



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ANTIOXIDANTES SOBRE EL DAÑO INDUCIDO  
POR PARATIÓN METÍLICO EN HIPOCAMPO Y CEREBELO DE RATAS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

M. EN C. JAIRO MARIEL CÁRDENAS

**COMITÉ TUTORAL:**

DRA. MARIA CONSOLACIÓN MARTINEZ SALDAÑA. DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA, UAA.

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA. DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA, UAA.

DR. FERNANDO JARAMILLO JUÁREZ. DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, UAA.

**APOYO TECNICO:**

LCN. MARIA LUISA RODRIGUEZ VAZQUEZ. DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, UAA.

AGUASCALIENTES AGS



**Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.**  
Nicolás San Juan No. 1511 Colonia del Valle  
Delegación Benito Juárez C.P. 03100  
México, D.F.  
Tel: 9183-2060 Fax: 9183-2071  
www.afmac.org.mx

**Expediente: 318**

México, D.F. a 12 de noviembre de 2010

**Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera**  
Departamento de Morfología  
Universidad Autónoma de Aguascalientes

Presente

Estimada doctora Guerrero:

Tengo el agrado de comunicarle que el artículo perteneciente a la sección **Trabajo Científico** intitulado:

“Efecto protector del Ginkgo Biloba en el daño inducido por paratión metílico en células de la capa granulosa de cerebelo en rata”

de los autores *Jairo Mariel Cárdenas, Ma. Consolación Martínez Saldaña, Fernando Jaramillo Juárez, María Luisa Rodríguez-Vázquez, Francisco Javier Gutiérrez-Cantú, Francisco A. Posadas del Río, Francisco Javier Avelar-González, Alma Lilián Guerrero Barrera* ha sido aceptado para su publicación en la *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* en el Vol. 41, No. 4 octubre–diciembre 2010.

La Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas está indizada a: Internacional Pharmaceutical Abstracts, Chemical Abstracts, EMBASE de Excerpta Medica, Latindex, Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnología del CONACyT (expediente No. 66688) y a la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, Epaña y Portugal (Redalyc).

Esperando contar nuevamente con material de su autoría, quedo de usted.

Atentamente

Por la superación Técnica y Científica

Dra. Dea Herrera Ruiz  
Editora

F-ER-AFM-018

c.c.p. Dra. Dea Herrera Ruiz Editora RMCF  
c.c.p. Archivo AFMAC

## Dedicatorias y agradecimientos

A **Dios** por haberme permitido llevar a cabo mis estudios, y darme la fortaleza necesaria para buscar superarme y poder servir a la sociedad a través de un sueño: **SER DOCTOR**.

A mi esposa **Sonia** y a mi Hija **Karen Valentina** que sin duda fueron mi mayor aliciente en esta búsqueda, y es por que esto fue para ustedes, GRACIAS.

A mis padres, **Humberto** y **Marcela**, que han sido ejemplo desde el primer momento de mi vida, y que día a día confiaron en mi, GRACIAS.

A mi hermana **Denisse**, por sus sonrisas y su alegría, GRACIAS.

A mi tío **Arturo**, por confiar en mi, GRACIAS.

A la Dra. **Alma Lilián Guerrero Barrera**, por todas sus enseñanzas, paciencia, ejemplo, pero sobretodo por su amistad incondicional dentro y fuera del posgrado, así como su ejemplo de vida, GRACIAS.

A la **Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña**, por todos los momentos que fue un apoyo incondicional para mi persona y en general por su entrega absoluta en la búsqueda de mejorar continuamente al programa de Doctorado enseñándonos con su ejemplo, GRACIAS.

Al **Dr. Fernando Jaramillo Juárez**, por todas y cada una de sus enseñanzas, así como su apoyo y confianza en mi persona, GRACIAS.

Al **Dr. Anibal Posadas**, por su colaboración, amistad y motivación a perseguir mis sueños, GRACIAS.

A la **Maestra Ana Luisa**, por todas sus enseñanzas y paciencia, GRACIAS.

Al **Dr. Avelar**, por su apoyo y confianza en mí, GRACIAS.

A mis maestros **Ramón Rosales** y **Francisco Jaramillo** por su ejemplo de vida, y con ello motivar a superarme, así como los conocimientos dados en la maestría.

A la **Maestra Diana Olimpia** y **Amparito**, por ayudarme en aquellos momentos de desesperación y tristeza, GRACIAS.

A la **Lic. Ana Hilda**, **Dr. Gil Cisneros** y al **MC Cruz Galindo** del CONACYT por haberme apoyado para poder proseguir mis estudios, GRACIAS.

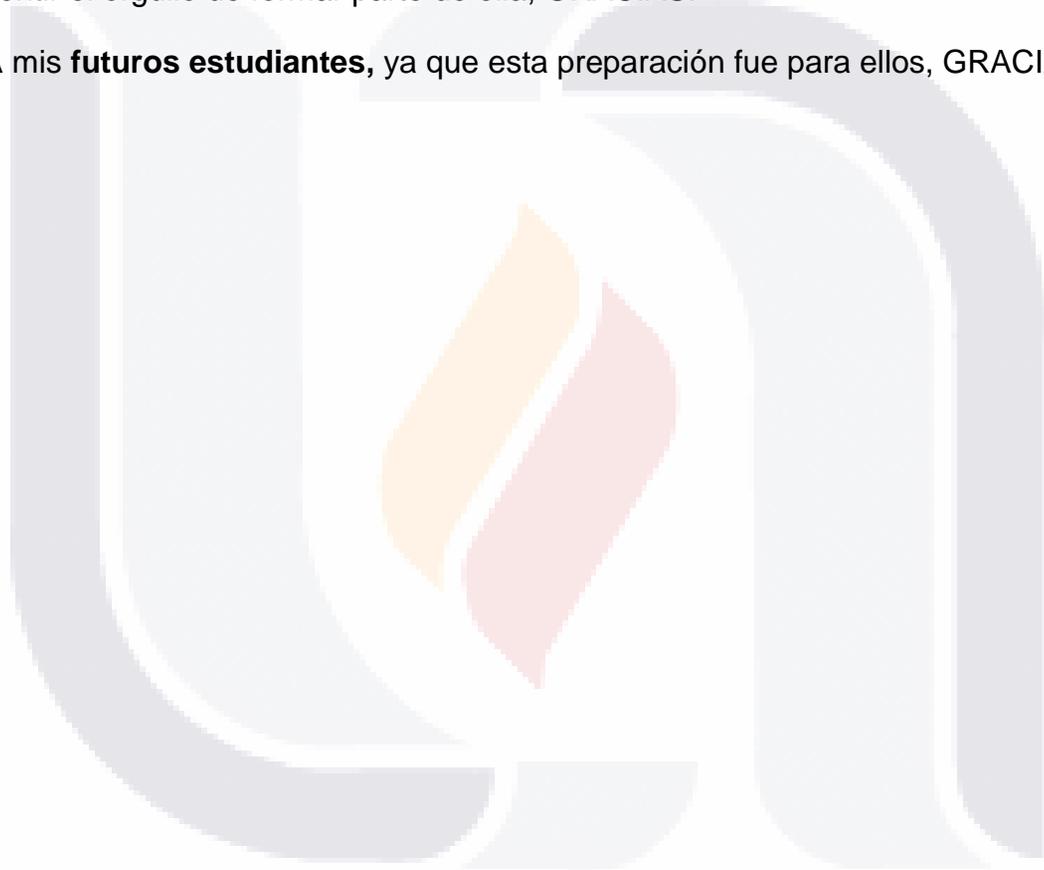
Al **Dr. Luis Armando Leal Tobías**, por toda su amistad, apoyo, motivación, confianza y sobretodo su ejemplo de persona, GRACIAS.

Al Sr. **Rector de la UASLP, Lic. Mario García Valdez**, por su apoyo para continuar con mis estudios, a través de los apoyos concedidos, GRACIAS.

A la **UAA**, por la oportunidad de haber estado entre sus filas, y poderme llevar en mi persona, la gran calidad humana de sus docentes y alumnos.

A la **UASLP**, mi alma mater, por la oportunidad de confiar en mí y por permitirme sentir el orgullo de formar parte de ella, GRACIAS.

A mis **futuros estudiantes**, ya que esta preparación fue para ellos, GRACIAS.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

M. en C. JAIRO MARIEL CÁRDENAS  
ALUMNO DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E .

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“Efecto del tratamiento con antioxidantes sobre el daño inducido con paratión metílico en hipocampo y cerebelo de ratas”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E  
Aguascalientes, Ags., 7 de diciembre de 2010  
“SE LUMEN PROFERRE”  
EL DECANO

DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ



c.c.p.- Archivo  
FJAR,mjda



Volumen 41 • Número 4 • Octubre - Diciembre 2010. *Ahead of print*

Trabajo Científico

## Efecto protector del *Ginkgo biloba* en el daño inducido por paratión metílico en células de la capa granulosa de cerebelo en rata

### The protective effect of *Ginkgo biloba* on the damage induced by methyl parathion in cerebellar granule cells of rat

Jairo Mariel Cárdenas<sup>1,2</sup>, Ma. Consolación Martínez Saldaña<sup>2</sup>, Fernando Jaramillo Juárez<sup>2</sup>,  
María Luisa Rodríguez-Vázquez<sup>2</sup>, Francisco Javier Gutiérrez-Cantú<sup>1,2</sup>, Francisco A. Posadas del Río<sup>2</sup>,  
Francisco Javier Avelar-González<sup>2</sup>, Alma Lilián Guerrero Barrera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

<sup>2</sup>Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes

---

#### Resumen

El paratión metílico en dosis única (12mg/kg, v.o.) o por tratamiento crónico (1 mg/kg/día v.o. durante 30 días) provocó daño estructural y pérdida de células en la capa granular del cerebelo de ratas macho Wistar adultas (275g ± 25g de peso), registrado a través de análisis histológico semicuantitativo. El extracto estandarizado de *Ginkgo biloba* (69.8 µg/kg/día i.p., cada tercer día durante 30 días) o N-acetilcisteína (150 mg/kg/día i.p., cada tercer día durante 30 días) administrados como antioxidantes, registraron un efecto neuroprotector significativo (P < 0.05) en las células de la capa granulosa en el tratamiento crónico. Los resultados demuestran el efecto neuroprotector de los antioxidantes empleados que revertieron el daño causado por paratión metílico en cerebelo de rata.

---

#### Abstract

The administration of methyl parathion as a single dose (12 mg / kg p.o.) or chronic treatment (1 mg/kg/ day p.o. for 30 days) caused structural damage and loss of cells in the granular layer of adult Wistar male rats cerebellum (weight 275g ± 25g), recorded by semiquantitative histological analysis. When administering standardized extract of *Ginkgo biloba* (69.8 µg/kg/ day i.p., every other day for 30 days) or N-acetylcysteine (150 mg/kg/day i.p., every other day for 30 days) as antioxidants, there was a neuroprotective effect significant (P < 0.05) in the granular layer cells of rat cerebellum, only during chronic treatment. The results demonstrate the antioxidant neuroprotective effect that revert the damage caused by methylparathion in the rat cerebellum.

---

**Palabras clave:** paratión metílico, *Ginkgo biloba*, cerebelo, estrés oxidativo.

**Keywords:** methyl parathion, *Ginkgo biloba*, cerebellum, oxidative stress.

---

#### Correspondencia

Dra. Alma Lilián Guerrero-Barrera  
Centro de Ciencias Básicas, UAA.  
Av. Universidad 940  
C. U. Aguascalientes, Ags., México. CP. 20100  
Tel. 52 449 910 7400 Ext. 342

Fax. 52 449 910 8401  
e-mail: alguerre@correo.uaa.mx

Publicado en línea:

## RESUMEN

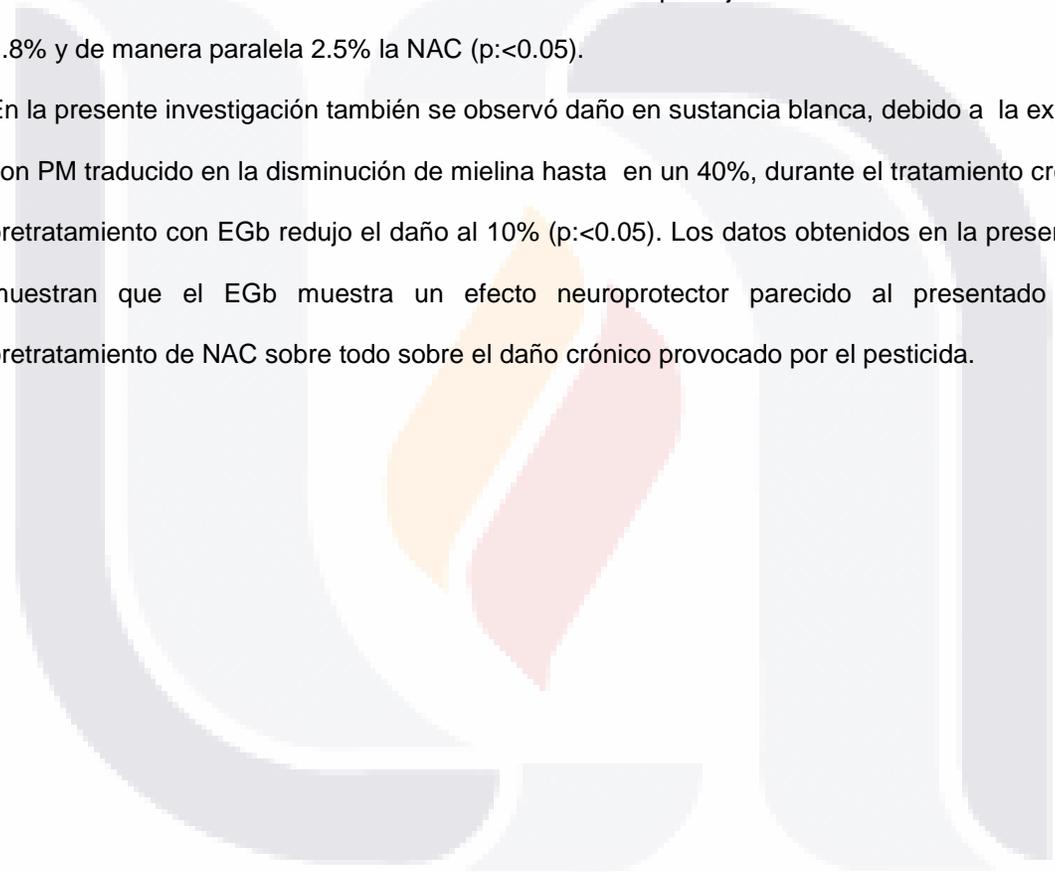
El paratión metílico (PM) ha sido utilizado ampliamente en todo el mundo como pesticida. Este compuesto organofosforado produce alteraciones neuropatológicas que van desde la intoxicación leve hasta la muerte por falla respiratoria. Estas alteraciones se deben en parte a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en el Sistema Nervioso Central (SNC) y Periférico (SNP), con la subsecuente acumulación de acetilcolina en las sinapsis colinérgicas y sobre estimulación de los receptores colinérgicos muscarínicos y nicotínicos. Adicionalmente, las manifestaciones tóxicas inducidas por el PM presentan efecto no colinérgico asociado con un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Con la finalidad de evaluar el efecto atenuante del daño neurológico provocado por estas especies reactivas al usar antioxidantes, el objetivo de la presente investigación fue analizar el efecto protector del extracto estandarizado de *Ginkgo biloba* (EGb) sobre el daño inducido por PM en hipocampo y cerebelo de ratas Wistar macho, usando N-Acetil cisteína como antioxidante control. El daño neurológico fue evaluado como cambio morfológico en las regiones bajo estudio: hipocampo y cerebelo. Los cambios morfológicos producidos tanto en la población como en la distribución celular fueron observados usando microscopía óptica empleando la tinción de H/E y el marcaje de mielina empleando la técnica del azul rápido de luxol. El tratamiento con PM se realizó de forma aguda brindando una sola dosis (12 mg / kg de peso) o siguiendo un tratamiento crónico (1 mg/kg/ día durante 30 días) en ratas Wistar macho adultas (275g  $\pm$  25g de peso).

El daño inducido en hipocampo, en ambos tratamientos (agudo y crónico) se tradujo en la pérdida de neuronas. En el tratamiento agudo se observó 66% de pérdida de población celular, mientras que en el tratamiento crónico fue de 62%. Por otra parte, el pretratamiento con EGb redujo la pérdida celular del 66% al 38% en el tratamiento agudo con PM, mientras que en el tratamiento crónico se observó sólo el 5% de pérdida celular después de pretratar con EGb. De manera paralela, en el tratamiento agudo con NAC se identificó 43% de pérdida celular mientras que en el crónico se redujo el daño del 62% al 12 %. Estos resultados demuestran que el daño en

hipocampo producido por PM es atenuado de manera más eficaz tanto por el EGB como por la NAC durante el tratamiento crónico con PM ( $p:<0.01$ ) que en el agudo ( $p:<0.05$ ).

Por otro lado, el daño inducido por el PM en las células de la capa granulosa de cerebelo fue también la pérdida de neuronas, menor que la observada en el hipocampo. En el tratamiento agudo se observó 45.8% de pérdida celular mientras que en el crónico fue de 37.2%. Con el pretratamiento de EGB durante el tratamiento agudo se observó 27.5% de pérdida celular y 29.9% con la NAC. En el tratamiento crónico con PM el EGB produjo una reducción del daño hasta el 1.8% y de manera paralela 2.5% la NAC ( $p:<0.05$ ).

En la presente investigación también se observó daño en sustancia blanca, debido a la exposición con PM traducido en la disminución de mielina hasta en un 40%, durante el tratamiento crónico, el pretratamiento con EGB redujo el daño al 10% ( $p:<0.05$ ). Los datos obtenidos en la presente tesis muestran que el EGB muestra un efecto neuroprotector parecido al presentado con el pretratamiento de NAC sobre todo sobre el daño crónico provocado por el pesticida.



## ÍNDICE

1.	Introducción	Pág. 9
1.1	Compuestos organofosforados	Pág. 9
1.2	Metabolismo de los compuestos organofosforados	Pág. 10
1.3	Efecto de los COF sobre el Sistema Nervioso	Pág. 11
1.4	Efecto Protector de los Antioxidantes	Pág. 14
1.5	<i>Ginkgo Biloba</i>	Pág.14
1.6	N-Acetilcisteína	Pág. 15
2.	Justificación	Pág. 17
3.	Objetivo General	Pág. 17
4.	Objetivos Específicos	Pág. 17
5.	Hipótesis	Pág. 18
6.	Diseño Experimental	Pág. 18
7.	Metodología	Pág. 19
7.1	Animales de experimentación	Pág. 19
7.2	Análisis estadístico	Pág. 21
7.3	Sacrificio de animales	Pág. 21
7.4	Identificación muestras	Pág. 22
7.5	Conteo celular	Pág. 23
7.6	Técnicas histológicas	Pág. 23
8.	Resultados	Pág. 24
9.	Discusión	Pág. 35
10.	Conclusiones	Pág. 39
11.	Referencias	Pág. 40

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 COMPUESTOS ORGANOSFOSFORADOS

Los compuestos organofosforados (COF) son sustancias orgánicas derivadas de la estructura química del fósforo. Se emplean en la agricultura como insecticidas, y en menor grado como helminticidas, acaricidas, nematocidas, fungicidas y herbicidas. Los insecticidas organofosforados (IOF) son los plaguicidas empleados en la actualidad con mayor frecuencia en todo el mundo y las intoxicaciones debidas a estos compuestos son comunes<sup>1,2,3</sup>.

En 1820 Lassaingne estudia por primera vez las reacciones del alcohol con el ácido fosfórico. El primer agente anticolinesterásico, el tetraetil pirofosfato, se sintetiza en 1854 por Clermont<sup>4</sup>; sin embargo las propiedades insecticidas de este compuesto se describen 80 años después. En Alemania Michaelis estudia los compuestos nitrofosforados, y en Rusia Arbuznov describe los COF trivalentes<sup>5</sup>. Debido a sus efectos tóxicos, los COF, fueron prohibidos como armamento químico por la Convención de Génova de la Liga de las Naciones en 1925<sup>6</sup>.

En 1932, Lange y Krueger sintetizan los dimetil y dietil fosfofluoridatos, y describen por primera vez sus efectos nocivos sobre los seres vivos. Encuentran que la inhalación de los vapores de los COF causa una persistente sensación de ahogo y visión borrosa. Posteriormente Schrader descubre los primeros IOF sistémicos: el OMPA (octametil pirofosfato) o Schradan (1941) y el TEPF (tetraetil pirofosfato) o bladán (1944)<sup>5</sup>.

En 1944 Schrader sintetiza el Paratión, un IOF ampliamente utilizado en la agricultura por su elevada potencia insecticida, su baja volatilidad y su estabilidad en el agua. En 1950 se descubre el Malatión, también de amplio espectro pero de menor toxicidad para los mamíferos<sup>6</sup>. El Paratión y el malatión han sido ampliamente utilizados, y en la actualidad son los IOF que a nivel mundial producen mayor número de intoxicaciones agudas.

En 1947 la compañía suiza Geigy descubre los Carbamatos, que actúan de forma similar a los IOF, con efectos menos duraderos. Desde entonces hasta nuestros días se han sintetizado más de 35 000 COF<sup>6</sup>, de los que unos 50 son los habitualmente utilizados en la agricultura.

Los COF son compuestos anticolinesterásicos, derivados del ácido fosfórico y fosfónico, que actúan por fosforilación de las enzimas acetilcolinesterásicas ( $\beta$ -esterasas), produciendo la separación de la acetilcolina, sustancia que participa en la transmisión del impulso nervioso. Lo anterior provoca la acumulación de acetilcolina en las uniones colinérgicas neuroafectivas (efectos muscarínicos), en las uniones mioneurales del músculo esquelético y en los ganglios autónomos (efectos nicotínicos). Los COF también impiden la transmisión del impulso nervioso en el cerebro, causando trastornos en la sensibilidad, en la función motora, en el comportamiento y en el ritmo respiratorio. Las alteraciones neurofisiológicas que se producen en el individuo van desde una intoxicación leve hasta la muerte<sup>7,8,9</sup>.

## 1.2 METABOLISMO DE LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS

Los COF son sustancias liposolubles<sup>10</sup> de volatilidad variable. Poseen una vida media corta dentro de un organismo vivo, en el plasma, así como un elevado volumen de distribución en los tejidos<sup>11</sup>. Los IOF son los COF menos volátiles. Tal y como se mencionó anteriormente, los COF son atacados por una serie de enzimas (esterasas, enzimas microsomales, transferasas), fundamentalmente en el hígado, en donde sufren una serie de transformaciones químicas que tienden a aumentar su hidrosolubilidad, y por consiguiente facilitan su excreción<sup>12</sup>. Sin embargo, el metabolismo puede aumentar su toxicidad, como sucede con las formas oxón en que son transformadas el paratió n y el malatió n.

Los COF se eliminan a través de la orina y las heces, en su forma activa o previa metabolización hepática<sup>13</sup>. Debido a su alta liposolubilidad los COF se acumulan en tejidos ricos en grasas, como el pániculo adiposo o el tejido nervioso, desde donde pueden ser liberados nuevamente al torrente sanguíneo.

### 1.3 EFECTO DE LOS COF SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO

Como se ha descrito anteriormente, los síntomas tóxicos del envenenamiento agudo por COF son causados generalmente por la inhibición de la acetilcolinesterasa, lo cual produce acumulación de acetilcolina.

Tras la exposición a un COF éste o sus metabolitos se unen mediante su radical fosfórico al lugar esterásico de la acetil colinesterasa, inactivándola, con la consiguiente sobrestimulación colinérgica<sup>16</sup>.

La unión COF-colinesterasa es inicialmente fuerte, aunque es todavía susceptible de ser reactivada mediante la administración precoz de unos fármacos denominados oximas. En las primeras horas se producen reacciones químicas que hacen la unión COF-colinesterasa más estable, hasta quedar una unión irreversible que tarda entre 60 minutos y varias semanas en deshacerse. La velocidad de este proceso se denomina "envejecimiento de la enzima", y varía en función de la estructura química del COF.

Los COF muy liposolubles pueden producir síntomas y signos de hiperactividad colinérgica durante un largo periodo de días o semanas, a pesar de un tratamiento aparentemente exitoso. Este fenómeno se debe al almacenamiento del COF en la grasa, el tejido celular subcutáneo o en el tubo digestivo, seguido de liberación repetida del mismo. Proceso conocido como "reintoxicación endógena".

El efecto tóxico agudo puede producir degeneración de los axones largos en la medula espinal y los nervios periféricos, debida a una disminución o a la inhibición de actividad de la esterasa neurotóxica, produciendo una neuropatía retardada. Cuando la actividad de la colinesterasa se recupera ocurre el síndrome intermedio que produce disfunción de la placa neuromuscular postsináptica cuyos síntomas son debilidad y parálisis del músculo<sup>14</sup>, este efecto se ha relacionado con la fosforilación de la colinesterasa en el tejido nervioso.

En modelos animales la intoxicación por COF produce degeneración axonal de inicio distal y progresión proximal, denominada degeneración de tipo muerte regresiva ("dying back"). La alteración del sistema nervioso periférico compromete a las fibras sensitivas y motoras. Los cambios afectan en mayor medida a los axones de grueso calibre. En la médula espinal sucede el mismo tipo de lesión de progresión distal a proximal.

En los nervios afectados por los COF se observan, a través de microscopía, hinchamientos por vacuolizaciones internodales, desmielinización paranodal en las mismas regiones de la fibra nerviosa que luego van a mostrar cambios degenerativos. Estas vacuolizaciones juegan un papel clave en la neuropatía, ya que conducen a una degeneración axonal de tipo multifocal y distal, que a su vez lleva a la degeneración de tipo walleriano de toda la región distal de la fibra.

También pueden presentarse en las fibras nerviosas dilataciones del retículo endoplásmico, dilataciones axonales y aumento de la cantidad de mitocondrias <sup>14,15</sup>. Adicionalmente, se ha observado adelgazamiento de vainas de mielina, infiltración fagocitaria, vacuolización citoplasmática y desmielinización de segmentos internodales. Entre los hallazgos más significativos se encuentran la aparición de racimos de axones amielínicos o ligeramente mielinizados, rodeados por una membrana basal y que predominan sobre lesiones degenerativas.

Los nervios provenientes de biopsias de pacientes expuestos a COF, muestran neuropatía axonal con reducción de filamentos, acumulación de vesículas y estructuras tubulares en fases tempranas. Posteriormente, aparece acumulación de neurofilamentos. En la fase reparativa, muy lenta, se observan rebrotes axonales. Los COF pueden producir ensanchamientos axonales con afectación de las vías largas de la médula espinal. Los compuestos producidos por tri-substitución de ácido fosfórico y fosfitos dan lugar a una degeneración de los haces espinocerebelosos <sup>15</sup>.

La exposición a COF produce también fosforilación de proteínas. Dentro de las proteínas que pueden ser fosforiladas mediante la acción de los COF se encuentra la proteína tau, encargada de facilitar la polimerización de la tubulina en la célula para formar los microtúbulos. Esta fosforilación

afecta la estructura neuronal, el transporte axonal de nutrientes y otras sustancias, así como el mantenimiento de la integridad de la neurona <sup>17, 18,19</sup>.

Los COF además son considerados genotóxicos principalmente para las células somáticas, se les ha relacionado con alteraciones en la cromatina y el DNA de los espermatozoides, estos cambios se han asociado principalmente a su efecto oxidativo sobre estas células <sup>20, 21</sup>.

Se han observado cambios cerebrales, los cuales se presentan posteriores a la exposición a dosis sub-letales de COF, tales como ampliación de los ventrículos del cerebro, y principalmente se dañan la corteza, el tálamo, y el hipocampo mostrando una disminución significativa de células hipocámpales en las regiones CA1 y CA3 <sup>26</sup>.

De manera paralela se ha identificado que los COF también producen tensión oxidativa por la generación de radicales libres y alteración de los antioxidantes naturales al afectar el barrido de estos (Akhgari et al., 2003). Estos compuestos causan la excesiva formación de F2-isoprostanos y F4-neuroprostanos, biomarcadores de lipoperoxidación in vivo, producen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como de citrulina, un marcador de generación de NO/NOS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Gupta et al., 2005; Milatovic et al., 2006). La lipoperoxidación de una de las causas que producen mayor daño en los tejidos por la generación de radicales libres, incluyendo sistema nervioso central (SNC) (Fortunato et al., 2006). También se ha observado que el PM produce disminución de la atención en el individuo, pérdida de la memoria y cambios en el estado físico (Davies et al., 2000a,b; Davies et al., 2008).

Estudios recientes indican que las manifestaciones tóxicas inducidas por PM se asocian con el incremento de ROS, al ser el PM metabólicamente transformado por el citocromo 450 a un metabolito activo, metil paraoxón, aun más tóxico que provoca la oxidación celular y finalmente la muerte celular (Tang et al., 2003; Saffih-Hdadi et al., 2003; Abelet al., 2004). En este contexto el uso de antioxidantes resulta una herramienta eficaz para combatir el daño causado por los radicales libres y así evitar el daño tisular.

## 1.4 EFECTO PROTECTOR DE LOS ANTIOXIDANTES SOBRE EL DAÑO

### PRODUCIDO POR PM

Los antioxidantes son un conjunto heterogéneo de sustancias formado por vitaminas, minerales, pigmentos naturales y otros compuestos vegetales y enzimas, que bloquean el efecto dañino de los radicales libres. El término antioxidante significa que impide la oxidación perjudicial de otras sustancias químicas ocasionada en las reacciones metabólicas o producidas por los factores exógenos. Antioxidantes como la melatonina, el sesamol, la N-acetil cisteína o el extracto de *Ginkgo biloba* se han empleado para evitar el daño neurodegenerativo provocado por agentes oxidantes.

## 1.5 GINKGO BILOBA

El *Ginkgo biloba* posee una mezcla compleja de flavonoides (quemferol, quercetina y derivados de isohamnetina), terpenos (ginkgolidos A, B, C, y J, y bilobalido), entre otros constituyentes. Se ha observado que la fracción no flavonoide y no los flavonoides glucosilados, protegen al tejido cerebral en el daño por hipoxia. Recientemente se ha demostrado que el extracto estandarizado de *Ginkgo Biloba* (EGb) tiene un efecto protector en contra de la toxicidad del  $\beta$ -amiloide, así como propiedades antioxidantes y antiapoptóticas.

El EGb muestra efectos múltiples entre los cuales se incluye función neuroprotectora, antiinflamatoria, estabilización del metabolismo de la glucosa <sup>(31)</sup> y de la membrana plasmática <sup>37</sup>, efecto antioxidante determinado por la captación de radicales libres <sup>38,39</sup>, antagonismo del factor activador de plaquetas (PAF) <sup>40,41,42</sup>, efecto vasodilatador provocado por flavonoides como la quercetina <sup>43</sup>. Además en el sistema colinérgico del SNC puede inducir aumento en la síntesis de acetilcolina y un aumento de los receptores colinérgicos <sup>44</sup>, acción inmunoestimulante, estimulación de la absorción de colina en el hipocampo.

Los primeros estudios con EGb, fueron enfocados hacia su capacidad vasorreguladora y antioxidante en el SNC <sup>45</sup>. Investigaciones recientes indican que el bilobárido, otra de las lactonas terpénicas obtenidas de las hojas del *Ginkgo*, tiene acción neuroprotectora <sup>46</sup>.

En estudios experimentales realizados en animales se ha demostrado que el EGb favorece la recuperación del tejido nervioso y mejora el aprendizaje en ratas que han sido lesionadas en la corteza frontal <sup>47</sup>. El EGb disminuye la velocidad de desaparición de los receptores muscarínicos y  $\alpha$ -2-adrenoceptores asociada al envejecimiento y favorece el mantenimiento de los procesos de captación de colina en los terminales nerviosos del hipocampo. Por su propiedad antioxidante, inactiva radicales libres de manera más potente que la vitamina E.

Antagoniza al factor agregante plaquetario (PAF), evitando la formación de coágulos y promoviendo su lisis. También inhibe el bronco espasmo inducido por el PAF. Su efecto espasmolítico es ejercido con una actividad similar a la de la papaverina. Presenta actividades antiserotoninérgicas y antihistamínicas periféricas, como la ciproheptadina.

## 1.6 N-Acetilcisteína

Como se expuso anteriormente existe evidencia considerable en la literatura que sugiere que los radicales libres son factores importantes en la muerte neuronal, también se ha documentado que la acción de estos compuestos puede ser contrarrestada por antioxidantes, entre ellos, la N-acetilcisteína (NAC). La NAC es un tiol que es usado en práctica clínica desde los años cincuenta. La NAC ha mostrado ser eficaz en la reducción de radicales libres y otros oxidantes, especialmente OH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>48</sup>. Los estudios animales (principalmente en ratas) indican que puede ser de gran beneficio en el tratamiento de isquemia inducida por oxidación en una gran variedad de tejidos finos <sup>49,50</sup>. Por otro lado también se ha demostrado tener una gran capacidad neuroprotectora en periodos de isquemia hipocampal en roedores, inhibición de la producción de radicales libres, peroxidación lipídica y disminución del daño neuronal <sup>51,52</sup>.

Se ha observado una gran cantidad de radicales libres que son generados después de etapas de isquemia cerebral, el mecanismo por el cual la NAC mejora la supervivencia neuronal, sugiere que el barrido de radicales libres como el mecanismo más probable de la acción<sup>53</sup>.

La NAC también tiene potencial indirecto del barrido del radical libre debido a que esta puede reducirse a cisteína (un agente de reducción del tiol), la cual apoya la biosíntesis del glutatión, el cual es un antioxidante natural importante que contrarresta la acción de los radicales libres<sup>54</sup>.



**2. JUSTIFICACIÓN**

Debido al uso extensivo del Paratión Metílico a nivel mundial y a los efectos neurotóxicos provocados en el tejido nervioso causados entre otros factores a la producción de radicales libres oxidantes el presente trabajo tuvo la finalidad de evaluar el efecto atenuante del daño neurológico provocado por estas especies reactivas al usar antioxidantes, el objetivo de la presente investigación fue analizar el efecto protector del extracto estandarizado de *Ginkgo biloba* (EGb) sobre el daño inducido por PM en hipocampo y cerebelo de ratas Wistar macho, usando N-Acetil cisteína como antioxidante control.

**3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del tratamiento con *EGb* y NAC sobre el daño producido por Paratión Metílico en hipocampo y cerebelo de rata.

**4. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- A. Analizar el efecto neurotóxico producido por el Paratión Metílico en hipocampo y cerebelo de ratas.
- B. Evaluar el posible efecto preventivo y terapéutico del extracto del *Ginkgo biloba* y N-Acetilcisteína sobre la neurotoxicidad producida por el Paratión Metílico.

## 5. HIPÓTESIS

La exposición aguda ó crónica al paratión metílico ocasiona daño estructural (morfológico) en relación a la organización y numero de neuronas en hipocampo y cerebelo de ratas así como pérdida de mielina. Estos efectos neurotóxicos se revierten o disminuyen mediante el tratamiento con el extracto de la planta *Ginkgo Biloba* y la N-Acetilcisteína.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

- I. Se evaluó el efecto preventivo del EGb y N-Acetilcisteína contra el daño agudo producido por el Paratión Metílico al administrarse a dosis únicas.
- II. Se evaluó el efecto terapéutico del EGb y N-Acetilcisteína contra el daño crónico producido por el Paratión Metílico.
- III. Se hizo la evaluación Histológica.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Animales de experimentación.

Se emplearon ratas Wistar macho de 275 g  $\pm$  25 g de peso. Para la exposición crónica y aguda, se integraron 4 grupos de 10 ratas para evaluar los efectos preventivos del EGb y de la NAC contra el daño agudo y crónico producido por el Paratión Metílico. Para el grupo en el cual se estudio el daño agudo se trataron los animales de experimentación durante 5 días para lo cual se elaboro el siguiente esquema: a) Grupo 1: se administró aceite de maíz sin PM o antioxidante; b) Grupo 2: se llevó a cabo la inducción del daño nervioso agregando PM en aceite de maíz (12 mg/kg, vía oral); c) Grupo 3: para observar la prevención del daño nervioso se administró el EGb durante 5 días vía intraperitoneal (ip) (0.2 ml solución farmacéutica diluida, para permitir su dosificación adecuada, el antioxidante presente en la solución farmacéutica se diluye  $\frac{1}{2}$  en solución isotónica estéril), al sexto día se administro el PM diluido en aceite de maíz (12 mg/Kg, vía oral); d) Grupo 4: para observar la prevención del daño nervioso se administró NAC durante 5 días vía i.p. (0.2 ml solución farmacéutica diluida, para permitir su dosificación adecuada, el antioxidante presente en la solución farmacéutica se diluye  $\frac{1}{2}$  en solución isotónica estéril), al sexto día se administró el PM diluido en aceite de maíz (12 mg/Kg, vía oral), al séptimo día todos los animales de los cuatro grupos se sacrificaron y se procedió a realizar los estudios en sistema nervioso.

Para el grupo en el cual se estudió el daño crónico se trataron los animales de experimentación durante 30 días para lo cual se elaboró el siguiente esquema: a) Grupo 1: se administró aceite de maíz sin PM o antioxidante; b) Grupo 2: se llevó a cabo la inducción del daño nervioso agregando PM en aceite de maíz (1 mg/Kg/día), durante 30 días, vía oral; c) Grupo 3: para observar la protección del daño nervioso del EGb se administró PM diluido en aceite de maíz (1 mg/Kg/día), durante 30 días via oral, y cada tercer día se administro EGb durante 30 días via i.p. (0.2 ml solución farmacéutica diluida, para permitir su dosificación adecuada, el antioxidante presente en la solución farmacéutica se diluye  $\frac{1}{2}$  en solución isotónica estéril); d) para observar la protección de la NAC se administró PM diluido en aceite de maíz (1 mg/Kg/día), durante 30 días vía oral, y cada

tercer día se administró NAC durante 30 días vía i.p. (0.2 ml solución farmacéutica diluida, para permitir su dosificación adecuada, el antioxidante presente en la solución farmacéutica se diluye ½ en solución isotónica estéril); al día 31 todos los animales de los cuatro grupos se sacrificaron y se procedió a realizar los estudios en el sistema nervioso. (Tabla IA, IB)

El estudio se realizó en ratas Wistar macho de 275 g  $\pm$  25 g de peso. Los animales fueron divididos en lotes de 10 ratas y tratados de la siguiente manera para generar el daño en el sistema nervioso:

TESTIGOS	TRATADOS (Paratión-metílico)	TRATADOS (EGb + Paratión-metílico)	TRATADOS (NAC + Paratión-metílico)
↓ Vehículo del Paratión-metílico	↓ Inducción del daño nervioso: Paratión-metílico en aceite de maíz (12 mg/Kg, oral)	↓ <b>Prevención del daño nervioso:</b> Gb 0.2 ml solución farmacéutica diluida*, durante 5 días, vía i. p., Sexto día, Paratión- metílico (12 mg/Kg, oral)	↓ <b>Prevención del daño nervioso:</b> NAC 0.2 ml solución farmacéutica diluida*, durante 5 días, vía i. p., Sexto día, Paratión- metílico (12 mg/Kg, oral)
↓ Al día siguiente, sacrificio y realizar pruebas programadas en sistema nervioso	↓ Al día siguiente, sacrificio y realizar pruebas programadas en sistema nervioso	↓ Al día siguiente, sacrificio y realizar pruebas programadas en sistema nervioso	↓ Al día siguiente, sacrificio y realizar pruebas programadas en sistema nervioso

**Tabla I. Efecto preventivo del EGb contra el daño agudo producido por el paratión-metílico al administrarse a dosis únicas.** Para permitir su dosificación adecuada, el EGb de la presente en la solución farmacéutica se diluyó ½ (en solución salina isotónica estéril) y se administró 0.2 ml/rata.

El estudio se realizó en ratas Wistar macho de  $275 \text{ g} \pm 25 \text{ g}$  de peso. Los animales fueron divididos en lotes de 10 ratas y tratados de la siguiente manera para generar el daño en el sistema nervioso:

TESTIGOS	TRATADOS (Paratión-metílico)	TRATADOS (Gb + Paratión- metílico)	TRATADOS (NAC + Paratión- metílico)
↓ Vehículo del Paratión-metílico durante 30 días, oral.	↓ <b>Inducción del daño nervioso:</b> Paratión-metílico en aceite de maíz: 1 mg/Kg/día, durante 30 días, oral.	↓ <b>Protección del daño nervioso:</b> Paratión-metílico (aceite de maíz): 1 mg/Kg/día, durante 30 días, oral + Gb 0.2 ml solución farmacéutica diluida*, cada tercer día, durante 30 días, vía i. p.	↓ <b>Protección del daño nervioso:</b> Paratión-metílico (aceite de maíz): 1 mg/Kg/día, durante 30 días, oral + NAC 0.2 ml solución farmacéutica diluida*, cada tercer día, durante 30 días, vía i. p.
↓ Sacrificar animales cada 10 días y realizar pruebas programadas en sistema nervioso	↓ Sacrificar animales cada 10 días y realizar pruebas programadas en sistema nervioso	↓ Sacrificar animales cada 10 días y realizar pruebas programadas en sistema nervioso	↓ Sacrificar animales cada 10 días y realizar pruebas programadas en sistema nervioso

**Tabla II. Efecto terapéutico del EGb contra el daño crónico producido por el paratión-metílico.**

**7.2 Análisis Estadístico.** Se hizo el cálculo de tamaño de muestra representativa para el estudio en base a la fórmula de Hulley and Cummins, dando un total de 15 muestras a analizar por cada uno de los tratamientos, con intervalos de confianza de 95% y un margen de error de 5%.

**7.3 Sacrificio de animales y toma de muestras.** Para el sacrificio de los animales se les administró pentobarbital sódico (29 mg/Kg), vía ip, soluciones lavadora y de perfusión, por vía intracardiaca. Las imágenes muestran la incisión que realiza a nivel umbilical de la rata previo a la perfusión de las soluciones (fig.1a), y como posteriormente se decapitaron los animales y se procedió a la extracción de Encéfalo y Cerebelo (figs. 1.b,c,d,e,f,g).

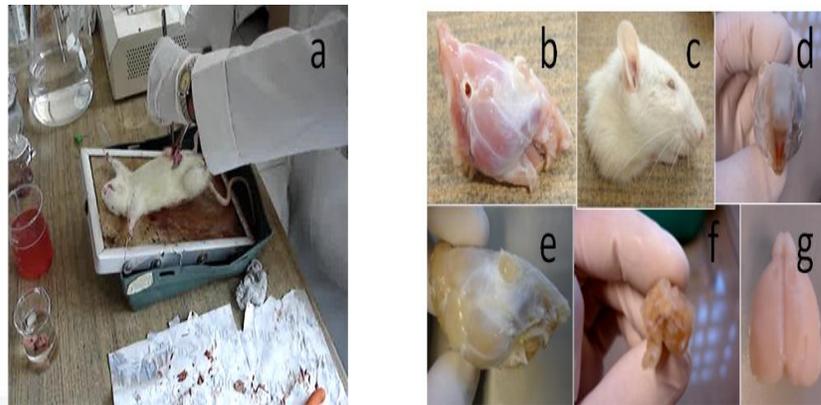


Figura 1. Sacrificio de animales y toma de muestras. a. incisión abdominal a fin de hacer los procedimientos de perfusión de las soluciones; b, c, e, f, g. muestran el procedimiento para la obtención del encéfalo de rata.

**7.4 Identificación de muestras.** Los especímenes se procesaron para su revisión al microscopio óptico, mediante la técnica histológica por inclusión en parafina (fig. 2 a,b) y se realizaron cortes seriados (fig. 2 c). Para la identificación del hipocampo se utilizaron mapas esterotaxicos (fig. 2 d,e).

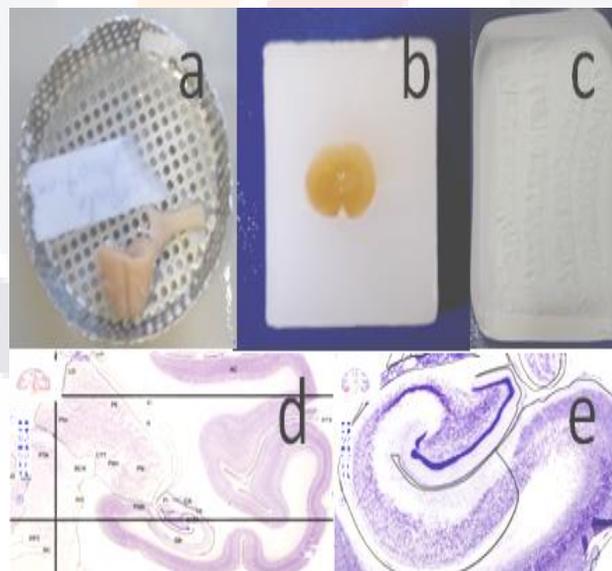


Figura 2. Identificación de las muestras. a. se observa el encéfalo de rata ya perfundido en parafina posterior al histoquinet; B. se observa el espécimen incluido en el bloque de parafina; c. cortes seriados; d y e. mapas estereotáxicos para la identificación del hipocampo de rata.

**7.5 Conteo Celular.** Se tomaron 5 campos en tres muestras de cada uno de los tratamientos y se procedió al conteo celular de cada grupo (fig. Va). Los resultados se obtuvieron por las medias aritméticas de cada uno de los campos y el promedio de estas se comparo con los demás tratamientos. (figura 3)

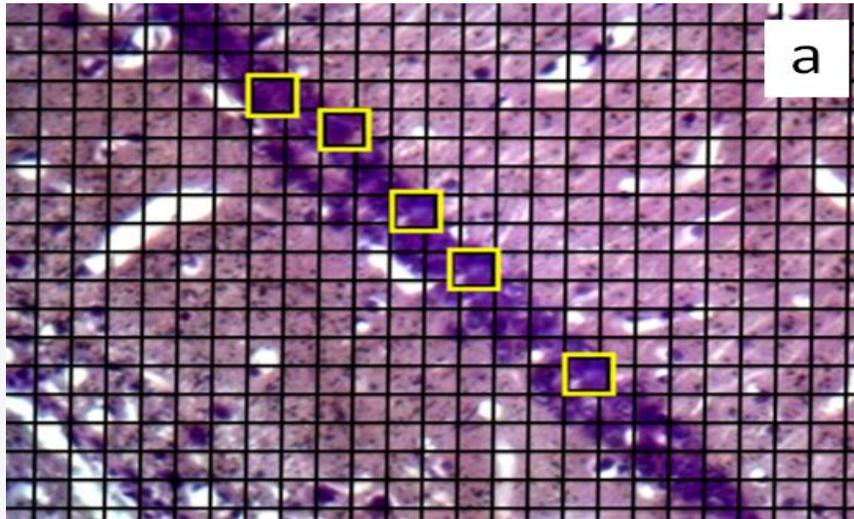


Figura 3. Conteo celular. Forma en la que se realizó el conteo celular para cada laminilla bajo estudio.

**7.6 Técnicas Histológicas.** El daño provocado por el tratamiento con PM se evaluó a nivel histológico empleando la tinción de Hematoxilina y Eosina, para detectar cambios morfológicos a nivel de hipocampo y cerebelo <sup>64</sup>, de manera paralela se uso la tinción de azul rápido de luxol para identificar la posible perdida de mielina, ya que es un colorante especifico para detectarla (incluyendo fosfolípidos, células y sus productos celulares) <sup>65</sup>, para esta técnica se desparafinan e hidratan las muestras con alcohol etílico al 95%, seguido de la aplicación de azul rápido de luxol (Solvent Blue 38, Sigma) a 56° C durante toda la noche, posteriormente se lava el exceso con alcohol etílico y se sumerge en agua destilada, se diferencian los colores aplicando carbonato de litio por 30 segundos, se realizan lavados con agua destilada y posteriormente se realiza la contra tinción con violeta de cresil o Hematoxilina, se realizan lavados con alcohol, y se lleva a cabo el montaje. Los resultados obtenidos se analizaron con un microscopio Zeiss Axioscope 40, empleando un sistema de análisis y captura de imágenes Image Pro Plus (Cybernetics).

## RESULTADOS

Se obtuvieron las muestras de tejido nervioso de ratas Wistar macho 275g +/- 25 g que incluyeron; hipocampo, cerebelo y porción cervical de medula espinal. Se analizaron los especímenes ya tratados con la técnica histológica y se procedió a su estudio con un analizador de imágenes.

En el hipocampo se identificó pérdida de la población de neuronas en las ratas que fueron tratadas con PM de 66.6% observando de manera paralela la consecuente desorganización celular (figura 4b), con el pretratamiento con EGb y NAC se observó una tendencia a preservar la organización celular en el tratamiento agudo como crónico (Figura 4c,d,e,f), así como resulta estadísticamente significativo (Gráfica 1A, 1B) la atenuación de la pérdida de población celular en células de hipocampo ( $p < 0.05$  para el tratamiento agudo y  $p < 0.01$  para el crónico).

En cerebelo se altera la estructura celular de vermis cerebelar, disminuyendo y desorganizando las células de la capa granulosa ante la exposición a PM de hasta 45.8% de pérdida celular (figura 5b), en las ratas que fueron tratadas con los antioxidantes se observa una tendencia a preservar la organización y población celular (figura 5c, 5d, 6c, 6d), y se identificó significancia estadística con el uso de antioxidantes para atenuar el daño por PM ( $p < 0.05$  para el crónico, no así para el tratamiento agudo). Por otra parte se observaron dilataciones de capilares cerebrales (figura 6).

En la porción cervical de la medula espinal se identificó la pérdida de mielina ante la exposición a PM (figura 7) de hasta 40% (Gráfica 3), se observó que en el tratamiento crónico con EGb existe evidencia de significancia estadística,  $p < 0.05$ ).

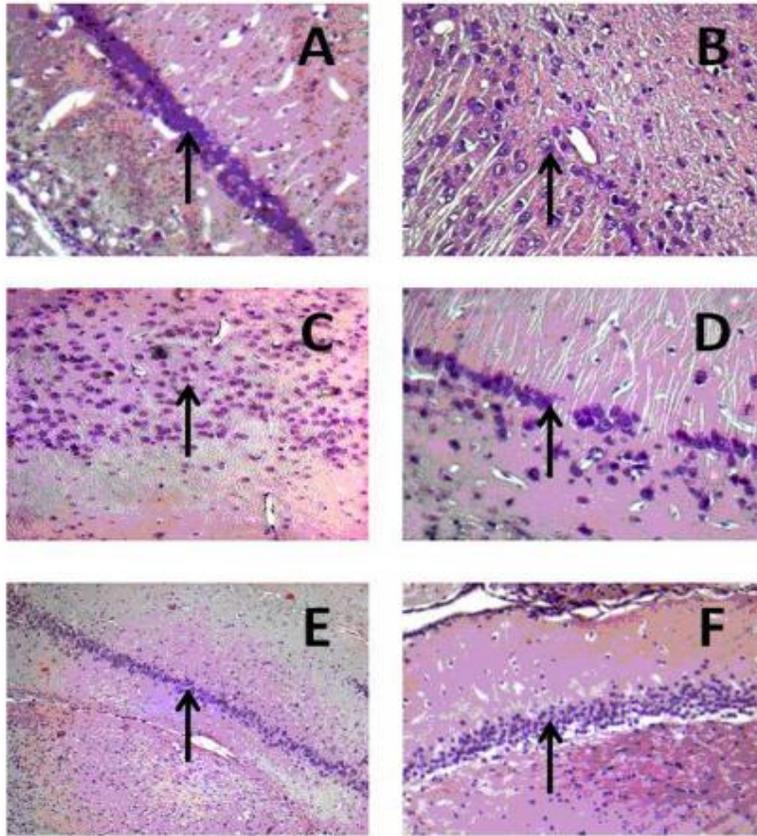
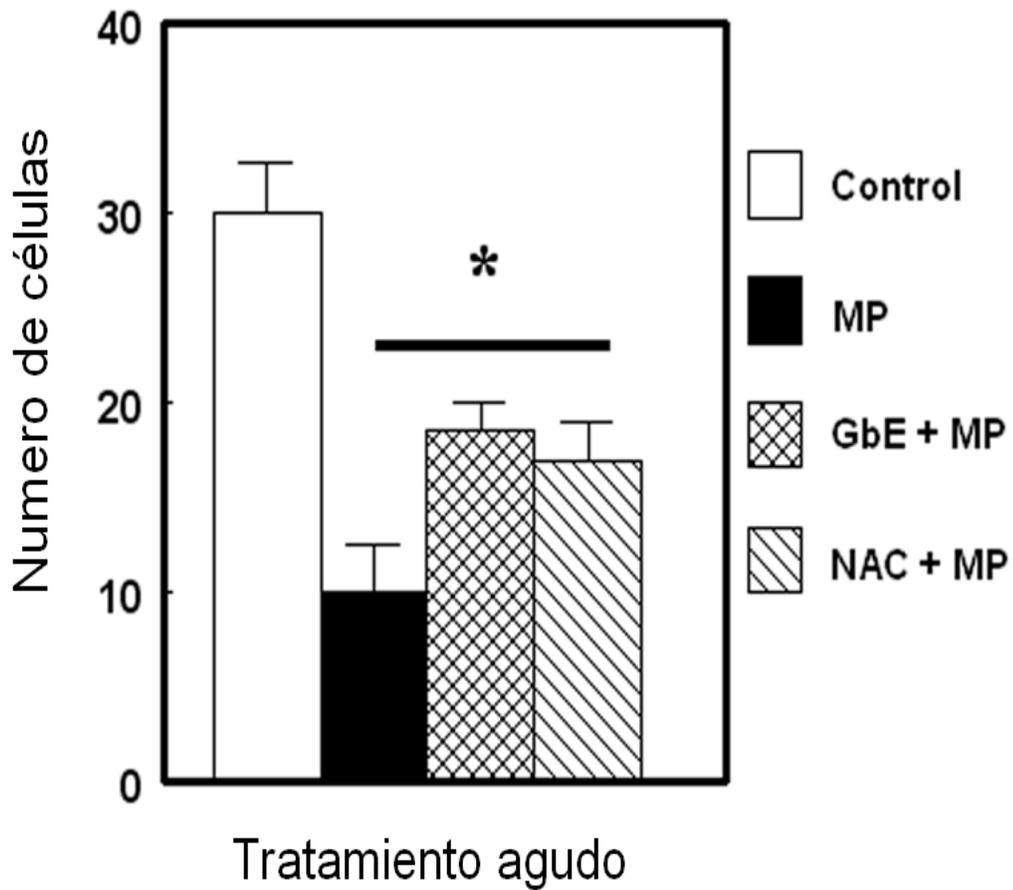
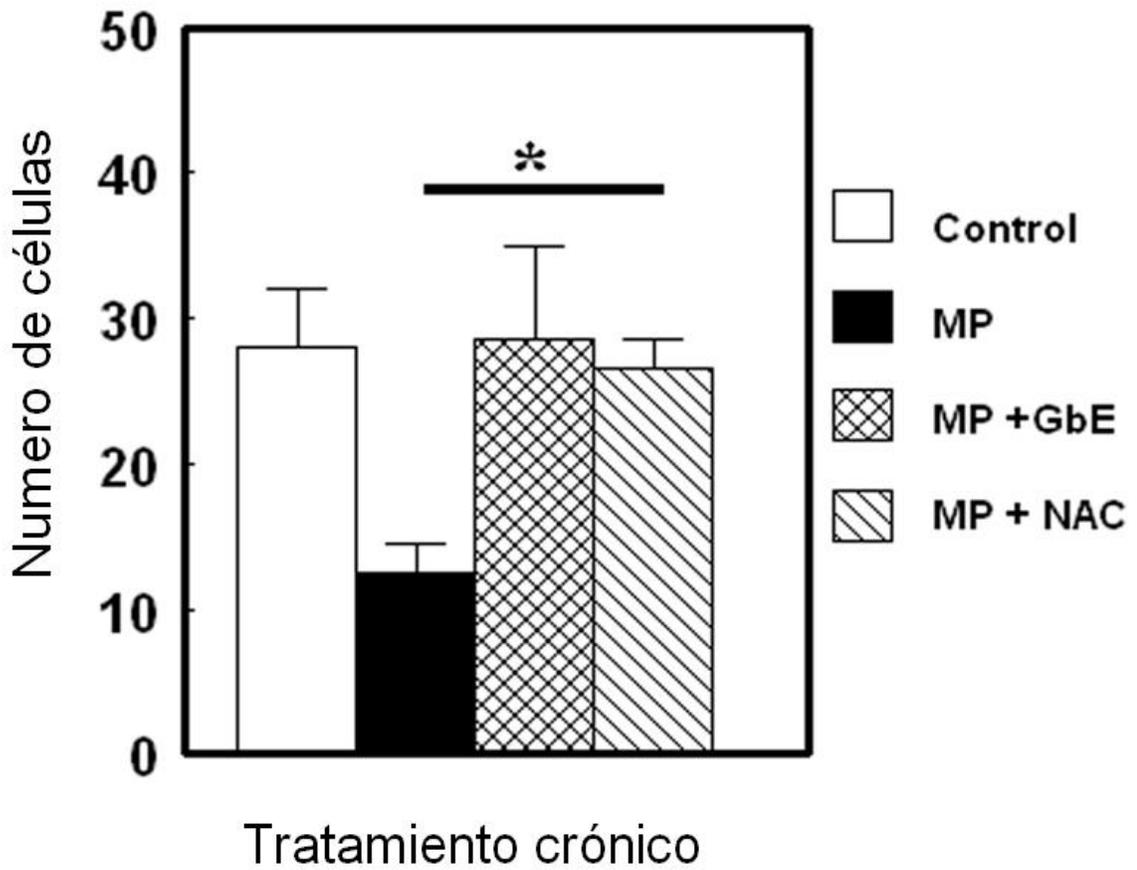


Figura 4. Estructura del hipocampo (40x). Se muestra la distribución y población celular en cada uno de los tratamientos. A. Grupo Control, B. Grupo con administración de PM, C. grupo con administración de EGb, exposición aguda al PM, D. Grupo con administración de NAC y exposición aguda al PM, E. Grupo con tratamiento crónico de PM y administración de EGb, F. Grupo con tratamiento crónico de PM y administración de NAC. 151x174mm (300 x 300 DPI).



Gráfica 1A. Conteo celular en hipocampo de rata en tratamiento agudo con PM. Representación de medias aritméticas y desviación estándar de los conteos celulares de cinco campos aleatorios de tres muestras de cada uno de los grupos experimentales. Los resultados muestran las medias ( $\pm$ SD) de los conteos celulares de cada uno de los tratamientos. \*significativamente diferente al tratamiento con solo PM,  $p < 0.05$ , 270x203mm (300 x 300 DPI).



Gráfica 1B. Conteo celular en hipocampo de rata en tratamiento crónico con PM. Representación de medias aritméticas y desviación estándar de los conteos celulares de cinco campos aleatorios de tres muestras de cada uno de los grupos experimentales. Los resultados muestran las medias ( $\pm$ SD) de los conteos celulares de cada uno de los tratamientos. \*significativamente diferente al tratamiento con solo PM,  $p < 0.01$ . 270x203mm (300 x 300 DPI).

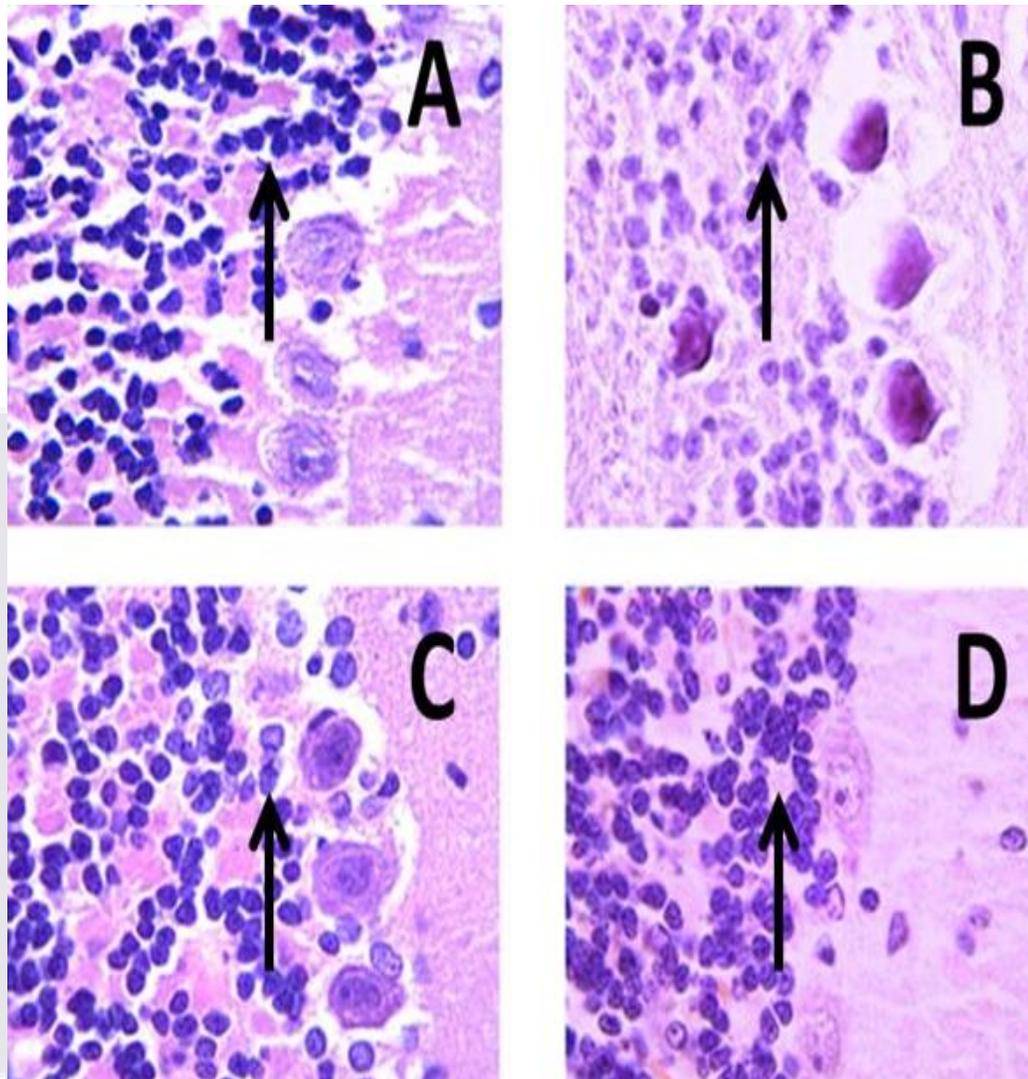


Fig. 5. A. Imágenes representativas con microscopia de luz (técnica de H & E) de los tratamientos agudos. La flecha señala las células de la capa granulosa de cerebelo. A muestra la estructura normal de cerebelo (Grupo control), B muestra la muestra la estructura de las ratas tratadas con PM: existe evidencia de pérdida de organización y población celular. C y D muestran las células de las ratas tratadas con EGb y NAC respectivamente. Magnificación = 40x.

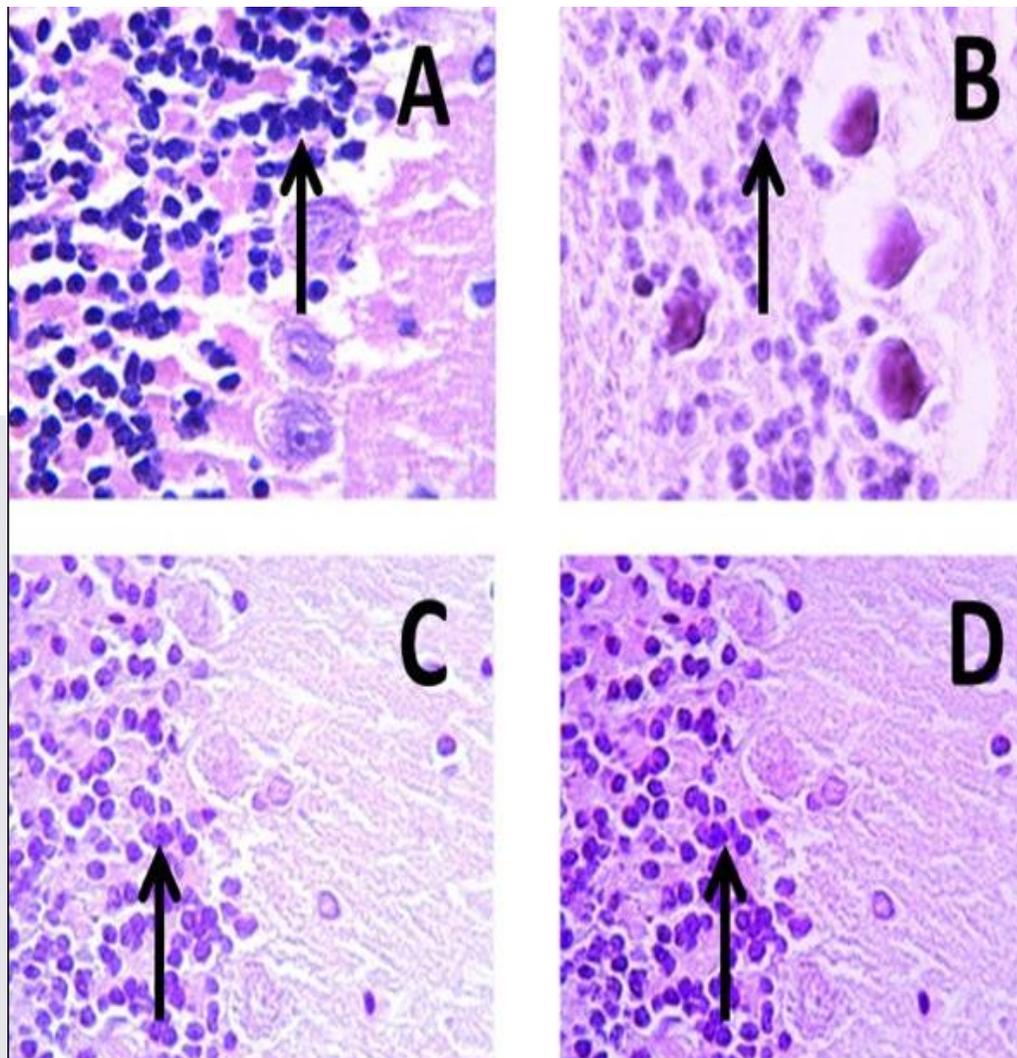
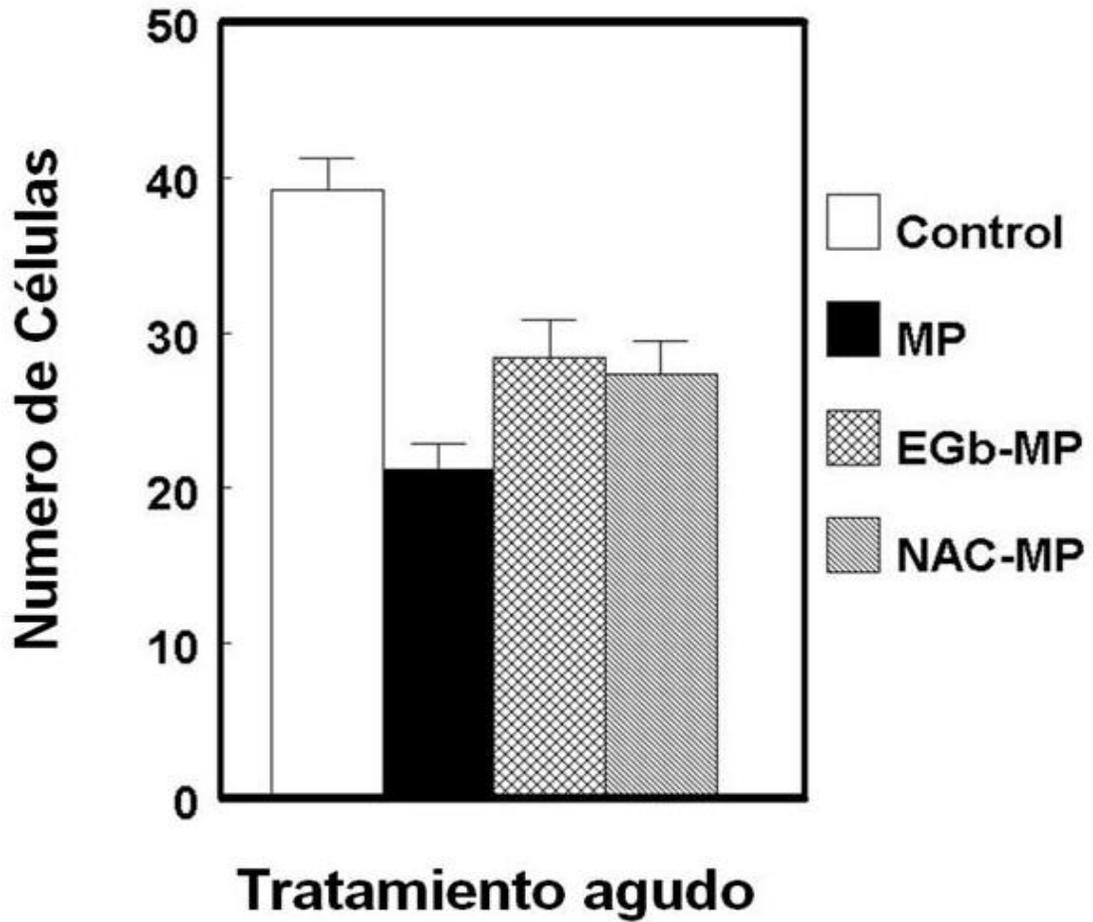
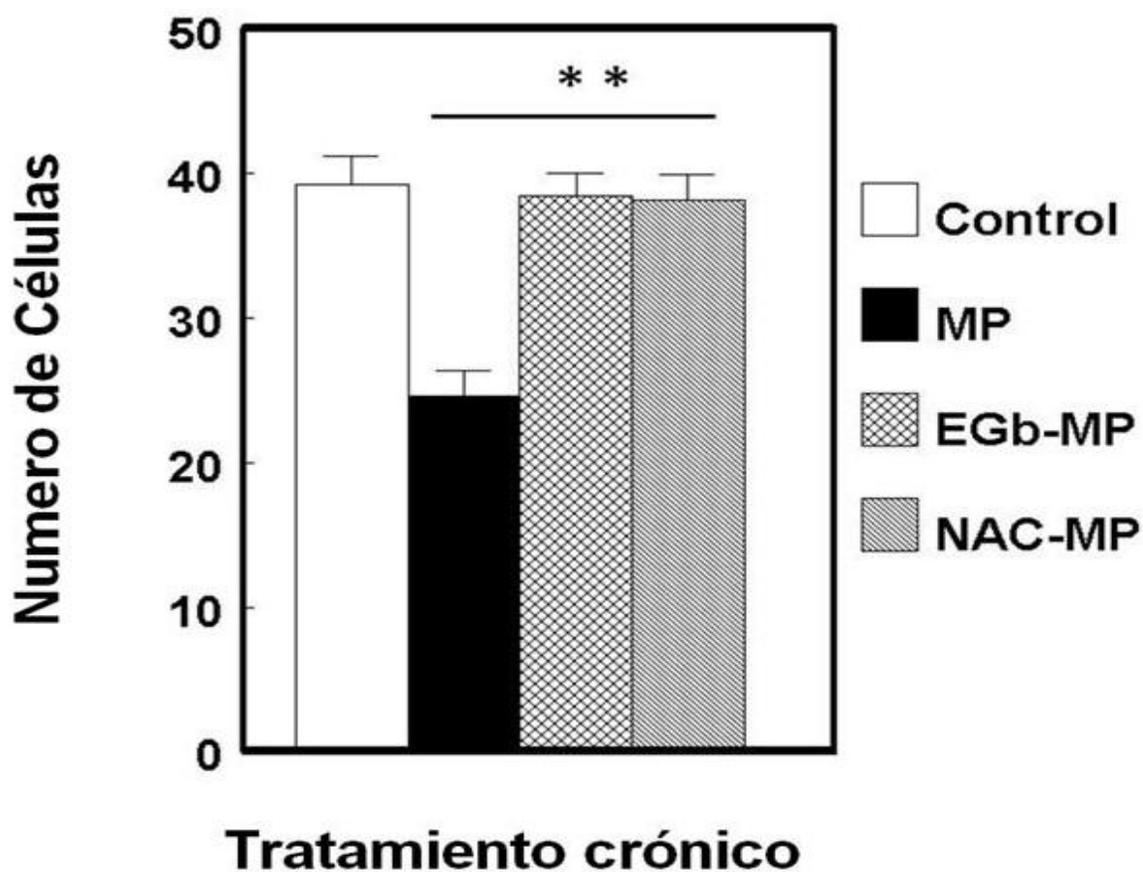


Figura 5.B. Imágenes representativas con microscopia de luz (técnica de H & E) de los tratamientos Crónicos. La flecha señala las células de la capa granulosa de cerebelo. A muestra la estructura normal de cerebelo (Grupo control), B muestra la muestra la estructura de las ratas tratadas con PM: existe evidencia de pérdida de organización y población celular. C y D muestran las células de las ratas tratadas con EGb y NAC respectivamente, se observa una tendencia a preservar la organización y la población celular. Magnificación = 40x.



Gráfica 2.A Se observan los efectos de una sola dosis de PM (12 mg/día, v.o.) sobre las células de la capa granulosa de cerebelo de rata, y los efectos del EGb (0.2 mL /kg, i.p. por cinco días) y NAC (150 mg/kg/día, i.p. por cinco días) sobre el tejido nervioso. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar (ES) con n = 10.

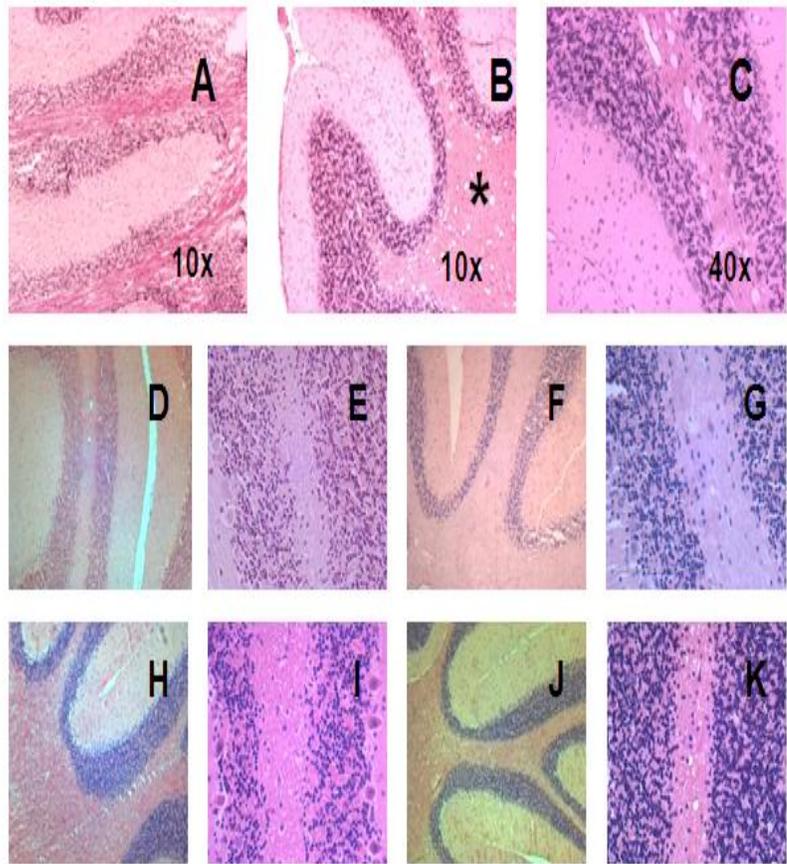


Grafica 2.B Se observa los efectos de dosis diarias por 30 días de PM (0.25 mL /día) sobre las células de la capa granulosa de cerebelo de rata, y los efectos del EGb (0.2 mL /kg, i.p. cada tercer día) y NAC (50 mg/kg, i.p. cada tercer día) sobre el tejido nervioso. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar (ES) con  $n = 10$ . El nivel de significancia estadística es  $* = P < 0.05$  versus las ratas control.

**H/E CEREBELO**

**Tratamientos**

- A. Control 10 x
  - B. Paratión 10 x
  - C. Paratión 40 x
  - D. Paratión y EGb 10 x
  - E. Paratión y EGb 40 x
  - F. Paratión y NAC 10 x
  - G. Paratión y NAC 40 x
  - H. Paratión y EGb 10 x
  - I. Paratión y EGb 40 x
  - J. Paratión y NAC 10 x
  - K. Paratión y NAC 10 x
- Preventivo (Daño agudo)
- Terapéutico (Daño Crónico)



El asterisco señala la dilatación de vasos sanguíneos.

Figura 6. Comparación de la estructura Cerebelar de ratas. Se observa la dilatación de vasos capilares en cerebelo de ratas tratadas con Paratión Metílico, así como la disminución o ausencia de dilatación en los tratamientos preventivos y terapéuticos.

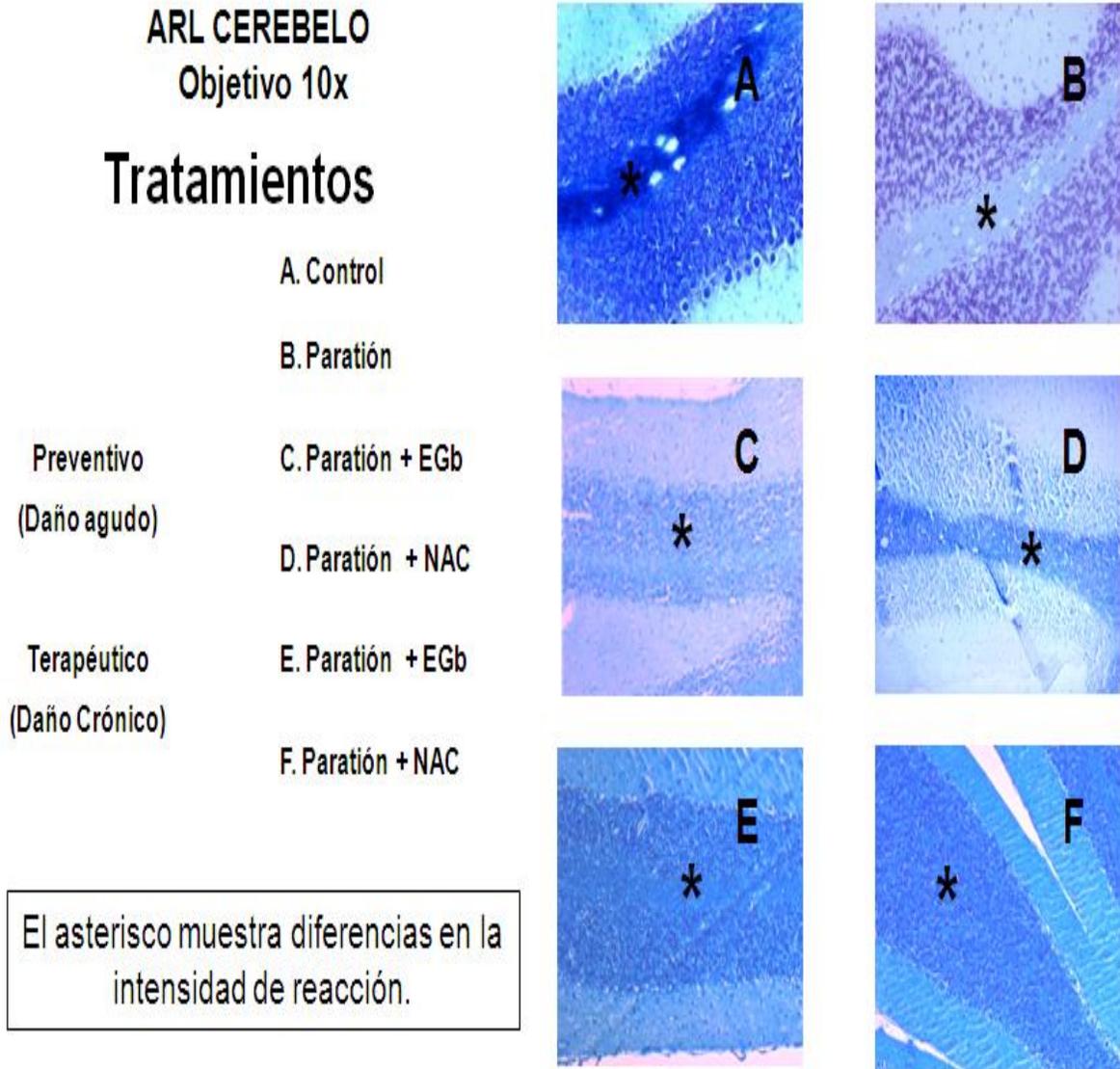
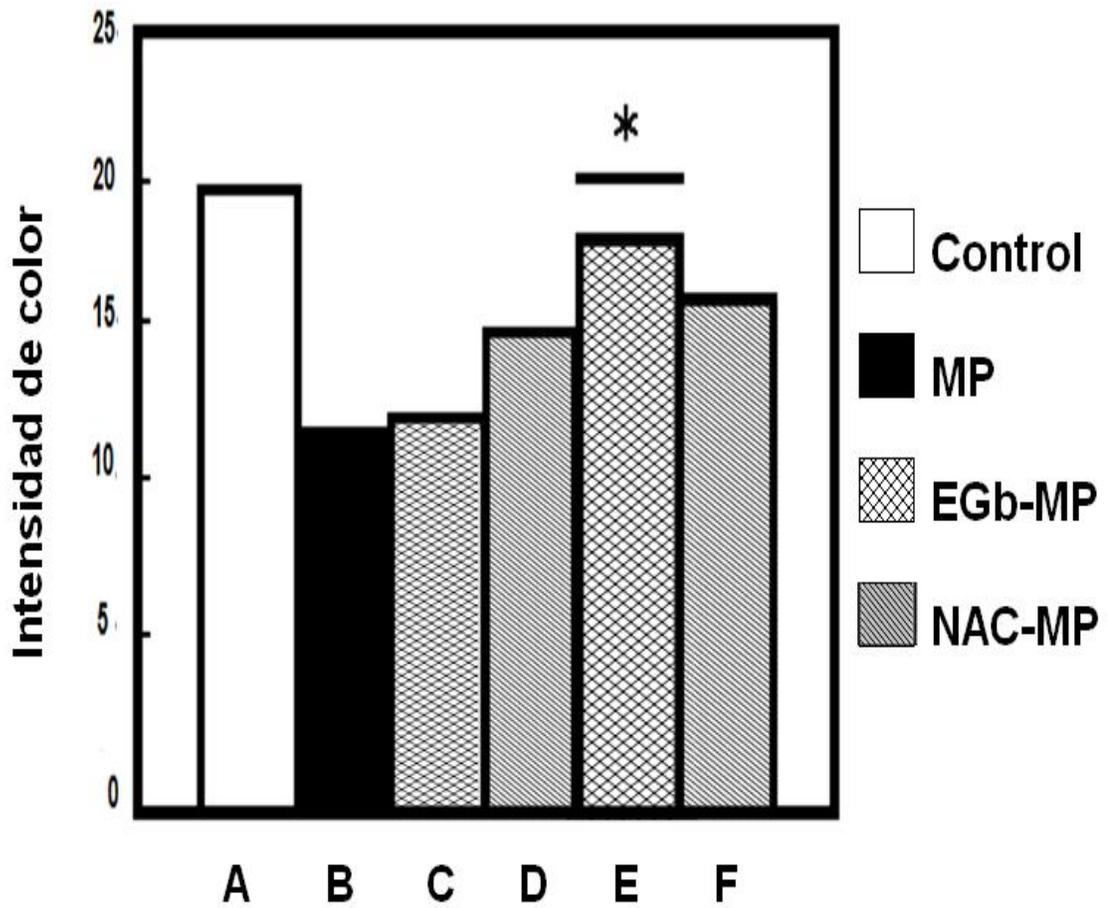


Figura 7. Detección de mielina con Azul rápido de luxol (ARL). Se observa disminución de la intensidad de reacción del colorante en las ratas tratadas con Paratión Metálico, ante el uso de antioxidantes se observa una tendencia a recuperar la intensidad de reacción.



Gráfica 3.A. Intensidad de color en sustancia blanca de vermis cerebelar de rata. A. Control, B. tratadas con PM, C. Tratadas con PM + EGb, D. tratadas con PM y NAC, E. Tratadas con EGb + PM y F. Tratadas con NAC + PM. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar (ES) con  $n = 10$ . El nivel de significancia estadística es  $* = P < 0.05$  versus las ratas control.

## DISCUSIÓN

El PM es un plaguicida empleado con mucha frecuencia en todo el mundo, y las intoxicaciones debidas a estos compuestos son comunes, las alteraciones neurofisiológicas van desde la intoxicación leve hasta la muerte por falla respiratoria <sup>54,55</sup>.

En nuestros resultados se observó en el grupo de estudio al que solo se le administró el PM 30% de animales de experimentación que presentaron falla respiratoria.

Ante la exposición a PM, se ha observado en modelos animales de experimentación afección del sistema nervioso. <sup>55,56</sup>

Investigaciones previas <sup>57</sup> han estudiado los efectos del Paratión Metílico en diversos componentes del encéfalo entre los cuales se incluyen: corteza cerebral, núcleos basales, hipocampo y cerebelo.

Los resultados en este estudio muestran el daño morfológico en hipocampo y cerebelo inducido por PM y el efecto del tratamiento con EGb y NAC.

En hipocampo:

Bloch-Shilderman (2005) en su estudio menciona algunos de los cambios cerebrales, entre los cuales observó afección en el hipocampo mostrando una disminución de células hipocampales ante la exposición a PM.

En el presente estudio se identificaron los cambios en hipocampo debido a que es considerada una área del encéfalo particularmente susceptible al daño neurodegenerativo.

Investigaciones en cultivos celulares de células hipocampales expuestas a radicales libres de Oxido Nítrico <sup>58</sup> mostraron una disminución de la población celular, sin embargo al administrarse Ginkgo Biloba se observó atenuación del daño a nivel celular.

A nivel morfológico nosotros observamos una disminución de 66.6 % de la población neuronal en hipocampo expuesto a PM, así como cambios en su organización.

Sin embargo, se identificaron cambios ante la administración de los antioxidantes, en el tratamiento preventivo al plaguicida el EGb mostró pérdida celular de 38.4 % y la NAC 43.4

%, mientras que en tratamiento terapéutico al PM el EGb mostro 5% de pérdida celular y la NAC 11.8%.

Lo anterior muestra una menor perdida celular ante la administración de antioxidantes tanto en la administración preventiva como terapéutica siendo mayor en esta ultima, así como un mayor tiempo de acción de los mismos se traducirá en resultados más óptimos (Grafica 1). Por otro lado, de manera paralela se observo una mayor capacidad de la NAC para mantener la organización celular en las regiones hipocampales superior a la del EGb (Figura 1). Así como los resultados muestran que existe una mayor población celular del tratamiento preventivo con la NAC, mientras que en la fase terapéutica se observa mayor número de células en el tratamiento con EGb con respecto a la NAC.

Orie Brown(2006) describe afecciones al administrar Paratión Metílico en el hipocampo, que dan como resultado cambios neurofisiológicos y bioquímicos, nuestros resultados demuestran cambios en la población y organización celular del hipocampo lo cual se traduce en afección a las funciones propias del hipocampo el cual forma parte del sistema límbico y por lo tanto afectar las actividades cerebrales que incluyen los cambios anteriores, tales como afección a la memoria visual en individuos expuestos al plaguicida.

En Cerebelo:

Como se expuso anteriormente, el PM inhibe a la enzima acetilcolinesterasa <sup>(6-9)</sup> y también induce la producción de ROS. <sup>(10, 11, 17)</sup> Guo-Ross <sup>(3)</sup> reportaron que en cerebelo el efecto inhibitor del PM es insignificante. En el presente trabajo se observó que el tratamiento agudo y crónico del PM altera la estructura celular de vermis cerebelar, disminuyendo y desorganizando las células de la capa granulosa (Figuras 2A y 2B, respectivamente). La estructura normal se observa en la figura 2A. A su vez, la administración previa de EGb (Figura 2C) y NAC (Figura 2D) producen una ligera atenuación en estos cambios tisulares. En la intoxicación crónica, la estructura normal se observa en la figura 2A. El tratamiento con los antioxidantes usados disminuyó la magnitud del daño y mostró una tendencia a preservar la organización celular: EGb + PM (Figura 2C) y NAC + PM (Figura 2D). Los resultados obtenidos sobre el daño estructural a las neuronas concuerdan con los

resultados de otros estudios realizados con paraoxón, <sup>(18-22)</sup> así como en los cultivos celulares de neuronas de cerebelo. <sup>(23)</sup>

Estudios anteriores han demostrado los efectos antioxidantes del EGb, <sup>(24, 25, 26, 29, 30)</sup> su protección al sistema nervioso, <sup>(27, 28)</sup> así como su efecto en la rápida recuperación del tejido nervioso. Por otra parte, se ha demostrado que la NAC contrarresta la tensión oxidativa <sup>(32, 35, 36)</sup> generada por el carbofurano, <sup>(33)</sup> y por el diazinón. <sup>(34)</sup>

El conteo celular se presenta en las figuras 3 y 4. La intoxicación aguda con PM produjo  $45.8 \pm 1.6\%$  (media  $\pm$  DE) de pérdida celular comparada con el grupo control. El pretratamiento con EGb mostró  $27.5 \pm 2.4\%$  de pérdida celular, mientras que el pretratamiento con NAC mostró  $29.9 \pm 2.2\%$  de pérdida celular (Grafica 2).

En el tratamiento crónico, la pérdida celular fue de  $37.2 \pm 1.8\%$  para el PM (Figura 4) y se observó menor pérdida de células con la administración de EGb ( $1.8 \pm 1.6\%$ ) y de NAC ( $2.5 \pm 1.8\%$ ). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados muestran que los efectos antioxidantes del EGb y de la NAC protegen contra el daño neuronal (células de la capa granulosa del cerebelo) producido por el PM.

Xun Song (2004) en su estudio demuestra cambios en la permeabilidad capilar en la barrera hematoencefálica de animales de experimentación expuestos a Paratión Metílico, En la presente investigación se observó el daño causado a nivel de cerebelo y se identificó aumento en la dilatación de vasos sanguíneos en los grupos tratados con PM lo cual muestra un aumento de permeabilidad capilar (Figura 3c) sin embargo no se identificaron tales cambios en los grupos a los cuales se les administró los antioxidantes de manera preventiva y terapéutica.

Lo anterior podría explicar el paso de moléculas de mayor peso molecular a través de la barrera hematoencefálica y por lo tanto facilitar la entrada de los antioxidantes, y posteriormente revertir el aumento de permeabilidad causada por el plaguicida.

Por otro lado la ausencia de dilatación capilar en los grupos tratados con el EGb y NAC podría deberse a la acción vasorreguladora de los antioxidantes, al inducir la vasodilatación arterial (Clostre F 1999, alhemeyer B 2003) seguida de la vasoconstricción venosa, o al

reforzar la resistencia capilar y aumentar el flujo sanguíneo central y periférico (Zhang WR 2000) haciendo más eficiente la irrigación y dando lugar a homeostasis tisular (Limanova OA 2002).

De manera paralela, se han observado en pacientes con hipomielinación, afección de estructuras cerebelares e histológicamente destacan degeneración celular en la capa granulosa del cerebelo (Van Der Naap 2007).

En la mielina:

Smulders (2004) en su estudio observa adelgazamiento de las vainas de mielina, infiltración fagocitaria y desmielinización de segmentos internodales, así como la aparición de racimos de axones amielínicos o ligeramente mielinizados.

Nuestros resultados muestran la intensidad de reacción del azul rápido de luxol en la mielina, colorante específico para la detección de la misma, la cual mostró una disminución en los especímenes tratados con Paratión, no así en los grupos que fueron tratados de manera preventiva y terapéutica (Fig. 4c,d,e,f) lo cual sugiere una tendencia a disminuir la pérdida de mielina ante la exposición al Paratión Metálico con el uso de antioxidantes.

Lo anterior puede explicar que si la mielina permite la transmisión de impulsos nerviosos entre diversas partes del organismo, ya que actúa como aislante electroquímico permitiendo el transporte saltatorio del impulso nervioso, por lo tanto, al afectarse la cantidad de esta entre un nodo nervioso y otro podría dar como resultado fallas en la conducción del impulso nervioso ya que no podrán conducirse con la suficiente velocidad o la información quedara detenida en el axón.

## CONCLUSIONES

La exposición a PM produce daño en la estructura de hipocampo y cerebelo.

Ante su exposición se puede observar cambios en la organización celular, así como disminución de la misma, y pérdida de mielina.

En Hipocampo:

Los tratamientos con EGb y NAC disminuyen el daño producido por el PM en las células del hipocampo. El efecto protector antioxidante fue observado en tanto en tratamiento agudo como en crónico. El EGb muestra una mayor tendencia a preservar la población celular en comparación con la NAC, la cual a su vez muestra mayor capacidad para conservar la organización celular con respecto al EGb. Ambos antioxidantes presentan mejores resultados ante el tratamiento terapéutico que ante el preventivo.

En Cerebelo:

El Paratión metílico afecta las células de la capa granulosa del cerebelo produciendo disminución del número de células así como desorganización de las mismas. El uso de antioxidantes como el EGb o NAC produce la atenuación del daño neuronal. Los resultados de este trabajo fundamentan el desarrollo de futuras investigaciones con antioxidantes para prevenir y tratar el daño neuronal de seres humanos expuestos laboralmente a los plaguicidas.

En Mielina:

El Paratión Metílico produce pérdida de mielina en la sustancia blanca del cerebelo, con la administración de EGb o NAC se reduce la pérdida de esta.

Los resultados de la presente investigación muestran la bases para futuras investigaciones sobre la prevención y efectos terapéuticos de la administración de antioxidantes ante el daño neurofisiológico en seres humanos que actualmente laboran y se encuentran expuestos al uso de plaguicidas. En resumen, postulamos que ambos antioxidantes atenúan el daño estructural en las neuronas de Hipocampo y Cerebelo, así como atenuación en la pérdida de mielina de rata producido por las intoxicaciones agudas y crónicas con el PM.

## REFERENCIAS

1. Pajoumand A, Shadnia<sup>1</sup> S, Rezaie A, Abdi M and Abdollahi M. Benefits of magnesium sulfate in the management of acute human poisoning by organophosphorus insecticides. *Human & Experimental Toxicology* (2004) 23: 565- 569
2. Lein PJ and Fryer AD. Organophosphorus Insecticides induce Airway Hyperreactivity by Decreasing Neuronal M2 Muscarinic Receptor Function Independent of Acetylcholinesterase Inhibition. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 83, 166–176 (2005)
3. Oncu M, Gultekin F, Karao E, Altuntas I and Delibas N. Nephrotoxicity in rats induced by chlorpyrifos-ethyl and ameliorating effects of antioxidants. *Human & Experimental Toxicology* (2002) 21, 223 ± 230
4. Clermont P. Chimie organique. Note sur la preparation de quelques ethers. *C R Acad Sci (Paris)* 1854; 39: 338-341.
5. Gallo MA, Lawryk NJ. Organic phosphorus pesticides. En: Hayes WJ, Laws ER, editores. *Handbook of pesticide toxicology*. San Diego: Academic Press; 1991; 917-1.123.
6. Baños JE, Bosch F. Aspectos históricos de los organofosforados. *Med Clin (Barc)* 1992; 99: 718-719.
7. Tsatsakis AM, Bertsias GK, Liakou V, Mammias I, Stiakakis I and Tzanakakis GN. Severe fenthion intoxications due to ingestion and inhalation with survival outcome. *Human & Experimental Toxicology* (2002) 21, 49 ± 54.
8. Li Y, McCrory DF, Powell JM, Saam H and Jackson-Smith D. A Survey of Selected Heavy Metal Concentrations in Wisconsin Dairy Feeds. *J. Dairy Sci.* 88:2911–2922.
9. Kamanyire R and Karalliedde L. Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occupational Medicine* 2004;54:69–75.

10. Ferrer A, Martinez J. Insecticidas. En: Marruecos L, Nogué S, Nolla J, editores. Toxicología clinica. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica, 1993; 233-252.
11. Martinez J. Intoxicación por organofosforados: enfoque actual de esta entidad clinica. Med Clin (Barc) 1992; 98: 702-705.
12. Chapalamadugu S, Chaudhry GR. Microbiological and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates. Crit Rev Biotechnol 1992; 12: 357-389.
13. Matthews H. Excretion of insecticides. Pharmacol Ther 1979; 4: 657-675.
14. Smulders CJGM, Bueters TJH, Vailati S, Van Kleef RGDM and Vijverberg HPM. Block of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors by Organophosphate Insecticides. TOXICOLOGICAL SCIENCES 82, 545–554 (2004).
15. [http://neurologiadeltrabajo.sen.es/journeurotox99\\_ponencia2.nt.htm](http://neurologiadeltrabajo.sen.es/journeurotox99_ponencia2.nt.htm)
16. Tafuri J, Roberts J. Organophosphate poisoning. Ann Emerg Med 1987; 16: 193-202.
17. Hampel H et col. Measurement of Phosphorylated Tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer. Arch Gen Psychiatry. 2004; 61:95-102.
18. Johnson GVW and Stoothoff WH. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. Journal of Cell Science 117, 5721-5729.
19. Abraha A, Ghoshal N, Gamblin T, Cryns V, Berry RB, Kuret J and Binder LI. C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. Journal of Cell Science 113, 3737-3745 (2000).
20. Bianchini A, Monserrat JM. Effects of Methyl parathion on Chasmagnathus granulatus hepatopancreas: protective role of Sesamol. Ecotoxicol Environ Saf. 2006 May 1.
21. Pina-Guzman B, Solis\_Heredia MJ, Rojas-García AE, Uriostegui-Acosta M, Quintanilla-Vega B. Genetic damage caused by methyl-parathion in Mouse spermatozoa is related to oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol, 2006 Oct 15; 216(2): 216-24.

22. Fath T, Eidenmuller J and Brandt R. Tau-Mediated Cytotoxicity in a Pseudohyperphosphorylation Model of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, November 15, 2002, 22(22):9733-9741.
23. Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24:1121-1159.
24. Braak E, Braak H, Mandelkow EM (1994) A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol Berl* 87:554-567.
25. Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E and Mandelkow EM. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *The Journal of Cell Biology*. 156: 1051-1063, 2002.
26. Bloch-Shilderman E, Kadar T, Levy A, Sahar R, Rabinovitz I, and Gilat E. Subcellular Alterations of Protein Kinase C Isozymes in the Rat Brain after Organophosphate Poisoning. *JPET* 313:1082-1089, 2005.
27. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, *et al.* RAGE and amyloid- $\beta$  peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996;382:685-91.
28. Coria F, Moreno A, Rubio I, García MA, Morato E, Mayor F Jr. The cellular pathology associated with  $\beta$ -amyloid deposits in non-demented elderly individuals. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993;19:261-8.
29. Kalaria RN, Harshbarger-Kelly M, Cohen DL, Premkumar DRD. Molecular aspects of inflammatory and immune responses in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996;17(5):687-93.
30. Gonzalo Ruiz A. Alteraciones en los sistemas de neurotransmisión tras inyectar la proteína  $\beta$  amiloide (12-28) en el hipotálamo y en el tálamo anterior de la rata. *Rev Neurol* 1999;28(10):931-
31. Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1994;36:747-51.

32. Peinado MA, Moral ML, Esteban FJ, Martínez-Lara E, Siles E, Jiménez A, *et al.* Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares. *Rev Neurol* 2000;31(11):1054-65.
33. Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Baron P, Villalba M, *et al.* Activation of microglial cells by beta amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 1995;374:647-50.
34. Solerte SB, Cravello L, Ferrari E, Fioravanti M. Overproduction of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  from natural killer (NK) cells is associated with abnormal NK reactivity and cognitive derangement in AD. En: Conti A, Maestroni G, McCann S, Sternberg EM, Lipton JM, Smith CC, eds. *Neuroimmunomodulation. Perspectives at the New Millennium*. New York, The New York Academy of Sciences; 2000.(Annals of The New York Academy of Sciences; No. 917).
35. Mattson MP, Rydel RE. Amyloid ox-tox transducers. *Nature* 1996;382:674-5.
36. Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71(suppl):621S-9S.
37. Köse K, Dogan P. Lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in human erythrocyte membranes. I protective effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) *J Int Med Res* 1995; 23: 1-8.
38. Maitra I, Marcocci L, Droy-Lefaix M, Packer L. Peroxyl radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Biochemical Pharmacology* 1995; 49: 1649-1655.
39. Pietri S, Maurilli E, Drieu K, Culcasi M. Cardioprotective and anti-oxidant effects of the terpenoid constituents of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761). *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(2): 733-42.
40. Akiba S, Kawauchi T, Oka T, Hashizume T, Sato T. Inhibitory effect of the leaf extract of *Ginkgo biloba* L. on oxidative stress-induced platelet aggregation. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 46(6): 1243-1248.

41. Akisü M, Kültürsay N, Coker I, Hüseyinov A. Platelet-activating factor is an important mediator in hypoxic ischemic brain injury in the newborn rat. Flunarizine and *Ginkgo biloba* extract reduce PAF concentration in the brain. *Biol Neonate* 1998; 74(6): 439-44.
42. Makarewicz P, Onska M, Witek A, Farbisdzewski R. BN 52021, PAF-receptor antagonist, improves diminished antioxidant defense system of lungs in experimentally induced haemorrhagic shock. *Pol J Pharmacol* 1998; 50(3): 265-269.
43. Morales M, Lozoya, X. Calcium-antagonist effect of quercetin on aortic smooth muscle. *Planta Médica* 1994; 60(4): 313-317.
44. Wettstein A. Cholinesterase inhibitors and *Ginkgo* extract in the treatment of dementia. *Fortsch der Med* 1999; 117: 48-50.
45. Oyama U, Fuchs P, Katayama N, Noda K. Myricetin and quercetin, the flavonoid constituents of *Ginkgo biloba* extract, greatly reduce oxidative metabolism in both resting and  $Ca^{+2}$  loaded brain neurons. *Brain Research* 1994; 635: 125-129.
46. Rong Y, Geng Z, Lau BH. *Ginkgo biloba* extracts protect brain neuron against oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Brain Res* 1996; 20(1): 349-352.
47. Cohen-Salmond C, Venault P, Mortin B, Rafalli-Sebille M, Borkats M, Costre F, *et al.* Effects of *Ginkgo biloba* extracts (EGb 761) on learning and possible action on aging. *J Physiol Paris* 1997; 56(6): 291-300.
48. Osekie I, Aruoma, Barry Halliwell, Brigid M. Hoey, John Butler. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine* 1989; 6: 593-7.
49. J. DiMari, J. Megyesi, N. Udvarhelyi, P. Price, R. Davis and R. Safirstein. N-acetyl cysteine ameliorates ischemic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 1997; 272: F292-F298.

50. Bipanjeet Sekhon, Charanpal Sekhon, Mushfiquddin Khan, Sunil J. Patel, Inderjit Singh, Avtar K. Singh. N-Acetyl Cysteine protects against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain research* 2003; 971: 1-8.
51. Neville W. Knuckey, Donald Palm, Michael Primiano, Mel H. Epstein, Conrad E. Johanson. N- Acetylcysteine Enhances Hippocampal Neuronal Survival After Transient Forebrain Ischemia in Rats. *Stroke* 1995; 26:305-11.
52. K. Jayalakshmi, M. Sairam, S.B. Singh, S.K. Sharma, G. Ilavazhagan, P.K. Banerjee. Neuroprotective effect of N-acetyl cysteine on hypoxia-induced oxidative stress in primary hippocampal culture. *Brain Research*; 1046: 97-104.
53. Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* 1998; 3(2): 114-27.
54. Guoyao Wu, Yun-Zhong Fang, Sheng Yang, Joanne R. Lupton, Nancy D. Turner. The American Society for Nutritional Sciences *J. Nutr.* 2004; 134: 489-92.
55. Stacey A, Kardos and Lester G. Sultatos. Interactions of the Organophosphates Paraoxon with Mouse Brain Acetylcholinesterase. *Toxicological Sciences* 2000; 58: 118-126.
56. Gupta RC, Goad JT, Dettbarn WD. Cholinergic and noncholinergic brain biomarkers of insecticide exposure and effects. *Human & Experimental Toxicology* 2000;19:297-308.
57. Bastianetto S, Zheng WH, Quirion R. The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects and rescues hippocampal cells against nitric oxide-induced toxicity: involvement of its flavonoid constituents and protein kinase C. *J Neurochem* 2000; 74(6): 2268-2277.
58. R. Orié Browne, Liat Ben Moyal-Segal, Dominik Zumsteg, Yaron David, Ora Kofman, Andrea Berger, Hermona Soreq, and Alon Friedman. Coding region paraoxonase polymorphisms dictate accentuated neuronal reactions in chronic, sub-threshold pesticide exposure. *The FASEB Journal* 2006; 20: 1103-1113.

59. Xun Song, Carey Pope, Ramesh Murthy, Jamaluddin Shaikh, Bachchu Lal and Joseph P. Bressler. Interactive Effects of Paraoxon and Pyridostigmine on Blood-Brain Barrier Integrity and Cholinergic Toxicity 2004; 78: 241-247.
60. Clostre F. Ginkgo biloba Extract (EGb 761). State of Knowledge in the dawn of the year 2000. Ann Pharm Fr 1999; 57: 155-158.
61. Ahlemeyer B, Krieglstein J. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. Cell Mol Life Sci 2003; 60 (9): 1779-1792.
62. Limanova OA, Shtrygol Slu, Gromova OA, Andreev AV. Cerebrovascular and renal actions of bilobil and its effect on the metal ligand homeostasis (clinico-experimental study). Eksp Klin Farmakol 2002; 65(6): 28-31.
63. Van der Knaap MS, Linnankivi T, Paetau A, Feigenbaum A, Wakusawa K, Haginoya K, Köhler W, Henneke M, Dinopoulos A, Grattan-Smith P, Brockmann K, Schiffmann R, and S. Blaser. Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum. NEUROLOGY 2007;69:166-171.
64. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin L.H. Hematoxylin and Eosin. Laboratory Methods In Histotechnology, Armed Forces Institute of Pathology 1994; 53-54.
65. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin L.H. Hematoxylin and Eosin. Laboratory Methods In Histotechnology, Armed Forces Institute of Pathology 1994; 94.