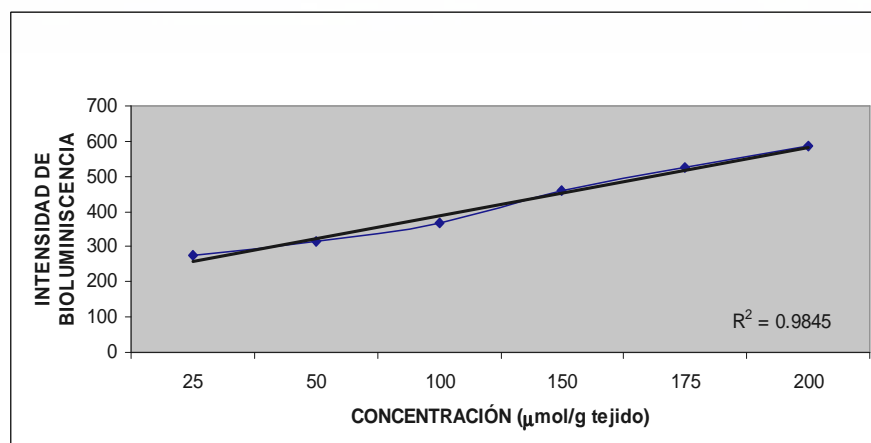
Utilizando la ecuación para calcular la pendiente de una recta tenemos:

$$m = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1) = (587.06 - 275.97) / (200 - 25) = 1.77$$

Calculando la inversa:  $1/m = 1 / 1.77 = 0.562$

Y el factor se obtiene multiplicando la inversa de la pendiente por la dilución de la muestra que es 10.

$$\text{FACTOR} = 10 \times 0.562 = 5.62 \mu\text{g mol/ g de tejido}$$



**Figura 6.2.3.2-1. Curva de calibración para el método de ATP en tejidos.**

### 6.2.3.3. CUANTIFICACIÓN DE MDA

La peroxidación lipídica es uno de los procesos más frecuentemente implicados en la hepatotoxicidad provocada por fármacos. Se trata de una reacción que conduce a la degradación oxidativa de los lípidos de la membrana celular. La oxidación de los lípidos da lugar a la formación de un gran número de productos de degradación (hidroperóxidos, aldehídos, cetonas). La primera consecuencia de este proceso es la profunda alteración de las propiedades fisicoquímicas de las membranas y, en consecuencia, de la funcionalidad de las enzimas allí ubicadas. Una de las técnicas más ampliamente utilizadas para detectar la peroxidación lipídica es la cuantificación de MDA, uno de los productos finales de la acción de los radicales libres sobre los lípidos (Bernardi, 1998).

#### Curva de calibración para la cuantificación de MDA.

Para realizar la curva de calibración en la técnica de cuantificación de MDA (Esterbauer y Cheeseman, 1990; Draper y Delhi, 1990), se preparó una solución estándar de concentración 100  $\mu\text{mol/mL}$ . A partir de esta solución se hicieron cinco diluciones y se llevaron a un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  (Ver cuadro 6.2.3.3-1). Se les adicionaron 1.5 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1% y 0.5 mL de TBA 6%. Se incubaron durante 25 minutos y se leyeron en un espectrofotómetro a 530 nm de longitud de onda. Los datos obtenidos de absorbancia se graficaron contra su correspondiente valor de concentración (Figura 6.2.3.3-1).

**Cuadro 6.2.3.3-1. Datos obtenidos para la curva de calibración del método de MDA.** Volúmenes de solución madre, concentraciones corregidas y absorbancias obtenidas en la técnica para cuantificar MDA.

VOLUMEN DE SOLUCIÓN MADRE ( $\mu\text{L}$ )	CONCENTRACIÓN CORREGIDA ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABSORBANCIA
10	4.5	0.160
20	18.2	0.384
30	40.9	0.588
40	72.7	0.817
50	113.6	1.043



Se utilizó la ecuación para calcular la pendiente de una recta:

$$m = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1) = (1.043 - 0.160) / (113.6 - 4.5) = 0.00809$$

Calculando la inversa:  $1/m = 1 / 0.00809 = 123.6$

Y el factor se obtiene multiplicando la inversa de la pendiente por la dilución de la muestra que es 11.

$$\text{FACTOR} = 11 \times 123.6 = 1359.6 \text{ nmol/mL}$$

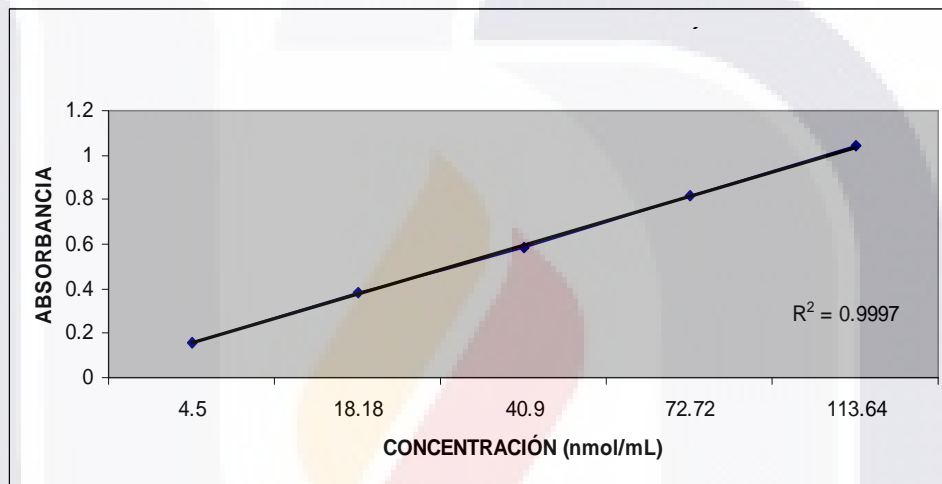


Figura 6.2.3.3-1. Curva de calibración para el método de MDA en plasma y tejidos.

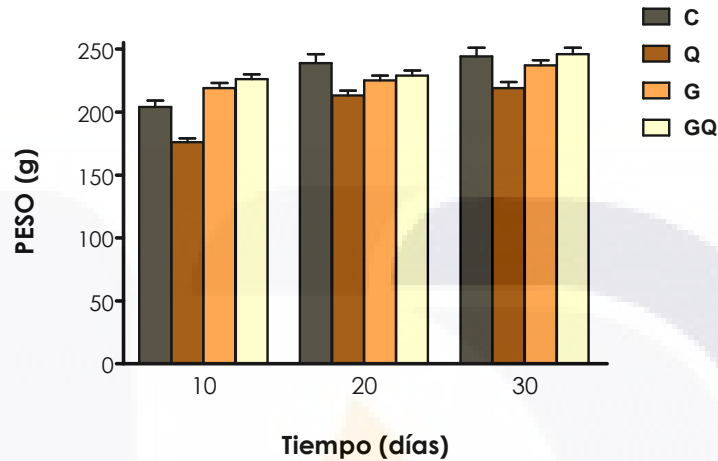
#### 6.2.4. ESTUDIO HISTOLÓGICO

El estudio histológico de cortes de los órganos mediante microscopía óptica es crucial para identificar el sitio, la naturaleza y la severidad de la lesión. Para el estudio histológico los órganos fueron procesados con la Técnica Histológica de Inclusión en Parafina para microscopía óptica (Stevens y Lowe, 2006; Ross y Pawlina, 2006). Al finalizar los 30 días del tratamiento, las ratas se anestesiaron con Pentobarbital Sódico (ip) y fueron perfundidas con formalina neutra (solución de formaldehído al 10%, PBS pH 7.0) para la fijación *in situ* de los órganos. El hígado y los riñones fueron extraídos y se realizaron cortes de 5 μm de grosor que fueron teñidos con la técnica de tinción de hematoxilina y eosina (H/E). Las imágenes fueron capturadas con el sistema Image Pro Plus, Cybernetics.

## 7. RESULTADOS

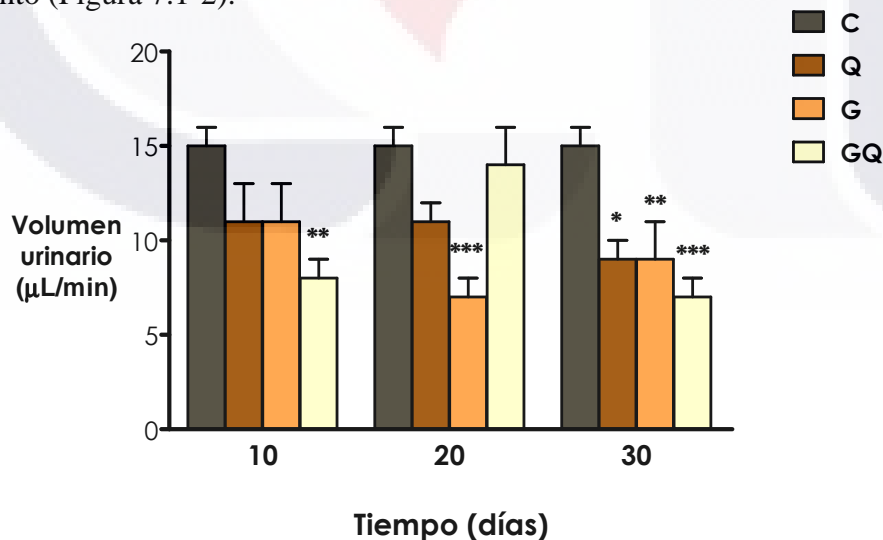
### 7.1. DAÑO RENAL POR GLIFOSATO-EFECTO DE LA QUERCETINA

Con respecto al valor control (C), no se observaron cambios estadísticamente significativos en cuanto al peso corporal para los grupos tratados con quercetina (Q), glifosato (G) y glifosato mas quercetina (GQ) (Figura 7.1-1).



**Figura 7.1-1. Análisis de peso corporal de ratas macho Wistar expuestas a glifosato-efecto quercetina.** C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg).

En cuanto al volumen urinario, se presentaron disminuciones respecto al control, siendo estadísticamente significativas para el grupo Q a los 30 días de tratamiento, para el grupo G a los 20 y 30 días de tratamiento y, para el grupo GQ, a los 10 y 30 días de tratamiento (Figura 7.1-2).

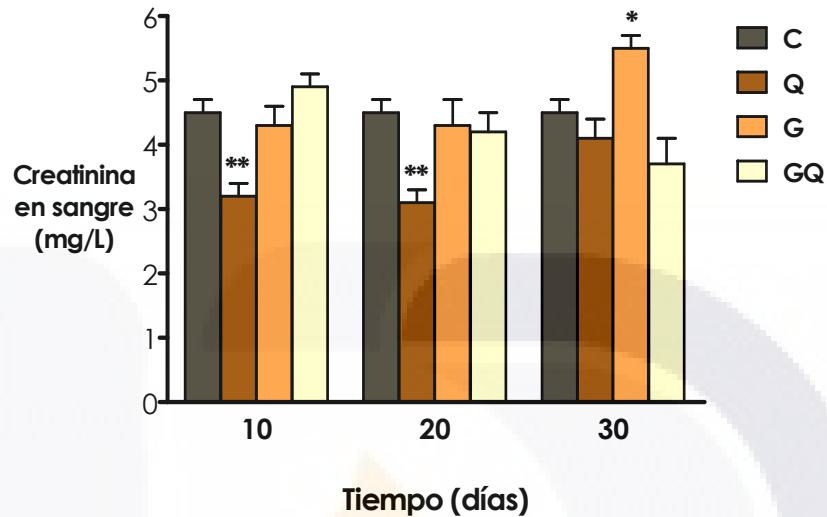


**Figura 7.1-2. Análisis del volumen urinario de ratas macho Wistar expuestas a glifosato-efecto quercetina.**

C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg).

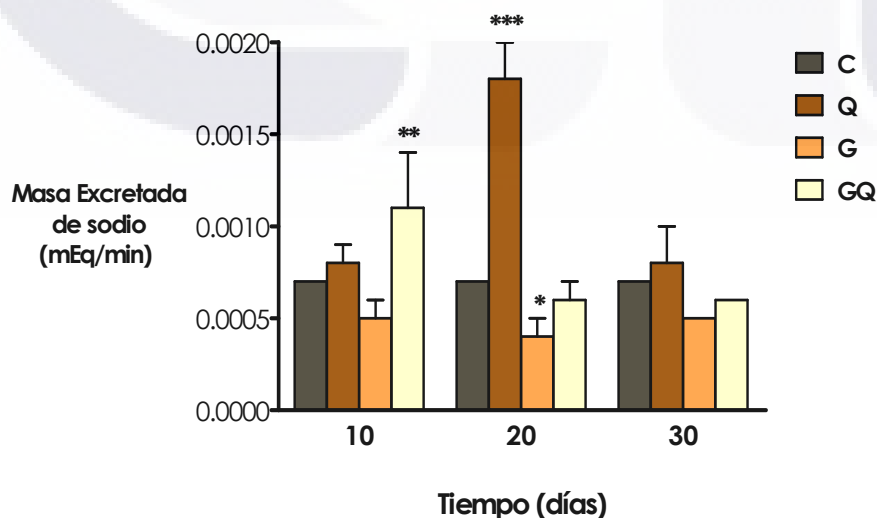
\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$

Con relación al control, a los 10 y 20 días de muestreo, la concentración plasmática de creatinina disminuyó de manera estadísticamente significativa para el grupo Q, mientras que para el grupo G se observó un incremento significativo (Figura 7.1-3).



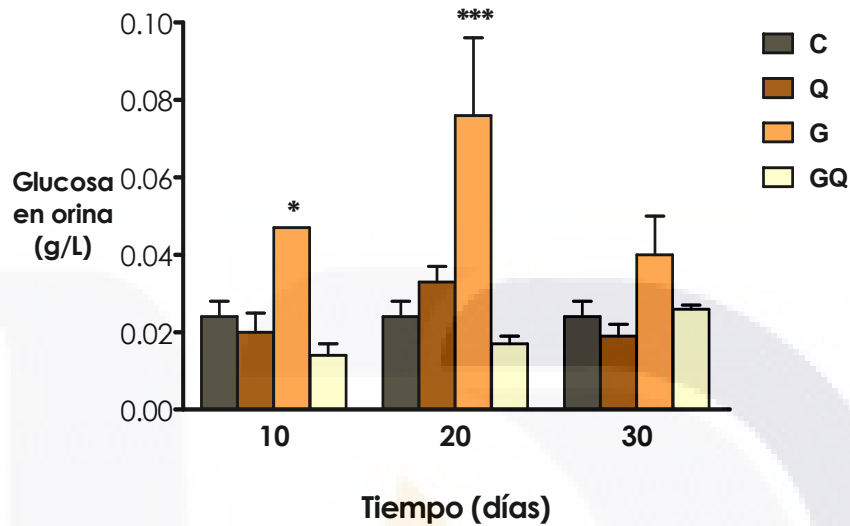
**Figura 7.1-3. Curso temporal del daño renal por glifosato-efecto quercetina.**  
 C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg).  
 \*p<0.05, \*\* p<0.01

En cuanto a la masa excretada de sodio, se observaron incrementos estadísticamente significativos, respecto al grupo control, para los animales tratados con GQ a los 10 días de tratamiento y para el grupo Q a los 20 días de tratamiento (Figura 7.1-4).



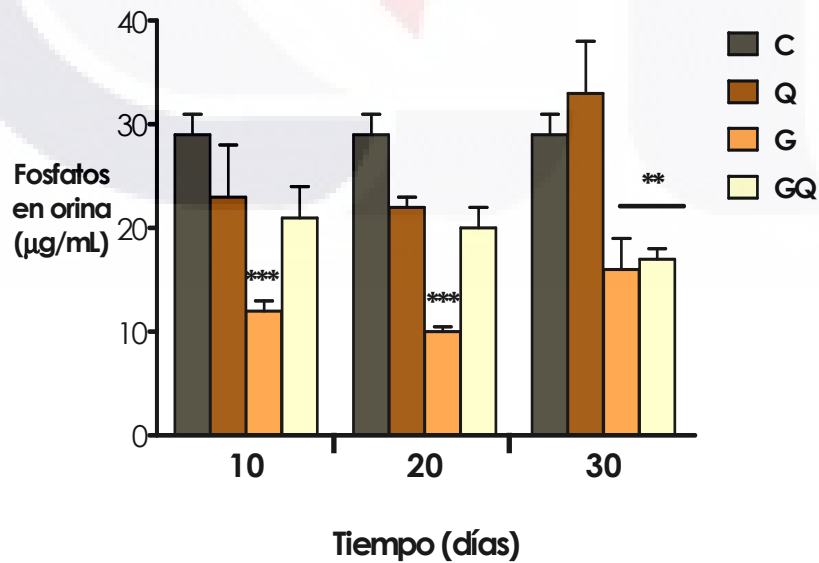
**Figura 7.1-4. Manejo renal de sodio.**  
 C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg).  
 \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*p<0.0001

Respecto al grupo control, la concentración urinaria de glucosa aumentó significativamente a los 10 días de tratamiento para el grupo G, siendo mayor a los 20 días (Figura 7.1-5).



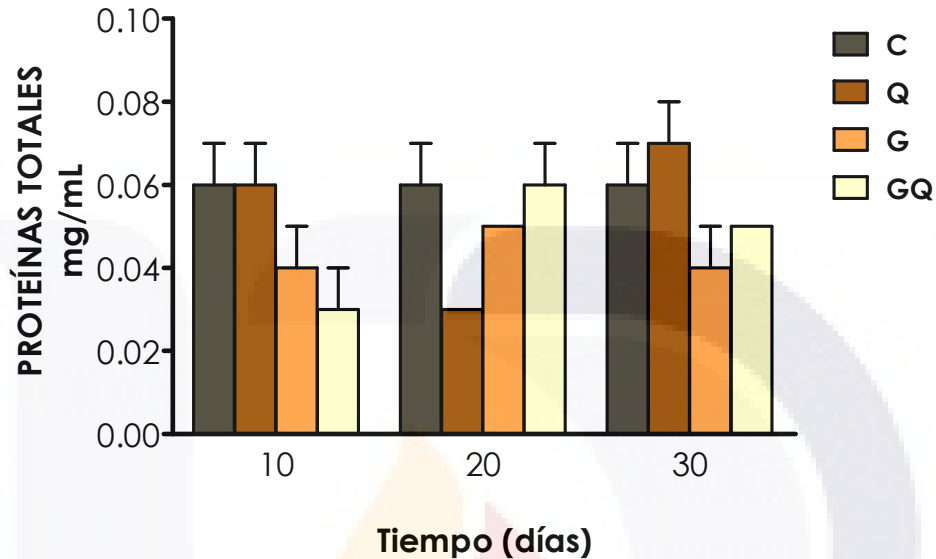
**Figura 7.1-5. Evolución del daño renal producido por el glifosato- efecto quercetina durante el periodo de estudio.** C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0001$

La concentración urinaria de fosfatos disminuyó significativamente, respecto al control, en los tres periodos de muestreo para el grupo G, y para el grupo GQ la disminución significativa se observó a los 30 días (Figura 7.1-6).



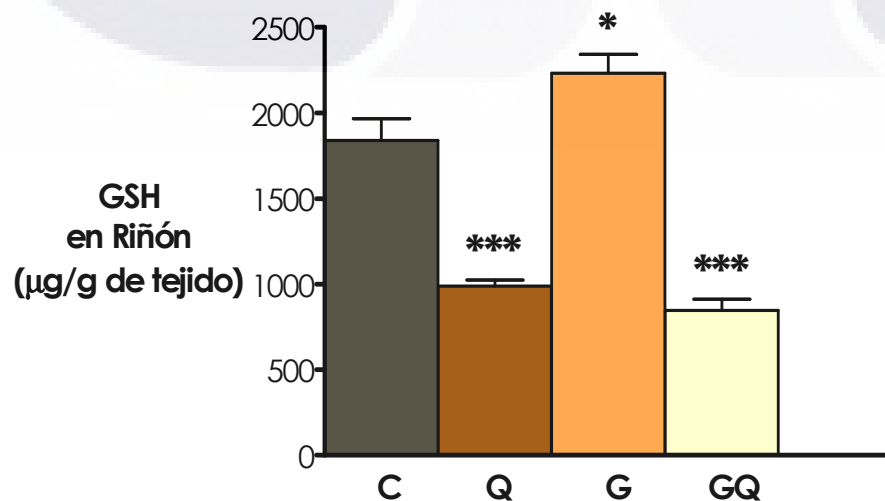
**Figura 7.1-6. Análisis de la concentración de fosfatos urinarios de ratas Wistar machos expuestos a glifosato- efecto quercetina.** C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$

En los periodos muestreados y respecto al grupo control, la concentración urinaria de proteínas totales no mostró cambios estadísticamente significativos para ningún grupo (Figura 7.1-7).



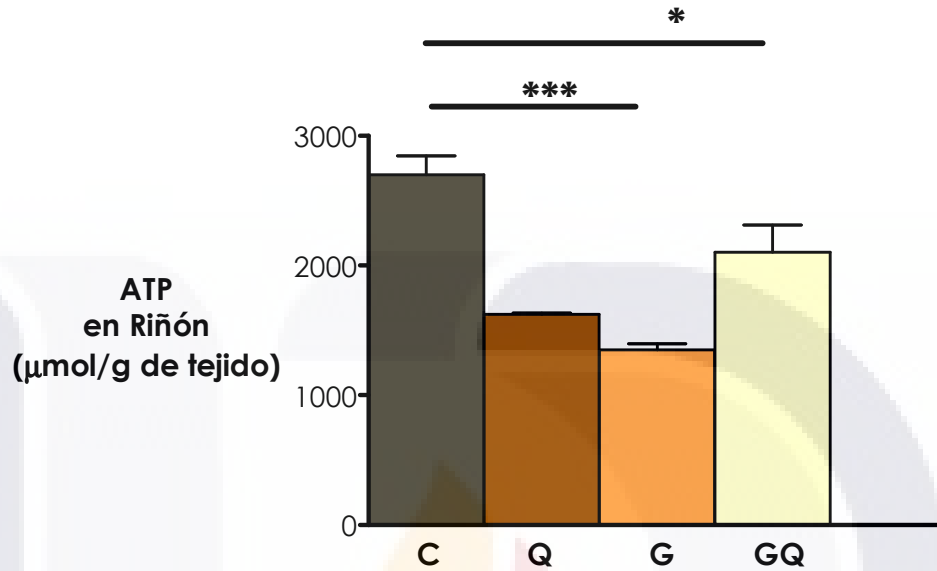
**Figura 7.1- 7. Análisis de la concentración urinaria de proteínas totales de ratas Wistar machos expuestos a glifosato- efecto de la quercetina durante el periodo de estudio.** C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg).  
\*p<0.05, \*\*\*p<0.0001

A los 30 días de tratamiento, la concentración renal de GSH disminuyó significativamente para los grupos Q y GQ, sin embargo, para el grupo G se observó un incremento significativo, con relación al grupo control (Figura 7.1-8).



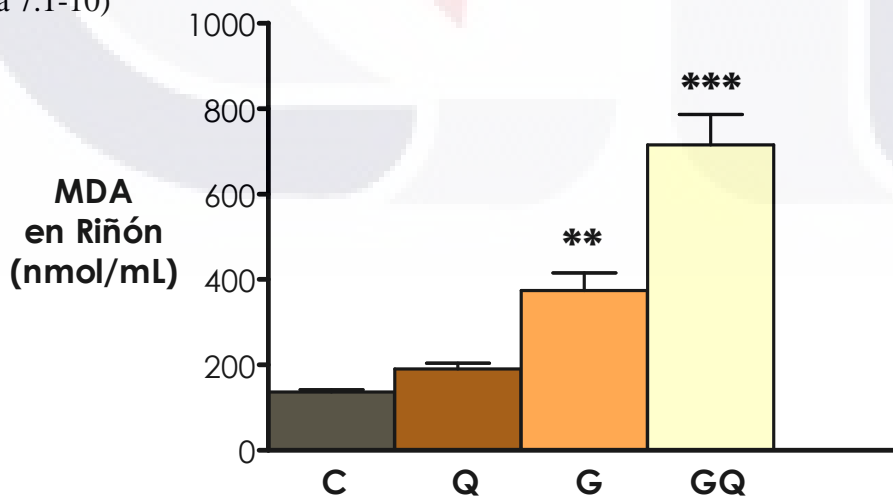
**Figura 7.1-8. Concentración renal de GSH a los 30 días de tratamiento.** C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg).  
\*p<0.05, \*\*\*p<0.0001

Respecto al control, la concentración renal de ATP disminuyó para los tres grupos, siendo altamente significativa la disminución para los grupos Q y G (Figura 7.1-9).



**Figura 7.1-9. Concentración renal de ATP a los 30 días de tratamiento.**  
C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg).  
\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0001$

Respecto al control, la concentración de MDA en los riñones se incrementó significativamente para el grupo G, siendo mayor el incremento para el grupo GQ (Figura 7.1-10)



**Figura 7.1-10. Concentración renal de MDA a los 30 días de tratamiento.**  
C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg).  
\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.0001$

En la figura 7.1-11 se muestra la estructura del riñón que se observó en los diferentes tratamientos. El grupo control presentó el epitelio tubular normal (A). El grupo tratado con quercetina (25 mg/Kg/día, ip) mostró células tubulares con intensa vacuolización (B), de igual forma que el grupo tratado con glifosato (25 mg/Kg/día, sc) (C). En el grupo tratado con glifosato (25 mg/Kg/día, sc) y quercetina (25 mg/Kg/día, ip) se observó desprendimiento de células hacia la luz tubular y células con intensa vacuolización (D).

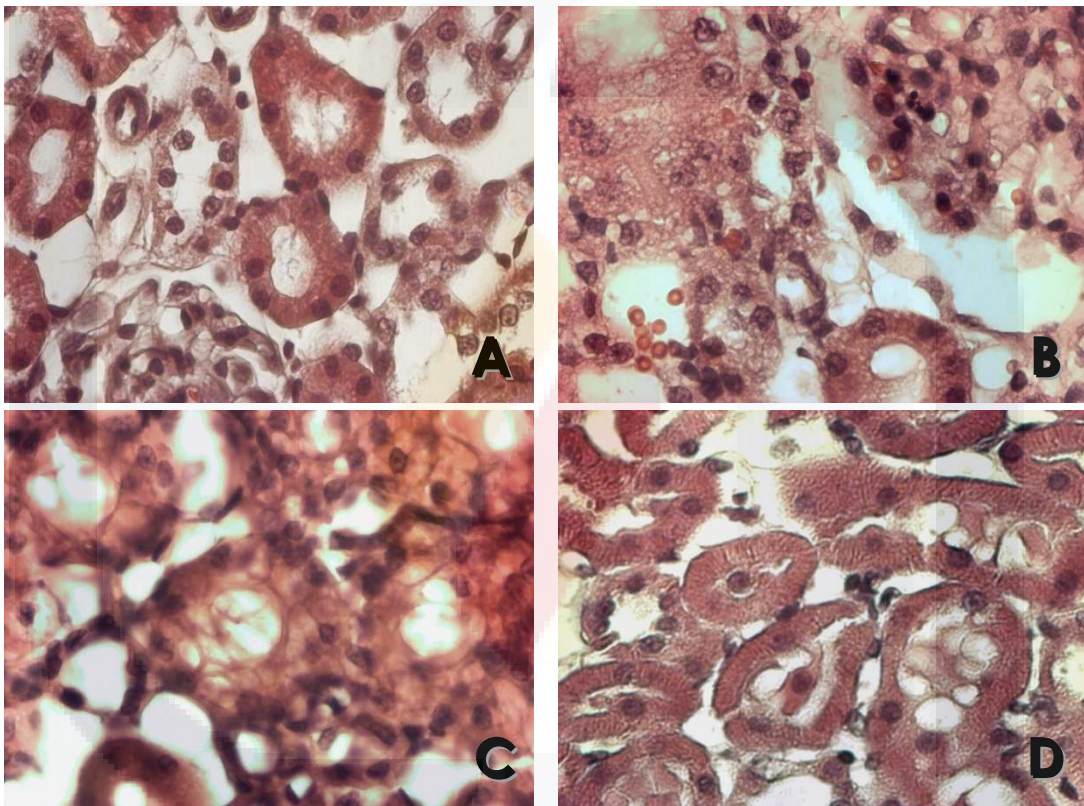
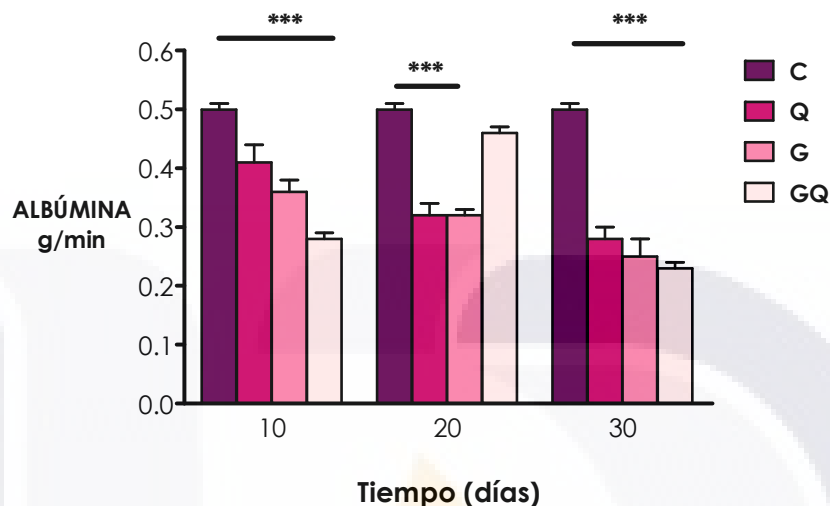


Figura 7.1-11. Fotografías microscópicas de riñón de ratas Wistar machos a los 30 días de tratamiento. H-E. 400x

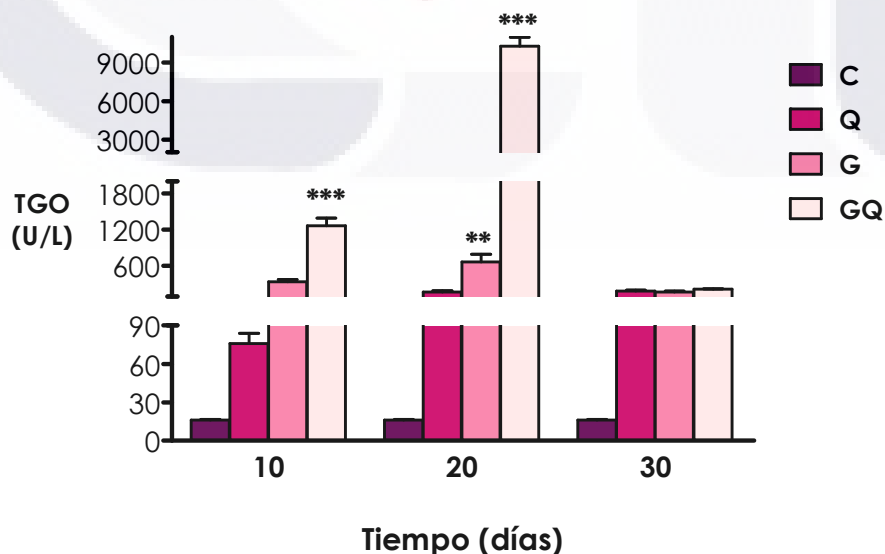
## 7.2. DAÑO HEPÁTICO POR GLIFOSATO- EFECTO QUERCETINA

Respecto al grupo control, la concentración plasmática de albúmina disminuyó significativamente en los tres periodos de muestreo para los tres grupos (Q, G, GQ), excepto para el grupo GQ a los 20 días de tratamiento (Figura 7.2-1).



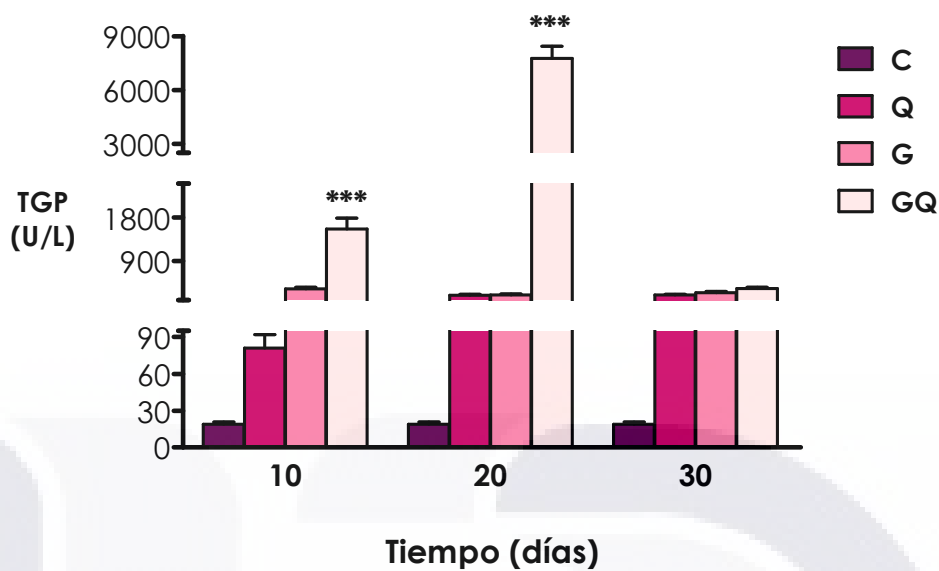
**Figura 7.2-1. Análisis de la concentración hepática de albúmina de ratas Wistar machos expuestas a glifosato- efecto quercetina.** C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg). \*\*\* $p < 0.0001$

Se observaron incrementos en las actividades séricas de la TGO y TGP durante los tres periodos de muestreo, siendo estadísticamente significativos a los 10 y 20 días para el grupo GQ, tanto para TGO como para TGP (Figuras 7.2-2 y 7.2-3). Además, el incremento a los 20 días de tratamiento para el grupo G fue estadísticamente significativo para TGO.



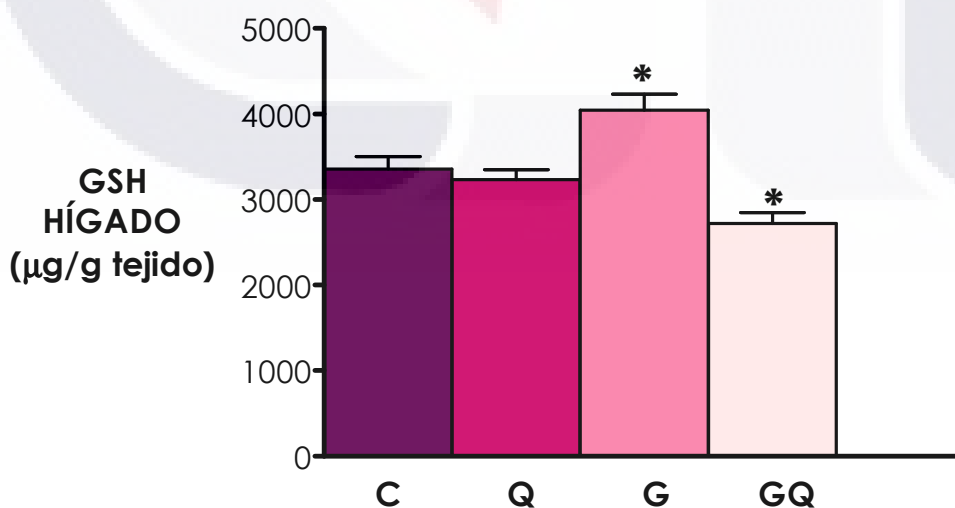
**Figura 7.2-2. Evolución de la actividad plasmática de la TGO, en los cuatro grupos durante el período de estudio.** C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$





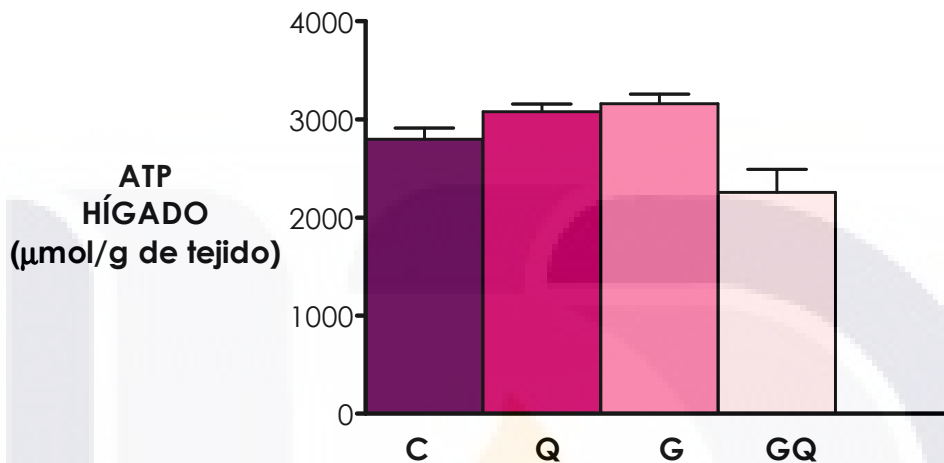
**Figura 7.2-3. Evolución de la actividad plasmática de la TGP, en los cuatro grupos durante el período de estudio.** C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg). \*\*\*p<0.0001

En cuanto a la concentración hepática de GSH, respecto al control, se observó un incremento significativo para el grupo G y una disminución significativa para el grupo GQ, a los 30 días de tratamiento (Figura 7.2-4).



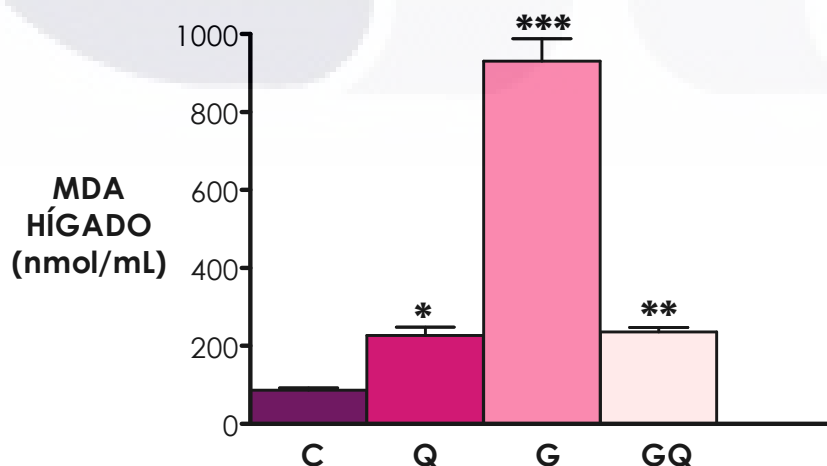
**Figura 7.2-4. Concentración hepática de GSH a los 30 días de tratamiento.** C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), GQ: Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg). \*p<0.05

Respecto al grupo control, a los 30 días de tratamiento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones hepáticas de ATP en los grupos Q, G y GQ, aunque para el último grupo se observó una tendencia a disminuir (Figura 7.2-5).



**Figura 7.2-5. Concentración hepática de ATP a los 30 días de tratamiento.** C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg).

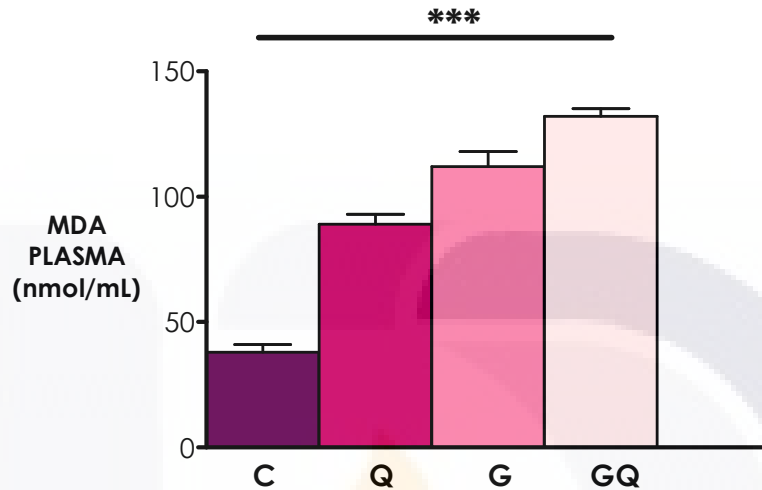
Además, la concentración hepática de MDA aumentó significativamente para los grupos Q, G y GQ, respecto al control, siendo altamente significativo para el grupo G (Figura 7.2-6).



**Figura 7.2-6. Concentración hepática de MDA a los 30 días de tratamiento.** C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg).

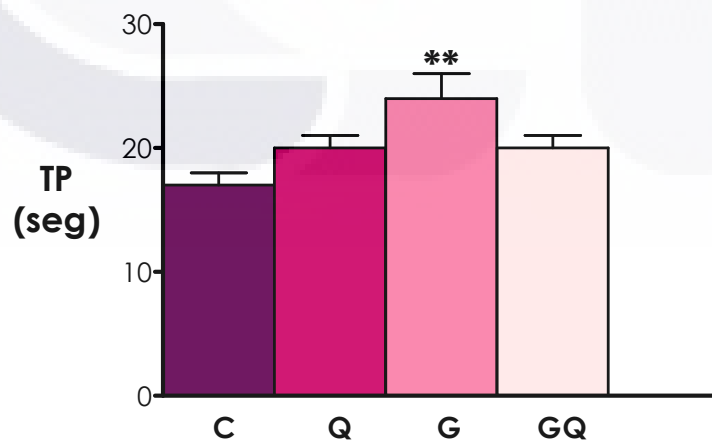
\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.0001

Respecto al control, la concentración plasmática de MDA mostró incrementos estadísticamente significativos para los grupos Q, G y GQ, a los 30 días de tratamiento (Figura 7.2-7).



**Figura 7.2-7. Concentración plasmática de MDA a los 30 días de tratamiento.** C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg).  
\*\*\*p<0.0001

También a los 30 días de tratamiento, respecto al grupo control, aumentaron los tiempos de protrombina para los tres grupos, siendo estadísticamente significativo para el grupo G (Figura 7.2-8).



**Figura 7.2-8. Alteraciones en los tiempos de protrombina a los 30 días de tratamiento.** C: Grupo Control, Q: Grupo Quercetina (25 mg/Kg), G: Grupo Glifosato (25 mg/Kg), Grupo Glifosato (25 mg/Kg) + Quercetina (25 mg/Kg).  
\*\*p<0.01

El estudio histológico del hígado se muestra en la figura 7.2-9. En el grupo control se observó la estructura y organización normal de las células hepáticas (A). El grupo que fue tratado con quercetina (25 mg/Kg/día, ip) muestra algunas células con incremento en acidofilia citoplásmica y con cambios nucleares (B). En el grupo tratado con glifosato (25 mg/Kg/día, sc) se observó daño en los hepatocitos por necrosis, así como zonas con infiltrados inflamatorios (C). El grupo tratado con glifosato (25 mg/Kg/día, sc) y quercetina (25 mg/Kg/día, ip), mostró solo algunos hepatocitos necróticos (D).

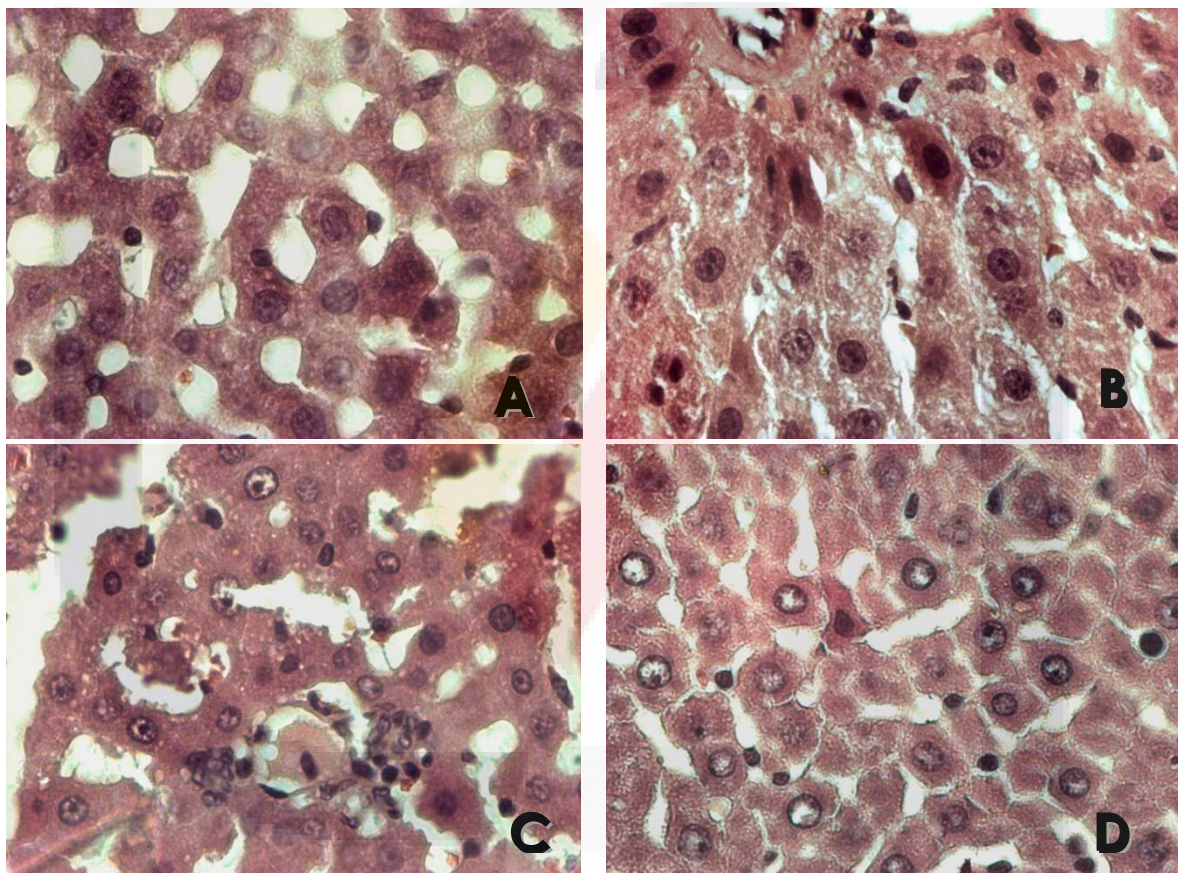


Figura 7.2-9. Fotografías microscópicas de hígado de ratas Wistar machos a los 30 días del tratamiento. H-E. 400x

## 8. DISCUSIÓN

La contaminación ambiental por plaguicidas es un problema preocupante por su uso intensivo en la agricultura. La contaminación de los alimentos, el agua y el aire por estos compuestos y, en consecuencia, los efectos adversos en la salud de los humanos, los animales y los peces parecen inevitables. Debido a estos problemas, en los últimos años ha aumentado el interés por el impacto de los insecticidas y herbicidas en la salud de los humanos (El-Demerdash *et al.*, 2001). Al respecto, el Roundup<sup>®</sup> es un herbicida cuyo ingrediente activo es el Glifosato o N-fosfometil-glicina y la polioxietilnamina (POEA) es el detergente (surfactante) de la presentación comercial.

Aunque se ha descrito que algunos trabajadores expuestos al glifosato han tenido problemas de salud, las acciones tóxicas de este herbicida son poco claras (Richard *et al.*, 2001). Sin embargo, ha sido reportado que el glifosato daña las células de los mamíferos alterando el sistema antioxidante y generando estrés oxidativo (Beuret *et al.*, 2005). Además, el glifosato puede desacoplar la fosforilación oxidativa en las células del hombre y de los animales (Nunkes *et al.*, 1991; WHO, 1993, 1994). En este contexto, como ya se describió, la quercetina es un antioxidante que ha sido utilizado en diversos estudios farmacológicos y toxicológicos (Francescato *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2006). Sin embargo, es importante señalar que la quercetina también tiene propiedades prooxidantes que pueden dañar a las células (Ferraresi *et al.*, 2005; Robaszkiewicz *et al.*, 2007).

Por lo anteriormente descrito, y dado que las intoxicaciones de humanos con glifosato han aumentado en los últimos años (Lin *et al.*, 1999; Hori *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008; Chang y Chang, 2009), en este trabajo se investigó la toxicidad renal y hepática de este herbicida, así como el efecto de la quercetina sobre el daño producido por el glifosato sobre estos órganos.

### **PESO CORPORAL**

El Glifosato (G, 25 mg/kg), la Quercetina (Q, 25 mg/kg) o la combinación de G + Q no modificaron el peso corporal de las ratas, en todos los tiempos estudiados. Este resultado es relativamente similar al reportado por Heydens *et al.*, (2008), aunque ellos utilizaron 600 mg/kg del G, administrado por vía oral o intraperitoneal, en ratones macho de la cepa CrI: CD-1(ICR) BR y observaron el efecto a las 24 horas.

## ***ESTUDIO DEL DAÑO RENAL***

Con relación al grupo control, la concentración de creatinina en la sangre de las ratas tratadas con quercetina disminuyó de manera significativa a los 10 y 20 días de tratamiento, mientras que en el grupo tratado con glifosato aumentó significativamente a los 30 días del tratamiento. Además, el grupo tratado con quercetina + glifosato mostró una disminución de este parámetro comparado con el grupo tratado solamente con glifosato.

Ha sido reportado que en envenenamientos de humanos con glifosato, el daño renal y hepático se presenta con frecuencia y, usualmente, es la manifestación de la disminución del flujo sanguíneo de estos órganos (Bradberry *et al*, 2004). Al respecto, conviene señalar que la creatinina (principal metabolito de la creatina) es eliminada del plasma sanguíneo fundamentalmente por filtración glomerular para ser luego excretada en la orina. No hay una “recirculación” de la creatinina, razón por la cual la eliminación o depuración de esta sustancia es un indicador eficaz de la filtración glomerular (Fischbach, 1997). En nuestro estudio, el incremento de la concentración sérica de creatinina en los animales tratados con glifosato refleja una caída de la filtración glomerular, fenómeno que fue revertido por la quercetina. Tal efecto puede deberse a la acción vasodilatadora de la quercetina la cual, al incrementar la circulación sanguínea de los riñones, mejora la intensidad de la filtración glomerular (Nijveldt *et al*, 2001; Drago *et al*, 2006).

En este trabajo también se encontró que, con relación al grupo control, el flujo urinario disminuyó significativamente en los grupos tratados con glifosato (20 y 30 días), quercetina (30 días) y glifosato + quercetina (10 y 30 días). Regulado por los riñones, el volumen de orina refleja la homeostasis global de líquidos en el organismo. Por ello, la determinación del flujo urinario aporta datos útiles respecto a la integridad y función de los riñones (Fischbach, 1997). Así, la oliguria encontrada en este trabajo puede relacionarse con el daño renal causado por el glifosato y sugiere la existencia de necrosis tubular aguda (Hamilton y Rose, 1985). En este contexto, ha sido publicado que en humanos intoxicados de manera aguda con glifosato, se presenta una disfunción multiorgánica y las causas de la muerte se relacionan con el daño renal y pulmonar; además, en los pacientes intoxicados con este herbicida, la concentración elevada de creatinina en la sangre, la acidosis metabólica y la taquicardia fueron factores de pronóstico malo con relación a la mortalidad (Lee *et al*, 2008).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Nuestros resultados también identificaron la existencia de daño funcional de las células proximales de la nefrona. En efecto, con relación al grupo control, la masa excretada de sodio aumentó significativamente en las ratas tratadas con glifosato + quercetina (10 días), así como en los animales tratados con quercetina (20 días). Con relación a la eliminación de glucosa, su concentración en la orina aumentó significativamente en el grupo tratado con glifosato (10 y 20 días), sin cambios significativos en los otros grupos, comparados con los animales controles. A su vez, la concentración urinaria de fosfatos disminuyó significativamente, respecto al control, en el grupo tratado con glifosato (10, 20 y 30 días), así como en las ratas tratadas con glifosato + quercetina (30 días).

La reabsorción proximal del sodio filtrado en los glomérulos renales, desde la luz tubular hasta los capilares peritubulares, ocurre en dos etapas: el sodio ingresa a las células a través de la membrana apical ya sea utilizando un acarreador transmembranal, que también puede reabsorber otras sustancias, o por difusión a través de canales selectivos. En seguida, el sodio es transportado activamente, en la membrana basolateral, por la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  para pasar desde el interior de la célula hasta el líquido peritubular. Para ello, las células proximales proporcionan el sustrato energético (ATP) requerido por las bombas de sodio y potasio (Rector, 1983; Katz, 1982).

Por otra parte, ha sido descrito que la reabsorción proximal de glucosa y de fosfatos se encuentra acoplada a la reabsorción de sodio, a través de la membrana luminal, utilizando un acarreador transmembranal: sodio-glucosa o sodio-fosfatos (Ullrich *et al.*, 1974; Knox y Haramati, 1985). De esta manera, el bloqueo de la reabsorción del sodio bloquea la reabsorción de glucosa y de fosfatos. Cuando este fenómeno se presenta aumenta la excreción urinaria de estas sustancias. Es importante señalar que lo anteriormente descrito se relaciona de manera estrecha con la eliminación urinaria de glucosa, pero en el caso de la excreción de fosfatos paradójicamente hubo retención de estos electrolitos.

Ahora bien, la determinación de sodio urinario evalúa el desequilibrio de electrolitos que acompañan a los trastornos renales. Así, el aumento o la disminución de las concentraciones de sodio en la orina pueden indicar la presencia de insuficiencia renal. En las ratas tratadas con glifosato, las concentraciones plasmáticas de glucosa podrían estar disminuidas a causa de su elevada excreción urinaria. Al respecto, la hipoglucemia ha sido involucrada como uno de los factores relevantes que explican el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

incremento de la vasoconstricción renal y la caída de la velocidad de filtración glomerular, en ratas con daño renal y hepático (Moore, 1999; Jaramillo *et al*, 2008). En este contexto, las alteraciones producidas por el glifosato se asemejan a un cuadro de insuficiencia renal por lesión parenquimatosa o necrosis tubular aguda (NTA), ya que durante este trastorno existe caída de la filtración glomerular, aumento de la creatinina sérica, oliguria e hiperazoemia (Peña, 2005).

En nuestro estudio, a los 30 días de tratamiento, la concentración renal de ATP disminuyó significativamente en los grupos que recibieron quercetina, glifosato y quercetina + glifosato, comparados con el grupo control. En el caso de la quercetina, este fenómeno puede estar relacionado con su acción prooxidante (Pérez, 2003). A su vez, ha sido reportado que el glifosato desacopla la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, lo que conduce a la disminución de la concentración del ATP celular (Bababunmi *et al*, 1978; Nunkes *et al.*, 1991; WHO, 1993, 1994). Además, con relación al grupo control, la concentración renal de malondialdehído (MDA) aumentó de manera significativa en los grupos tratados con glifosato y quercetina + glifosato. En ambos casos, este fenómeno se puede relacionar con la capacidad del glifosato para aumentar el estrés oxidativo celular y la lipoperoxidación (Beuret *et al*, 2005).

Por otra parte, a los 30 días de tratamiento, la concentración renal de GSH disminuyó de manera significativa en los grupos que recibieron quercetina o glifosato + quercetina, mientras que en el grupo tratado solamente con glifosato se presentó un incremento significativo. El aumento de la concentración renal de GSH en el grupo tratado con glifosato puede deberse a que este herbicida genera una respuesta antioxidante mayor que cuando se administra en conjunto con la quercetina. A su vez, la disminución de la concentración renal de GSH observada en los grupos tratados con quercetina, puede deberse a los efectos prooxidantes de este compuesto.

Finalmente, se sabe que el análisis estructural del tejido renal proporciona datos valiosos en alteraciones fisiopatológicas como la glomerulonefritis aguda y crónica, la pielonefritis y la necrosis tubular aguda, entre otras. (Hamilton y Rose, 1985; Fischbach, 1997). En este trabajo el glifosato produjo vacuolización y necrosis de las células tubulares. Estos efectos no fueron revertidos por la quercetina, ya que en los animales tratados con glifosato + quercetina se encontró desprendimiento de células epiteliales hacia la luz tubular y células con vacuolización intensa. Además, los



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

animales tratados solamente con quercetina presentaron vacuolización en las células tubulares renales.

### ***ESTUDIO DEL DAÑO HEPÁTICO***

Con relación al grupo control, la actividad plasmática de la TGO aumentó significativamente en los animales tratados con glifosato (20 días de tratamiento), así como en las ratas tratadas con glifosato + quercetina (10 y 20 días). Además, la actividad plasmática de la TGP también aumentó significativamente en el grupo glifosato + quercetina (10 y 20 días).

En presencia de necrosis celular, los hepatocitos se destruyen y las enzimas TGP y TGO pasan del citoplasma al torrente sanguíneo, aumentando sus actividades en este fluido en cantidades proporcionales a la lesión del hígado. Por ello, la determinación de la actividad sérica de estas enzimas facilita la identificación de hepatopatías agudas y de otros padecimientos (Lynch *et al.*, 1977; Hamilton y Rose, 1985; Fischbach, 1997).

Así, el aumento en la actividad sérica de la TGO producida por el glifosato se puede relacionar con su efecto oxidante, el cual se manifiesta por la lipoperoxidación y el daño membranal de células hepáticas (Beuret *et al.*, 2005). Además, ha sido reportado que la exposición subcrónica de ratas Wistar al glifosato aumenta la actividad sérica TGO y TGP (Benedetti *et al.*, 2004). Asimismo, la administración del glifosato a ratones (600 mg/kg, oral o ip) también aumentó la actividad plasmática de las aminotransferasas estudiadas, 24 horas posteriores a su administración (Heydens *et al.*, 2008). Sin embargo, el glifosato inhibe la actividad de éstas y otras enzimas cuando se estudia in vitro (El-Demerdash *et al.*, 2001). Desafortunadamente, la quercetina no revirtió la necrosis de los hepatocitos producida por el glifosato, ya que las actividades plasmáticas de la TGP y TGO aumentaron en los animales tratados con glifosato + quercetina. Esto puede deberse a la sinergia prooxidante del herbicida estudiado y de la quercetina (Ferraresi *et al.*, 2005; Robaszkiewicz *et al.*, 2007).

Por otra parte, respecto al grupo control, la concentración de albúmina en plasma disminuyó significativamente en los animales tratados con quercetina (10, 20 y 30 días), glifosato (10, 20 y 30 días) y glifosato + quercetina (10 y 30 días). Cabe destacar que en este último grupo, la concentración de albúmina sérica fue semejante al control a los 20 días de tratamiento.

La albúmina es una proteína plasmática sintetizada por el hígado que mantiene la presión oncótica en los vasos sanguíneos (evitando con ello la fuga de agua desde los capilares) y transporta en la sangre a las sustancias insolubles en agua. Por ello, su cuantificación en el plasma sanguíneo contribuye a la identificación de hepatopatías (Hamilton y Rose, 1985; Fischbach, 1997).

Dado que en nuestro estudio las concentraciones urinarias de proteínas totales no mostraron incrementos significativos, la disminución en la concentración plasmática de albúmina se relaciona con daño hepático que afecta la producción de esta proteína. Sin embargo, de manera paradójica, los resultados de este trabajo también sugieren que la quercetina puede proteger de manera parcial contra el daño hepático producido por el glifosato (síntesis de albúmina), debido probablemente a su acción antioxidante (Sánchez *et al*, 2005; Amália *et al*, 2007).

Otro efecto que apoya la toxicidad hepática del glifosato es el aumento del tiempo de protrombina, el cual involucra la actividad de cuatro factores de la coagulación que son sintetizados por el hígado. Este efecto concuerda con los resultados de Yousef *et al* (1999) quienes demostraron que la administración del glifosato, a conejos, altera todos los parámetros hematológicos estudiados.

Con relación a la concentración de GSH en el hígado, ésta aumentó en los animales tratados con glifosato y disminuyó en las ratas tratadas con glifosato + quercetina. La reversión del efecto del glifosato sobre el GSH, producido por la quercetina, puede explicarse porque este flavonoide estimula la salida del GSH de los hepatocitos (Leslie *et al*, 2003). Conviene señalar que la forma reducida del glutatión detoxifica a muchos xenobióticos y metabolitos reactivos. Por ello, la cuantificación del GSH es un indicador de la capacidad antioxidante de las células ya que su reducción, en un 20-30 %, produce una marcada incapacidad celular para amortiguar las acciones de los compuestos tóxicos (Reed, 1994).

En este contexto, a los 30 días de tratamiento y con relación al control, la concentración hepática de malondialdehído (MDA) aumentó significativamente en los grupos tratados con quercetina, glifosato (el mayor aumento) y quercetina + glifosato. Sin embargo, conviene señalar que en este último grupo la concentración de MDA disminuyó de manera altamente significativa, comparado con el grupo que solo recibió glifosato. El incremento en la concentración de MDA en el hígado indica un daño por estrés oxidativo causado por el glifosato, lo cual se puede relacionar con la capacidad de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

este herbicida para aumentar la lipoperoxidación en las células hepáticas (Beuret *et al*, 2005).

Además, a los 30 días de tratamiento y con relación al control, la concentración de MDA en el plasma aumentó significativamente en los grupos tratados con quercetina, glifosato y quercetina + glifosato (el mayor aumento). Esto puede deberse a la sinergia prooxidante del herbicida estudiado y de la quercetina (Ferraresi *et al*, 2005; Robaszkiewicz *et al*, 2007).

Finalmente, en el hígado de las ratas tratadas con quercetina se encontraron células con incremento de acidofilia citoplásmica y cambios nucleares. El glifosato produjo necrosis de hepatocitos y zonas con infiltrado inflamatorio. A su vez, los animales tratados con quercetina + glifosato presentaron algunos hepatocitos necróticos. El daño estructural producido por el glifosato (necrosis de células hepáticas) se relaciona con el incremento en las actividades plasmáticas de las transaminasas estudiadas (TGO y TGP).

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de este trabajo muestran que el glifosato altera varios procesos fisiológicos y bioquímicos del hígado y de los riñones, por lo que puede considerarse que la toxicidad de este herbicida es inespecífica. Asimismo, no se puede descartar que los metabolitos del glifosato puedan generar también efectos tóxicos. Además, se demostraron algunas acciones antioxidantes y prooxidantes de la quercetina. En varios de los parámetros estudiados se encontró una correlación entre los efectos bioquímicos y el daño estructural producido por el glifosato.

- ▲ El glifosato produjo vacuolización y necrosis de las células tubulares renales, efectos que no fueron revertidos por la quercetina.
- ▲ Las alteraciones bioquímicas observadas a nivel renal tales como, incrementos en la concentración sérica de creatinina y la oliguria, se asemejan a un cuadro de insuficiencia renal parenquimatosa o NTA.
- ▲ La disminución en la concentración renal de ATP se relaciona con la capacidad del glifosato para desacoplar la fosforilación oxidativa en las mitocondrias.
- ▲ Los incrementos en la concentración de MDA indican la capacidad de este herbicida para incrementar la lipoperoxidación tanto en plasma como en células renales y hepáticas. Estas alteraciones en el hígado y plasma, no fueron revertidas por la quercetina, de forma contraria, parece existir una sinergia prooxidante del glifosato y la quercetina. No siendo así a nivel renal, donde parece existir un efecto protector antioxidante por la quercetina.
- ▲ Otros efectos que apoyan la toxicidad hepática de este herbicida son, los incrementos en las actividades de las transaminasas, el aumento en el tiempo de protrombina y la disminución en la concentración plasmática de albúmina.
- ▲ La quercetina no revirtió la necrosis de los hepatocitos producida por el glifosato; sin embargo, los resultados también sugieren la protección parcial de la quercetina, referente a la síntesis de albúmina.

Finalmente, estos resultados podrían ayudar a mejorar el tratamiento de los individuos intoxicados con el glifosato.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Abilés J: Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico. Editorial de la Universidad de Granada, 2007. Disponible en: <http://hera.ugr.es/tesisugr/16710794.pdf>
- ❖ Adams H: Adenosine-5-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase. In methods of enzymatic analysis (Bergmeyer Ed.), Academic Press, pp 539-543, 1963.
- ❖ Almeida WF: Vigilancia sistemática del ambiente. Residuos de plaguicidas. En Albert LA (Ed.), Plaguicidas Salud y Ambiente. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, México, 1986.
- ❖ Amália PM, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS: Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Dig Dis Sci*, 52(10): 2616-21, 2007.
- ❖ Amerio P, Motta A, Toto P, Pour SM, Pajand R, Feliciani C, Tulli A: Skin toxicity from glyphosate-surfactant formulation. *J Toxicol Clin Toxicol*, 42(3):317-319, 2004.
- ❖ Anjaneyulu M, Chopra K: Quercetin, an anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 31(4): 244-8, 2004.
- ❖ Bababunmi EA, Olorunsogo OO, Bassir O: Toxicology of glyphosate in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 45(1): 319-320, 1978.
- ❖ Bababunmi EA, Olorunsogo OO, Bassir O: The uncoupling effect of N-(phosphonomethyl) glycine on isolated rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol*, 28(6):925-927, 1979.
- ❖ Badii MH, Landeros J: Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *CUICYT Toxicología de Plaguicidas*, 4(19): 21-34, 2007.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ❖ Banerjee BD, Seth V, Ahmed R S: Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev Environ Health*, 16: 1- 40, 2001.
  - ❖ Baylis AD: Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Manag Sci*, 56: 299-308, 2000.
  - ❖ Bello J, López de Cerain A: *Fundamentos de Ciencia Toxicológica*. Editorial Díaz de Santos, 1a.Ed, pp. 219-232, 2001.
  - ❖ Benedetti AL, Vituri Trentin AG, Dominguez MA, Alvarez M: The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to herbicide Glyphosate-Biocarb. *Toxicol Lett*, 153(2): 227-232, 2004.
  - ❖ Benítez Zequeira DE: Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed*, 25(2), 2006.
  - ❖ Bernardi P. Mitochondria in cell death (preface). *Biochem Biophys Acta*, 1366: 1-2, 1998.
  - ❖ Beuret CJ, Zirulnik F, Gimenez MS: Effect of the herbicide glyphosate on liver peroxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reprod Toxicol*. 19(4): 501-504, 2005.
  - ❖ Boots AW, Kubben N, Haenen G, Bast A: Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation. *Biochem Biophys Res Commun*, 308(3): 560-565, 2003.
  - ❖ Boots AW, Balk JM, Bast A, Haenen G: The reversibility of the glutathionyl-quercetin adduct spreads oxidized quercetina-induced toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 338:923-929, 2005.
  - ❖ Boots AW, Li H, Schins R, Duffin R, Heemskerk J, Bast A, Haenen G: The quercetina paradox. *Toxicol Appl Pharmacol*, 222(1): 89-96, 2007.

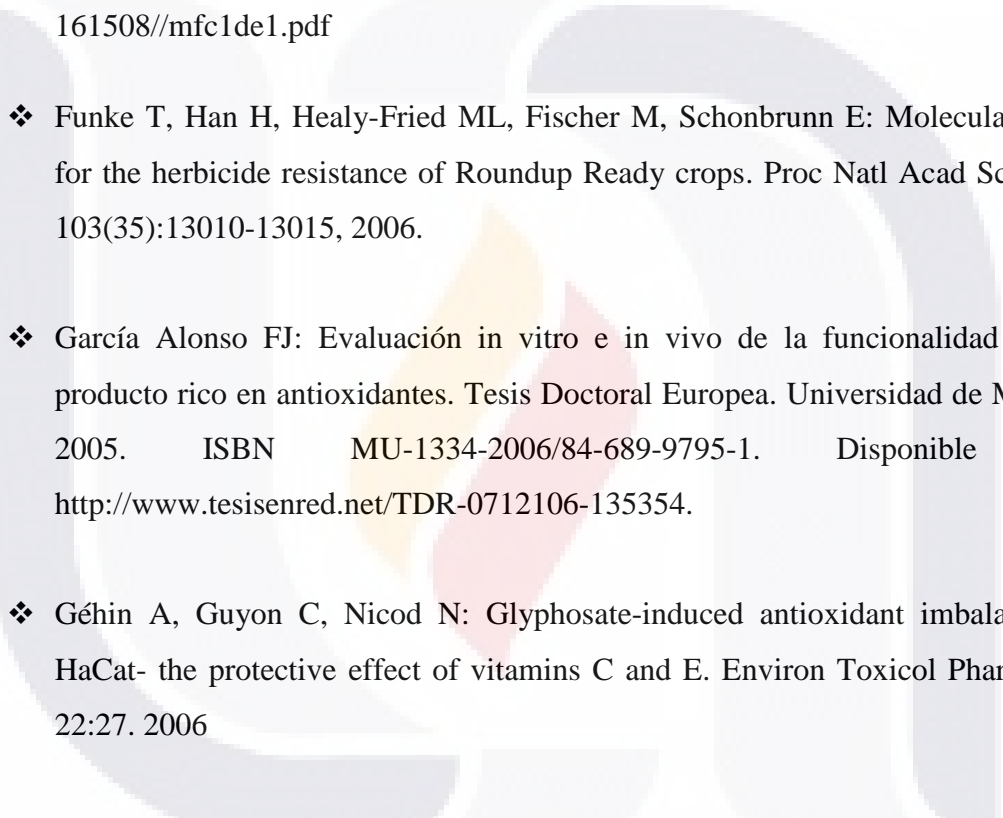
- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ❖ Bradberry SM, Proudfoot AT, Vale JA: Glyphosate poisoning. *Toxicol Rev*, 23(3): 159-167, 2004.
  - ❖ Brewster DW, Warren J, Hopkins WE: Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats-tissue distribution, identification and quantization of glyphosate-derived materials following a single oral dose. *Fundam Appl Toxicol*, 17(1): 43-51. 1991.
  - ❖ Burger M, Fernández S: Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. *Rev Med Uruguay*, 20: 202-207, 2004.
  - ❖ Cartigny B, Azaroual N, Imbenotte M, Mathieu D, Vermeersch G, Goullé JP, Lhermitte M: Determination of glyphosate in biological fluids by  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. *Forensic Sci Int*, 143(2-3):141-145, 2004.
  - ❖ Castell JV: El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos. Cap. 3 pp 95-123. Disponible en: [http://www.uv.es/jcastell/Metabolismo\\_de\\_farmacos](http://www.uv.es/jcastell/Metabolismo_de_farmacos). (consultada mayo 2008).
  - ❖ Chan PC: Mahler J. F. Technical report on toxicity studies of glyphosate administered in dose feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Natl Toxicol Progr Tech Rep Ser*, 16: 1-39, 1992.
  - ❖ Chan YC, Chang SC, Hsuan SL, Chien MS, Lee WC, Kang JJ, Wang SC, Liao JW: Cardiovascular effects of herbicides and formulated adjuvants on isolated rat aorta and heart. *Toxicol In Vitro* 21(4):595-603, 2007.
  - ❖ Chang CB, Chang C-C: Refractory cardiopulmonary failure after glyphosate surfactant intoxication: A case report. *J Occup Med Toxicol*, 4:2, 2009.
  - ❖ Choi EJ, Chee KM, Lee BH: Anti-prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *Eur J Pharmacol*, 482(1-3): 281-285, 2003.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ❖ Cohn VH, Lyle J: A fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem*, 14: 434-440, 1966.
  - ❖ Cremlyn R: *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica*. Editorial Limusa. México, 1985.
  - ❖ Cox C: Glyphosate, Part 2: Human exposure and ecological effects. En: *Journal of Pesticides Reform*, Volume 15, Number 4, Winter 1995. Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides, Eugene, OR, USA, pp 14.
  - ❖ Da Silva EL, Piskula MK, Yamamoto N, Moon JH, Terao J: Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Lett*, 430(3): 405-408, 1998.
  - ❖ Davis W, Ronai Z, Tew K D: Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 296, 1.2001.
  - ❖ DeFeudis FV: Bilobalide and neuroprotection. *Pharmacol Res*, 46: 565-568, 2002.
  - ❖ Deneke A, Fanburg B: Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol*, 257, L163. 1989.
  - ❖ Dinham B: "Life sciences" take over. En: *Pesticides News* 44: 7, June 1999. The Pesticides Trust. PAN-Europe. London, UK.
  - ❖ Doumas B: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta*, 31: 87-96, 1971.
  - ❖ Drago Serrano ME, López López M, Sainz Espuñes TR: Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4): 58-68, 2006.



- ❖ Draper H, Hadley M: Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol.* 186: 421-431, 1990.
- ❖ Duque Zambrone FA: ¿Defensivos agrícolas o agrotóxicos? *Ciencia Hoje*, 22 (4): 42-52, 1986.
- ❖ El-Demerdash FM, Yousef MI, Elagamy EI: Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on the activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (in vitro). *J Environ Sci Health B.* 36(1):29-42, 2001.
- ❖ Eslava Mocha PR, Ramírez Duarte WF, Rondon Barragán IS: Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: Impacto en peces nativos. 1ª Ed. Unillanos-(IIOC-IALL), 2007.
- ❖ Esterbauer H, Cheeseman KH: *Methods Enzymol*, 186:407, 1990.
- ❖ Fernández J, Osorio OA: Función hepática de trabajadores ocupacionalmente expuestos a solventes orgánicos mixtos en una industria petroquímica. *Invest Clín*, 42(2): 87-107, 2001.
- ❖ Ferraresi R, Troiano L, Roat E, Lugli E, Nemes E, Nasi M, Pinti M, Fernandez MI, Cooper EL, Cossarizza A: Essential requirement of reduced glutathione (GSH) for the anti-oxidant effect of the flavonoid quercetin. *Free Radic Res* 39(11):1249-58, 2005.
- ❖ Francescato HD, Coimbra TM, Costa RS, Bianchi L: Protective effect of quercetin on the evolution of cisplatin-induced acute tubular necrosis. *Kidney Blood Press Res*, 27(3): 148-58, 2004.
- ❖ Franz JE, Mao MK, Sikorski JA. *Glyphosate: A Unique Global Herbicide.* ACS Monograph 189, American Chemical Society: Washington, DC, 653 pp. 1997.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ❖ Fiorani M, Accorsi A, Cantoni O: Human red blood cells as a natural flavonoid reservoir. *Free Radic Res*, 37(12): 1331-1338, 2003.
  - ❖ Fischbach FT: Manual de pruebas diagnósticas. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 5ª. Edición. México. 1149 pp. 1997.
  - ❖ Fitó Colomer M: Efectos antioxidantes del aceite de oliva y de sus compuestos fenólicos. Tesis doctoral, Universidad de Barcelona, 2003. Disponible en: [http://www.tdcat.cesca.es/TESIS\\_UAB/AVAILABLE/TDX-0701104-161508//mfc1de1.pdf](http://www.tdcat.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0701104-161508//mfc1de1.pdf)
  - ❖ Funke T, Han H, Healy-Fried ML, Fischer M, Schonbrunn E: Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(35):13010-13015, 2006.
  - ❖ García Alonso FJ: Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis Doctoral Europea. Universidad de Murcia. 2005. ISBN MU-1334-2006/84-689-9795-1. Disponible en: <http://www.tesisenred.net/TDR-0712106-135354>.
  - ❖ Géhin A, Guyon C, Nicod N: Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCat- the protective effect of vitamins C and E. *Environ Toxicol Pharmacol*. 22:27. 2006
  - ❖ Gillion R: Pesticides in the hydrological system-what do we know and what's next? *Hydrol Process*. 15: 3197. 2001.
  - ❖ 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.
  - ❖ Groff JL, Gropper SS, Hunt SM: *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. 2<sup>nd</sup> Ed. West Publishing Co., St. Paul, MN. 165-166 pp, 1995.



- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ❖ Gutiérrez Salinas J. ¿Qué sabe usted acerca de Radicales libres? Rev Mex Cien Farm, 37(004): 69-73. 2006.
  - ❖ Hamilton HK, Rose MB: Manual de diagnóstico clínico. Ed. Interamericana. 1ª. Edición. México. 81-533 pp, 1985.
  - ❖ Henao HS, Corey OG: Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. México. pp 1-26. 1991.
  - ❖ Hietanen E, Linnainmaa K, Vainio H: Effects of phenoxiherbicides and glyphosate on the hepatic and intestinal biotransformation activities in the rat. Acta Pharmacol et Toxicol. 53(2):103-112. 1983.
  - ❖ Hori Y, Fujisawa M, Shimada K, Hirose Y: Determination of the herbicide glyphosate and its metabolite in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry. A case of poisoning by roundup herbicide. J Anal Toxicol, 27(3):162-166, 2003.
  - ❖ Hsiao CT, Lin LJ, Hsiao KY, Chou MH, Hsiao SH: Acute pancreatitis caused by severe glyphosate-surfactant oral intoxication. Am J Emerg Med, 26(3):384.e3-e5, 2008.
  - ❖ Ishiguro M, Mikasa S, Otani M: A case of acute poisoning caused by the inhalation of a nonselective herbicide REBIN GT SC (butafenacil and glyphosate isopropylamine). Chudoku Kenkyu, 17(1):51-54, 2004.
  - ❖ Jacob GS, Garbow JR, Hallas LE, Kimack NM, Kishore GM, Schaefer J: Metabolism of glyphosate in Pseudomonas sp. Strain LBr. Appl Environ Microbiol, 54(12): 2953-2858, 1988.
  - ❖ Jacobs BP, Browner WS: Ginkgo biloba a living fossil. Am J Med, 108: 341-342, 2000.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ❖ Jaramillo Juárez, F., Acevedo Martínez, S., “Absorción y distribución de los xenobióticos”, En Toxicología Básica (Jaramillo-Juárez F, Rincón-Sánchez AR y Posadas del Río FA, compiladores) 1a Edición, UAA-U de G-UJED, serie de textos Universitarios, Cap. 2, pp. 21- 42, 2006.
  - ❖ Jaramillo-Juárez F, Rodríguez-Vázquez ML, Rincón-Sánchez AR, Martínez Saldaña MC, Ortiz Genaro G, Llamas Viramontes J, Posadas del Río FA, Reyes JL: Acute renal failure induced by carbon tetrachloride in rats with hepatic cirrhosis. *Ann. Hepatol.*, 7(4): 331-338, 2008.
  - ❖ Jaramillo Juárez, F., Rodríguez Vázquez, M. L. y Reyes Sánchez, J. L. “Toxicología Renal”, En Toxicología Básica (Jaramillo-Juárez F, Rincón-Sánchez AR y Posadas del Río FA, compiladores) 1a Edición, UAA-U de G-UJED, serie de textos Universitarios, Cap. 9, pp. 137-166, 2006.
  - ❖ Kaldas MI, Walle K, van der Woude H, McMillan J, Walle T: Covalent binding of the flavonoid quercetin to human serum albumin. *J Agric Food Chem*, 53(10): 4194-4197, 2003.
  - ❖ Katz AI: Renal Na-K-ATPase its role in tubular sodium and potassium transport. *Am J. Physiol.*, 242: F207-F219, 1982.
  - ❖ Knox FG, Haramati A: Renal regulation of phosphate excretion. In: *The kidney* (Seldin WD and Giebisch G, eds.), Raven Press NY, Vol. II, pp 1381-1396, 1985.
  - ❖ Ladero Quesada, JM: Análisis Hematológicos Clínicos. En *Manual Normon* (Ladero Quesada, JM, Gómez ML, Montalvo J, Ortega MD, compliadores). 8ª Edición, Laboratorios Normon S.A. Editores, Cap 2, pp. 85-103, 2006.
  - ❖ Lee HL, Chen KW, Chi CH, Huang JJ, Tsai LM: Clinical presentations and prognostic factors of a glyphosate-surfactant herbicide intoxication: A review of 131 cases. *Acad Emerg Med*, 7(8):906-910, 2000.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ❖ Lee CH, Shih CP, Hsu KH, Hung DZ, Lin CC: The early prognostic factors of glyphosate-surfactant intoxication. *Am J Emerg Med*, 26(3): 275-281, 2008.
  - ❖ Leslie EM, Deeley RG, Cole SPC: Bioflavonoid stimulation of glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Drug Metab Dispos*, 31(1):11-15, 2003.
  - ❖ Library of Crop Technology Lessons. Inhibición de la síntesis de aminoácidos aromáticos. Disponible en: <http://croptechnology.unl.edu> (consultado en Mayo del 2008).
  - ❖ Lin CM, Lai CP, Fang TC, Lin CL: Cardiogenic shock in a patient with glyphosate-surfactant poisoning. *J Formos Med Assoc*, 98(10):698-700, 1999.
  - ❖ López Guarnido O. Influencia de la exposición crónica a plaguicidas sobre diversos marcadores bioquímicos (Esterasas y enzimas antioxidantes) en trabajadores de invernadero de la costa oriental de Andalucía. Editorial de la Universidad de Granada. ISBN: 84-338-3294-8. 2005.
  - ❖ Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265-275. 1951.
  - ❖ Lynch MJ: Métodos de laboratorio. Nueva Editorial Interamericana. 2ª. Edición. México. pp: 1522. 1977.
  - ❖ Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 79:727-747, 2004.
  - ❖ Marc J, Mulner-Lorillon O, Belle R. Glyphosate-based pesticides affect cell-cycle regulation. *Biol Cel*. 96:245. 2004a.
  - ❖ Marc J, LePreton M., Cormier P., Morales J., Mulner-Lorillon O, Belle R. A glyphosate-based pesticide impinges on transcription. *Toxicol Appl Pharmacol*. 203:1. 2005b.

- ❖ Martínez A, Reyes I, Reyes N: Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana. *Biomédica*, 27:594-604, 2007.
- ❖ Martínez Cayuela, M: Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharma*, 39(1):5-18, 1998.
- ❖ Mathews CK, Van Holde KE. *Bioquímica*. 1ª. Ed. McGraw Hill Interamericana, Cap 11, pp 398-458, 1998.
- ❖ Meister A: Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*. 263, 17205. 1988.
- ❖ Menkes DB, Temple WA, Edwards IR: Intentional self-poisoning with glyphosate containing herbicides. *Hum Exp Toxicol*, 10(2):103-107, 1991.
- ❖ Moon JH, Nakata R, Oshima S, Inakuma T, Terao J: Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am J Physiol Regulatory Interactive Comp Physiol*, 279:461-467, 2000.
- ❖ Moore K: Renal failure in acute liver failure. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 11: 967-975, 1999.
- ❖ Morales AI, Vicente-Sánchez C, Sandoval JM, Egido J, Mayoral P, Arévalo MA, Fernández- Tagarro M, López-Novoa JM, Pérez- Barriocanal F: Protective effect of quercetina on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats is base on its antioxidant properties. *Food Chem Toxicol*, 44(12):2092-2100, 2006.
- ❖ Murota K, Hotta A, Ido H, Kawai Y, Moon JH, Sekido K, Hayashi H, Inakuma T, Terao J: Antioxidant capacity of albumin-bond quercetina metabolites after onion consumption in humans. *J Med Invest*, 54:370-374, 2007.

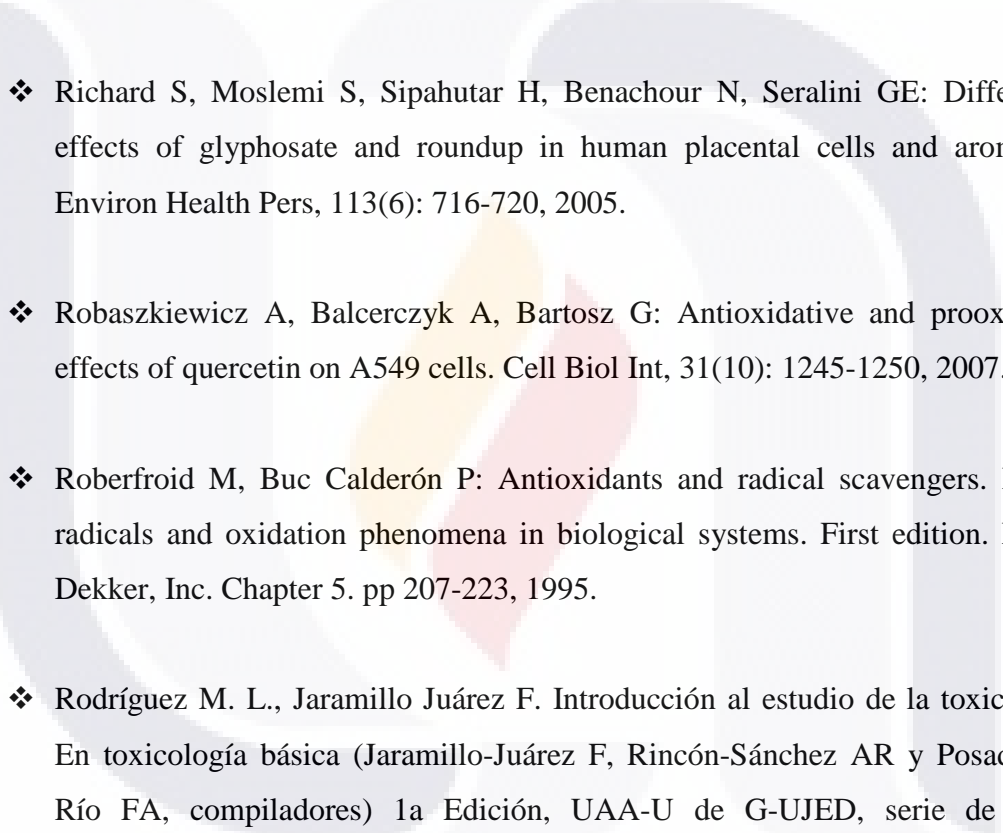
- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ❖ Murray R: Alanine aminotransferase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1088-1090. 1984 a.
  - ❖ Murray R: Aspartate aminotransferase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1112-1116.1984 b.
  - ❖ Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn D, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen P: Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr, 74: 418-425, 2001.
  - ❖ Novas AJ, González RM, Díaz H: Estrés oxidativo asociado a la exposición ocupacional a sustancias químicas. Rev Cub Trab, 8(1):52-57, 2007.
  - ❖ Nunkes DB, Temple WA, Edwards IR. Intentional self-poisoning with Glyphosate containing herbicides. Human Exposure Toxicology. 10:103-107,1991.
  - ❖ Olorunsogo OO, Bababunmi EA: Inhibition of succinate-linking reduction of pyridine nucleotide in rat liver mitochondria *in vivo* by N-(phosphonomethyl)glycine. Toxicol Lett, 7(2):149-152, 1980.
  - ❖ Olorunsogo OO, Bababunmi EA, Bassir O: Interaction of N-(phosphonomethyl)glycine with some respiratory chain enzymes of isolated corn-shoot mitochondria. Arch Environ Contam Toxicol. 9(1): 109-114. 1980.
  - ❖ Olorunsogo OO: Inhibition of energy-dependent transhydrogenase reaction by N-phosphonomethyl-glycine in isolated rat liver mitochondria. Toxicol Lett, 10(1):91-95, 1982.
  - ❖ Olorunsogo OO: Modification of the transport of protons and Ca<sup>2+</sup> ions across mitochondrial coupling membrane by N-(phosphonomethyl)glycine. Toxicol 61(2):205-209, 1990.
  - ❖ O.M.S. Toxicology of Pesticides. Interim Document 9. Copenhagen. 1982.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- ❖ Onil S: Riesgos inherentes a la utilización del Roundup para el control de plantaciones de cocaína en Colombia. Organización Panamericana de Salud. Instituto Nacional de salud pública de Quebec. 2001.
- ❖ Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F: Analysis of glutathione-implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, 333:19, 2003.
- ❖ Peixoto F: Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61(8):1115-1122, 2005.
- ❖ Peña JC: The renal transplant history in the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán”. *Rev Invest Clin*, 57(2): 120-3, 2005.
- ❖ Pérez Trueba G: Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cub Invest Biomed*, 22(1)-48-57,2003.
- ❖ Peterson GL: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, 83:346-356, 1977.
- ❖ 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.
- ❖ Quick AJ, Stanley Brown M, Bancroft FW: A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *Am J Med Sci*. 190:501,1935.
- ❖ Rector FC: Sodium, bicarbonate and chloride absorption by proximal tubule. *Am. J. Physiol.*, 244: F461-F465, 1983.
- ❖ Reed JD: Chemical toxicity and glutathione regulation. *Crisp. Data Base National Institutes of Health*, 1994.



- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ❖ Reyes Romero, M. A., Posadas del Río F. A., “La biotransformación de los compuestos tóxicos”, En: Toxicología Básica (Jaramillo Juárez F., Rincón Sánchez A.R. y Posadas del Río F.A., compiladores) 1a Edición, UAA-U de G-UJED, serie de textos Universitarios, Cap. 3, pp. 43-50, 2006.
  - ❖ Reyes S., J.L., Jaramillo Juárez, F. “Eliminación de Fármacos”. En: Farmacología General (Jaramillo Juárez F., Cardona Muñoz E. G. y Rincón Sánchez A. R., compiladores) 2a Edición, UAA-U de G, serie de textos universitarios, Cap. 6, pp. 103- 115, 2008.
  - ❖ Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini GE: Differential effects of glyphosate and roundup in human placental cells and aromatase. Environ Health Pers, 113(6): 716-720, 2005.
  - ❖ Robaszekiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G: Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. Cell Biol Int, 31(10): 1245-1250, 2007.
  - ❖ Roberfroid M, Buc Calderón P: Antioxidants and radical scavengers. In free radicals and oxidation phenomena in biological systems. First edition. Marcel Dekker, Inc. Chapter 5. pp 207-223, 1995.
  - ❖ Rodríguez M. L., Jaramillo Juárez F. Introducción al estudio de la toxicología. En toxicología básica (Jaramillo-Juárez F, Rincón-Sánchez AR y Posadas del Río FA, compiladores) 1a Edición, UAA-U de G-UJED, serie de textos Universitarios, Cap. 1, pp 11-20, 2006.
  - ❖ Ross MH, Pawlina W: Histología Texto y Atlas a color con Biología Celular y Molecular. 5a Edición, Cap. 1, 2-5 pp, 2006.
  - ❖ Russo RO, Sánchez MS: Los flavonoides en la terapia vascular. Rev Costarr Cardiol, 8(1), 2006.



- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ❖ Sánchez-Pérez Y, Carrasco-Legleu C, García-Cuellar C, Pérez- Carreón J, Hernández-García S, Salcido-Neyoy M, Alemán-Lazarini L, Villa-Treviño S: Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepathocarcinogenesis. *Cancer Lett*, 217(1):25-32, 2005.
  - ❖ Schmalhausen EV, Zhlobek EB, Shalova IN, Firuzi O, Saso L, Muronetz VI: Antioxidant and prooxidant effects of quercetin on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Food Chem Toxicol*, 45(10):1988-1993, 2007.
  - ❖ Schonbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth WA, Scholoss JV, Amhrehin N, Evans JN: Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5.enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in aromatic detail. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:1376-1380. 2001.
  - ❖ Schlebusch H, Rick W, Lang H, Knedel M: Standars in the activities of clinically important enzymes. *Dtsc. Med. Wschr*. 99:765.1974.
  - ❖ Shirai M, Yamanishi R, Moon J.H, Murota K, Terao J: Effect of quercetin and its conjugated metabolite on the hydrogen peroxide-induced intracellular production of reactive oxygen species in mouse fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66(5): 1015-1021, 2002.
  - ❖ Siller López, F., “Toxicología Hepática”, En: *Toxicología Básica* (Jaramillo-Juárez F, Rincón-Sánchez AR y Posadas del Río FA, compiladores) 1a Edición, UAA-U de G-UJED, serie de textos Universitarios, Cap. 8, pp. 117- 135, 2006.
  - ❖ Simerville, JA. Maxted, WC., Pahira JJ. *Urinalysis: A Comprehensive Review*. *Am Fam Physician* 71:1153-62. 2005.
  - ❖ Sing D, Chander V, Chopra K: Quercetin, a bioflavonoid, attenuates ferric nitrilotriacetate-induced oxidative renal injury in rats. *Drug Chem Toxicol*, 27(2): 145-156, 2004.

- ❖ Solomon K.R., Anadón A., Cerdeira A., Marshall J., Sanín L.H. Estudios de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Informe preparado para la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), División de la Organización de los Estados Americanos (OEA) Washington, D.C., Estados Unidos de América. 2005.
- ❖ Sorensen FW, Gregersen M: Rapid lethal intoxication caused by the herbicide glyphosate-trimesium (Touchdown). *Hum Exp Toxicol*, 18(12):735-737, 1999.
- ❖ Stella J, Ryan M: Glyphosate herbicide formulation: A potentially lethal ingestion. *Emerg Med Australia* 16(3):235-239, 2004.
- ❖ Stevens A, Lowe J: *Histología Humana*. 3a Edición, Elsevier España, Cap. 1, 4-6 pp, 2006.
- ❖ Strehler, B. L., In: H. U. Bergmeyer: *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, Vol. 4, 2<sup>nd</sup> English edition, pp 2112-2113, 1974.
- ❖ Sumner JB: A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Sci*. 100:413-414, 1944.
- ❖ Takacs P, Martin PA, Struger J: *Pesticides in Ontario: a critical assessment of potential toxicity of agricultural products to wildlife, with consideration for endocrine disruption*. Volume 2: Triazine herbicides, Glyphosate and Metalochlor. Technical Report Series No. 369. Canadian Wildlife Service. ISBN 0-662-30986-3, 2002.
- ❖ Talbot AR, Shiaw MH, Huang JS, Yang SF, Goo TS, Wang SH, Chen CL, Sanford TR: Acute poisoning with a glyphosate-surfactant herbicide ('Roundup'): A review of 93 cases. *Hum Exp Toxicol*, 10(1):1-8, 1991.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ❖ Temple WA, Smith NA: Glyphosate herbicide poisoning experience in New Zealand. *N Z Med J*, 105(933):173-174, 1992.
  - ❖ Trinder P: Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Am Clin Biochem*, 6:24, 1969.
  - ❖ Ullrich KJ, Smith NA: Glyphosate herbicide poisoning experience in New Zealand. *N Z Med J*, 105(933):173-174, 1992.
  - ❖ United Nations Environment Program. *The State of the World Environment*. Nairobi, Kenya, UNEP, 1987.
  - ❖ Uribe C, Melo OL, Céspedes JE, Santodomingo T, Gastelbondo Y, Hernández BO: Supuestos efectos del glifosato en la salud humana. *Clin. Informe Final. Toxicológica Uribe Cualla*, 2001.
  - ❖ Varona Uribe M., Groot de Restrepo H., Torres rey C. H. y Patiño R. I. Determinación de la exposición glifosato y otros plaguicidas y evaluación del daño en el ADN en trabajadores que laboran en cultivos de caña de azúcar en el Valle del Cauca. En: *Medicina* (Camacho Pinto M., Otero Ruiz E., Editores) *Revista MEDICINA- Vol. 28 No.1 (72) pp. 30-35.*
  - ❖ Venereo Gutiérrez JR: Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*, 31(2):126-133, 2002.
  - ❖ Waliszewki S, Pardío Sedas V: Plaguicidas en México. *Ciencia y Desarrollo*. 105: 139-144, 1992.
  - ❖ Weaver LM, Herrmann KM: The shikimate pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50:473-503, 1999.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- ❖ Williams GM, Kroes R, Munro IC: Safety evaluation and risk assessment of herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for human. *Regul Toxicol Pharmacol*, 31:117-165, 2000.
  - ❖ WHO. Environmental Health Criteria. Vol 145. p 244, 1993.
  - ❖ WHO. Environmental Health Criteria. Vol 159. p 177, 1994.
  - ❖ WHO/FAO. Glyphosate. Data sheets on pesticides No.91. 1996. Disponible en: [http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest91\\_e.htm#1.3](http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest91_e.htm#1.3)
  - ❖ Yao P, Nussler A, Liu L, Hao L, Song F, Schirmeier A, Nussler N: Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nfr2 pathways. *J Hepatol*, 47(2):253-61, 2007.
  - ❖ Yousef MI, Ibrahim HZ, Salem MH, Hassan GA, Helmi S, Bertheussen K: Hematological and biochemical changes induced by carbofuran and glyphosate in rabbits. *Environ Nutr Interact*, 3, 179-194, 1999.
  - ❖ Ziemmerman 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.
- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS