



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



DETERMINACION DE NIVELES DE COLINESTERASA
EN CEREBROS E HIGADO DE RATAS EXPUESTAS
A AMBIENTES CONTAMINADOS CON GLUTOX Y
MALATION.

T E S I S

que presenta :

MIGUEL ANGEL LOPEZ CASTRO

para obtener el título de :

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

A S E S O R

M.V.Z. RENE ROSILES MARTINEZ

1 9 8 3.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCION

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSION

BIBLIOGRAFIA

I N D I C E

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL CONTROL DE INSECTOS	5
INSECTICIDAS NATURALES	10
INHIBIDORES DE LA QUITINA	11
HORMONAS JUVENILES Y ATRAYENTES SEXUALES	12
INSECTICIDAS MICROENCAPSULADOS	13
MECANISMOS DE ACCION DE LOS HIDROCARBUROS CLORINADOS	15
MECANISMOS DE ACCION DE LOS COMPUESTOS ORGANO - FOSFORADOS.	17
METODO COLORIMETRICO	19
METODO ACIDIMETRICO	19
METODO RADIOMETRICO	21

	Página
MATERIAL Y METODOS	22
RESULTADOS	27
DISCUSION	33
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFIA	

R E S U M E N

Los resultados del presente trabajo, representan los hallazgos en la actividad colinesterásica en encefalo de ratas de laboratorio, expuestos a aerosoles del insecticida glutox (clorofen-vinfos-diclorovos) y malation. El desarrollo de este experimento se llevó a cabo en 64 ratas albinas (incluyendo 14 testigos) de 200 gramos de peso aproximado.

Los animales utilizados fueron separados en 9 grupos de los cuales el 4o. y 9o. son grupos testigo.

La exposición del plaguicida glutox en los primeros tres grupos, se utilizó a la concentración de 1 ml./m^3 , durante una, dos y cuatro horas cada tercer día con un mes de duración.

En esta aplicación la actividad de la enzima fué de $.23 \Delta \text{ pH/ hrs.}$ como promedio en los grupos citados.

En la siguiente fase del experimento con el pesticida glutox, se tomaron: 4 ratas del grupo No. I, 4 ratas del grupo No. II, y 8 ratas del grupo No. III, aplicando esta vez el compuesto a la concentración de 7 ml./m^3 con 10 horas de exposición, obteniendo como promedio en los grupos referidos (5to., 6to. y 7mo) $.08 \Delta \text{ pH/ hrs.}$

En la última parte la actividad enzimática se redujo notablemente, cuando se utilizó el insecticida malation a la concentración de $7 \text{ ml./m}^3 \sim .04 \Delta \text{ pH/hrs.}$ Cabe hacer notar que el malation es un insecticida organofosforado puro a diferencia del glutox que es un compuesto con moléculas de fosforo, cloro y vinil.

"DETERMINACION DE NIVELES DE COLINESTERASA EN CEREBROS E
HIGADOS DE RATAS EXPUESTAS A AMBIENTES CONTAMINADOS CON
GLUTOX Y MALATION"

I N T R O D U C C I O N

El mejoramiento de las condiciones del medio urbano y rural debe tener máxima prioridad en todos los programas de desarrollo. La eliminación y la disminución de las poblaciones de vectores de enfermedades, es tan importante como el abastecimiento de agua, la instalación de sistemas de alcantarillado, o la construcción de Escuelas y Centros de Salud.

Ahora bien, la eficacia de los métodos químicos y biológicos de lucha contra la fauna nociva muchas veces es pasajera, mientras que el mejoramiento del medio, permite en algunos casos obtener su eliminación permanente. (12)

Por otra parte actualmente, existen grandes áreas donde el hambre es el común denominador. Producir alimentos para eliminar la deficiente nutrición mundial es una de las prioridades a las que debe de enfrentarse el género humano.

Cómo es cada vez más difícil abrir nuevas tierras de culti-

vo, resulta más eficaz tratar de incrementar el rendimiento por área y controlar las plagas que afectan a los cultivos. El ser humano ha roto el equilibrio de los ecosistemas, de modo que las plagas son cada vez más difíciles de controlar. Después de muchos miles de años, la naturaleza había logrado por sí misma, mantener un equilibrio al establecer monocultivos en grandes extensiones y provocar así que muchas especies de insectos desaparecieran. Otras, sin embargo, encontraron un medio propicio para desarrollarse y se convirtieron pronto en una plaga al encontrar un exceso de alimento y no contar ya con enemigos naturales que las destruyesen.

Se calcula que casi una tercera parte de los productos agrícolas producidos en el mundo es destruida por los insectos y los roedores. La forma de controlarlos siempre ha preocupado al hombre; al principio se utilizaban métodos físicos para ahuyentarlos, tales como quemar los campos o producir humos densos. Desde el siglo XVII, se ha usado la nicotina del tabaco para el control de áfidos.

Las piretrinas obtenidas de las flores del crisantemo se han utilizado también como defensas contra los insectos.

A N T E C E D E N T E S

METODOS UTILIZADOS PARA EL CONTROL DE INSECTOS

El primer insecticida sintético que se usó fué el ortodinitro cresol, un insecticida de contacto, introducido en Alemania a fines del siglo XIX. En 1930, también en Alemania empezaron a producirse otros insecticidas (los organotiocinatos) que -- han mostrado tener buenas propiedades para el control de los insectos.

No fué sino hasta la aparición del DDT, durante la segunda -- -Guerra Mundial, que se hizo posible un control químico de los insectos verdaderamente eficaz y en gran escala.

Aunque conocido desde 1874, no fué hasta 1939-1942 que el Dr. Muller, en Suiza, descubrió las propiedades del DDT como in-- secticida. En un principio se pensó que este compuesto sería la solución total al problema de las plagas de insectos; pero, aunque gracias al DDT se han salvado millones de vidas, con-- trolando a los insectos que transmiten enfermedades como el -- paludismo y el tifo, este compuesto tiene desventajas; la más seria de las cuales es su gran persistencia en el medio am-- biente. Esta persistencia, que permite el control eficaz de-

A N T E C E D E N T E S

METODOS UTILIZADOS PARA EL CONTROL DE INSECTOS

El primer insecticida sintético que se usó fué el ortodinitro cresol, un insecticida de contacto, introducido en Alemania a fines del siglo XIX. En 1930, también en Alemania empezaron a producirse otros insecticidas (los organotiocinatos) que -- han mostrado tener buenas propiedades para el control de los insectos.

No fué sino hasta la aparición del DDT, durante la segunda -- Guerra Mundial, que se hizo posible un control químico de los insectos verdaderamente eficaz y en gran escala.

Aunque conocido desde 1874, no fué hasta 1939-1942 que el Dr. Muller, en Suiza, descubrió las propiedades del DDT como insecticida. En un principio se pensó que este compuesto sería la solución total al problema de las plagas de insectos; pero, aunque gracias al DDT se han salvado millones de vidas, controlando a los insectos que transmiten enfermedades como el paludismo y el tifo, este compuesto tiene desventajas; la más seria de las cuales es su gran persistencia en el medio ambiente. Esta persistencia, que permite el control eficaz de

Los insectos por largo tiempo, contaminan el medio ambiente - acumulativamente y, al no ser degradado, entra a las cadenas alimenticias que alcanzan al hombre.

Poco después del descubrimiento del DDT, aparecieron en el - mercado muchos otros insecticidas clorados, como por ejemplo, el clordano(1945), el heptacloro (1948), el aldrín, el diel- drín toxafeno (1948) y el endrín (1952).

Casi todos ellos actúan como venenos estomacales; en la ac- tualidad está prohibido el empleo de la mayoría de ellos en varios países debido a su alta persistencia en el medio am- biente. Su uso se ha restringido también por que una gran- cantidad de insectos han desarrollado resistencia a ellos.- En los Estados Unidos, casi todos los insecticidas organo-- clorados, han sido prohibidos, pero algunos de ellos se si- guen produciendo debido a que las instalaciones de las fá-- bricas no se pueden destinar a otro uso; esto convierte a - los Estados Unidos en el principal exportador de estos pro- ductos "prohibidos" a otros países. Esto no ha pasado inad- vertido a algunos sectores de la sociedad norteamericana; - así se han formado Comités que estudian el daño de añadir - estos productos al medio ambiente. La producción de otros- insecticidas, como el hexaclorobenceno y el mirex, ha sido-

ya suspendida totalmente. (6)

Otro tipo de insecticidas son compuestos organofosforados desarrollados durante la Segunda Guerra Mundial como gases para atacar el sistema nervioso. Fue en el año de 1944, - cuando se encontró su utilidad como insecticidas.

El primero en comercializarse fue el paratióñ que continúa utilizándose mucho actualmente.

A la fecha se han analizado más de 120,000 compuestos organofosforados para probarlos como insecticidas potenciales, por lo que en el mercado mundial se encuentra un gran número de compuestos de esta familia. Esto tiene algunas ventajas con respecto a los organoclorados: persisten mucho - menos en el medio ambiente y se degradan fácilmente, reduciendo la contaminación.

Sin embargo, esta ventaja se convierte en desventaja en - climas muy húmedos y cálidos, pues estas sustancias son poco eficaces y para mantener a un cultivo libre de insectos hay que aplicarlo varias veces. Otra característica de los organofosforados es una selectividad mayor, que los organoclorados, ellos actúan contra menos especies de insectos, son más específicos y menos indiscriminados.

Los insecticidas organofosforados inhiben una enzima (acetilcolinesterasa), que es fundamental para la transmisión

de los impulsos nerviosos; producen la muerte por una -
descompensación del sistema nervioso. Debido a esto son
muy tóxicos y se requiere que los empleen personas espe-
cializadas; ellos son los insecticidas que más vidas hu-
manas han cobrado, sobre todo por falta de precaución
en su aplicación. Dentro de este grupo, se encuentran -
algunos compuestos con propiedades sistémicas o sea, -
que al aplicarlos a las plantas, se distribuyen en su -
interior, cuando los ataca un insecto, éste ingiere par-
te del insecticida y muere.

Estos insecticidas no afectan a las plantas porque - -
ellas no tienen sistema nervioso. Otra ventaja de estos
insecticidas sistémicos es que no es necesario aplicar-
los continuamente para proteger los nuevos brotes de la
planta, pues se distribuyen conforme ésta va creciendo.
Una de las desventajas de este tipo de compuestos es -
que contaminan integralmente a las plantas que va a con-
sumir el hombre, de manera que una simple lavada no eli-
mina los compuestos de los tejidos.

A propósito de éstos se han hecho muchos estudios y se
ha visto que normalmente, los compuestos organofosfora-
dos se hidrolizan después de permanecer cierto tiempo -

dentro de las plantas. Por esta razón, las Instituciones Agrícolas, han establecido límites mínimos de tiempo entre la última aplicación de insecticidas y la cosecha, con el fin de dar tiempo a su degradación.

Un tercer grupo de insecticidas es el de los carbamatos, éstos se empezaron a desarrollar en los años '40, también en Suiza, pero no fué sino hasta 1953 que salió al mercado el primer insecticida carbámico: el isolan.

Los carbamatos son particularmente activos contra los insectos chupadores de plantas y los áfidos, difíciles de controlar por los organofosforados. Este tipo de insecticidas actúan también inhibiendo la acetilcolinesterasa; sin embargo, son mucho menos tóxicos que los fosforados. Por ser menos tóxicos, más seguros y de más fácil aplicación, en el presente existen varios de ellos en el mercado y se usan en gran escala. Aunque son un poco más persistentes que los primeros también son degradados por el medio ambiente. Se suelen utilizar cuando los insectos desarrollan resistencia a los organoclorados y a los organofosforados.

INSECTICIDAS NATURALES

Se ha mencionado ya, que la nicotina tiene muy buenas propiedades para el control de insectos, pero no se utiliza en la actualidad porque es muy tóxica para el ser humano.

Otro grupo de compuestos vegetales que se usan actualmente en gran escala son las piretrinas, aisladas originalmente de las flores de piretro. Esta planta se ha podido cultivar en diferentes partes del mundo para extraer de sus flores las sustancias activas. Estas son muy eficaces por poseer un efecto "noqueador", o sea, el insecto cae aún antes de morir.

Muchos aerosoles usados actualmente para el control doméstico de insectos contienen piretrinas; sin embargo, no se utilizan en la agricultura por ser degradadas muy fácilmente por el medio ambiente, la luz y el sol, las vuelven inactivas en cuestión de horas. A mediados de los años '60, en Inglaterra se inició una investigación para obtener piretrinas modificadas que pudieran resistir las condiciones climáticas y, a principios de los '70, apareció la permetrina que es capaz de resistir varios días el efecto del medio ambiente.

En los últimos años se han aislado un gran número de piretrinas modificadas y se han empezado a usar en la agricultura. Estos compuestos tienen muchas ventajas sobre los otros insecticidas: Con unos cuantos gramos de principio activo se puede lograr la misma eficacia que con un kilogramo de insecticidas y son muy poco tóxicos para los seres humanos y los mamíferos en general. Es posible que en el futuro se incremente su uso, el cual está actualmente restringido por su alto costo.

INHIBIDORES DE LA QUITINA

La quitina es uno de los componentes orgánicos más abundantes que permite la reproducción de los insectos, de ciertos invertebrados y, de los hongos, pero que está ausente en las plantas y en los vertebrados. Si se encontrara un compuesto que interfiriese selectivamente en la síntesis de quitina, este sería un insecticida con mayores ventajas que los inhibidores de acetilcolina o los venenos estomacales. En los últimos años han aparecido muchos informes en la literatura científica acerca de los inhibidores de quitina pero ningún compuesto de este tipo ha salido todavía al mercado.

OTROS METODOS DE CONTROL

Otros métodos de control de insectos usan hormonas juveniles y los llamados atrayentes sexuales. Mientras las hormonas juveniles se encuentran presentes en la larva, ésta no pasará a estado adulto. Así, si en una larva se mantiene exógenamente el nivel de hormona juvenil, ella no podrá desarrollarse y morirá sin haber procreado, lográndose así controlar la generación siguiente. Las hormonas juveniles son específicas en cada insecto, por lo que se puede controlar un insecto dañino sin afectar a otros que no lo son.

Sin embargo, esta característica ha provocado que este tipo de compuestos no se comercialicen rápidamente, pues su estructura es muy refinada y, en consecuencia, su producción en gran escala es incosteable.

Los llamados atrayentes sexuales son sustancias que sirven a la comunicación entre insectos y que determinan el momento de la maduración sexual. Según el tipo de insecto, la hembra o el macho segregan los atrayentes. Hoy se conocen muchos atrayentes sexuales, los que son extraordinariamente eficientes y pueden ser detectados por los insectos en concentraciones muy bajas y grandes distancias;

mediante ellos, los insectos reconocen su pareja y la pueden encontrar aún en lo más intrincado de una selva. Alguna vez se pensó que los insectos se podían controlar poniendo atrayentes en trampas con una cantidad muy pequeña de insecticida. Sin embargo, esto no se pudo llevar a cabo pues resultaba muy costosa la instalación de un gran número de trampas. No obstante, este método es muy eficiente para conocer continuamente la densidad de insectos en un campo de cultivo, para ver si ha llegado una plaga dañina al cultivo y para saber si el nivel de población puede causar problemas económicos. De esta forma se pueden planear bien las aspersiones extensivas de insecticidas y no aplicarlos sin necesidad. Así, se evita la contaminación del medio ambiente y se economizan grandes sumas de dinero. Los atrayentes sexuales se han utilizado también para ocasionar confusión en poblaciones de insectos; se difunden los atrayentes sexuales sobre una gran superficie y los insectos, no sabiendo hacia donde se dirigen, no logran encontrar pareja y se elimina la siguiente generación.

Un método que está dando muy buenos resultados para el control continuo de insectos es el de microencapsulado,

que consiste en meter un insecticida activo dentro de un recipiente de plástico poroso; el tamaño de los poros determina la velocidad con la cual el insecticida se libera al medio ambiente. La ventaja principal de este método, es que se puede controlar la cantidad de insecticida en la atmosfera para condiciones de temperatura y humedad dadas, además, sólo se degrada el insecticida que sale de la microcápsula. Otro sistema de microencapsulado utiliza polímeros biodegradables que, conforme se va degradando, van soltando al insecticida. (15)

MECANISMO DE ACCION

Originalmente todo lo que se requería conocer era la toxicidad aguda de los insecticidas hacia aves y se consideró que era el evidente envenenamiento debido a exposiciones accidentales. La historia de los insecticidas desde 1942 cuando el DDT fué patentado y se hizo posible para el uso público en 1945, claramente demuestra que varios tipos de problemas no anticipados se han desarrollado, los cuales son radicalmente diferentes de la toxicosis aguda. Problemas tales como el adelgazamiento del cascarón, muerte de peces, inducción enzimática, residuos de bajo nivel gene-

realizados e incremento biológico de los residuos ambientales han requerido más estudio del mecanismo de acción de los insecticidas, su metabolismo e impacto ambiental.

MECANISMOS DE ACCION DE LOS HIDROCARBUROS CLORINADOS

El mecanismo de acción exacto de los insecticidas de hidrocarburos clorinados con la posible excepción del DDT, es desconocido, generalmente son estimulantes difusos o depresores del sistema nervioso central. Para 1946, se sabía que el DDT incrementa la tasa de disparos de las fibras nerviosas (Roeder y Wiant, 1946). El DDT se encontró que disminuye el umbral de las membranas para un potencial de acción a ocurrir y una vez que sucede la estimulación nerviosa una descarga de acciones potenciales ocurre. Esto ayuda a explicar los finos temblores musculares generalizados que se observan en el envenenamiento por DDT. (5)

Estudios más recientes que utilizan técnicas de pinza de axones en calamares gigantes, han demostrado que el DDT, desacelera el apagado de las corrientes de sodio de la membrana e inhibe el encendido de la corriente de potasio

en la membrana (Narahashi, 1969). Ya que cuando una membrana nerviosa normal es estimulada, hay una introducción inicial de iones de sodio durante uno o dos milisegundos, seguida por una salida de iones sodio para restaurar la membrana nerviosa más positiva y de esa manera disminuir el umbral (parcialmente despolarizado) para que otra acción potencial ocurra.

Desde luego, si el efecto se vuelve suficientemente severo, entonces la membrana nerviosa estaría permanentemente despolarizada. Los nervios sensitivos son más sensibles al DDT que los nervios motores.

Los tremores musculares observados en el envenenamiento por DDT son el resultado de efectos locales en fibras nerviosas y estimulación de los reflejos espinales, ya que los tremores musculares también ocurren en animales decerebrados y decerebelados. Sin embargo los efectos del DDT también se presentan en el cerebro de animales intactos. (13)

MECANISMOS DE ACCION DE LOS COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS

Las anticolinesterasas se cuentan entre los comparativamente pocos fármacos cuyo mecanismo de acción en la actualidad puede describirse en términos moleculares exactos. Ello puede relacionarse directamente con los efectos farmacológicos globales y ha motivado el advenimiento de compuestos útiles que tienen la facultad de invertir las acciones de anticolinesterasas. Las interacciones entre la mayor parte de las anticolinesterasas y la acetilcolinesterasa difieren principalmente en aspectos cuantitativos de la reacción entre acetilcolinesterasa y el substrato normal la acetilcolina.

Se ha comprobado que la superficie activa de la unidad de enzima, consiste en dos sitios, uno aniónico y otro esterático. En el sitio aniónico (una carga negativa, probablemente el radical carboxilo libre de un aminoácido dicarboxílico) el átomo de N cuaternario positivamente cargado de la AC es atraído por fuerzas electrostáticas, el enlace se consolida por fuerzas hidrófobas que actúan sobre los radicales N-metilo y por fuerzas de dispersión London-Van-der Waals.

El sitio esterático consiste en esencia en dos componentes situados a 2.5 Å y 5 Å, respectivamente, del sitio aniónico: una función potencialmente ácida (el radical hidroxilo de la serina) y un grupo nucleótico básico (un radical imidazol de la histidina). El radical imidazol, por enlace de hidrógeno, aumenta la actividad nucleofila del radical hidroxilo de la serina, permitiendo que tenga acción mutua con el átomo C carbonilo electrófilo de AC. Se forma un enlace covalente con aparición de un producto intermedio de enzima acetilada y liberación de colina. Después, el átomo C electrófilo del radical acetilo experimenta ataque nucleófilo por el átomo de oxígeno electronegativo de una molécula de agua; así el complejo acetilo-enzima experimenta hidrolisis, y los productos son enzimas regeneradas y ácido acético. Las constantes de velocidad de esta sucesión de reacciones son muy rápidas, por ejemplo, el tiempo necesario para la hidrolisis completa de una molécula de AC (tiempo de recambio) es solo de 80 microsegundos. (7)

O B J E T I V O

El objetivo del presente trabajo es conocer los efectos de los insecticidas Glutox y Malation sobre los niveles

de colinesterasa cerebral y hepática en ratas blancas de laboratorio.

MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE LA ENZIMA COLINESTERASA EN LA EXPOSICIÓN A LOS INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.

MÉTODO COLORIMÉTRICO

En este método la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa es medida siguiendo el incremento producido - por el efecto de la tiocolina, cuando esta reacciona con el Ion Ditiobisnitro Benzoato, esta reacción es muy rápida y el análisis es por sensibilidad para producir el anion amarillo de 5-TIO-2 Acido Nitrobenzoico. El porcentaje de color producido, es medido a 412 nm en el fotómetro. La reacción con el TioI, ha demostrado ser lo suficientemente confiable. (4)

MÉTODO ACIDIMÉTRICO

Determinación de la colinesterasa por el procedimiento - de análisis volumétrico automático.

Se mezcla la sangre entera con agua, se deja durante 10 minutos a 38°C para asegurar la hemolisis completa, posteriormente se adhiere cloruro de sodio hasta equilibrar la temperatura. El paso siguiente es colocar los electrodos dentro de la sangre diluida y ajustar el analizador gráfico en pH Stat. Se mide el pH de la muestra y se ajusta el analizador gráfico a pH 7.40. A continuación empieza a trabajar el analizador volumétrico y toma lugar en la prueba la liberación espontánea del ácido (esta liberación la podemos observar en varios tejidos: hígado, músculo, cerebro, riñón, bazo, etc.) Posteriormente se agregan 1.0 ml. de la solución del sustrato y se para el aparato cuando el analizador gráfico nos ha dado una curva con una longitud adecuada.

La curva del analizador gráfico indica en U. Mol. la cantidad utilizada de Na OH. La abscisa, indica el tiempo en minutos. Una simple lectura y conversión indicará la actividad colinesterásica, ésta, esta expresando en U. Mol. de ácido liberado por ml. de sangre por minuto a 38°C .

El cálculo se deduce de la producción de ácido por la hidrólisis enzimática de acetilcolina y por la variación del pH no específico que se mide con los controles. (9)

METODO RADIOMETRICO

En este método la muestra de tejido cerebral se suspende en solución Buffer de carbono 14 acetilcolina. Aquí la hidrolisis de acetilcolina, es calculada por la radiación presente en la línea de la fase móvil del cromatograma.

El carbono 14 de la solución de acetilcolina, indicará aproximadamente 100 radiaciones cuando la muestra de tejido ha tenido una actividad de colinesterasa normal - (cerca de los 600 centelleos por minuto) que son leídos en la línea tope del cromatograma. Cuando la muestra - ha perdido su actividad la lectura será de 64-100 centelleos por minuto (110-170 radiaciones aproximadamente).
(3).

MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo se utilizaron 2 plaguicidas :

GLUTOX * que es una mezcla de 2 insecticidas (clorofenvin fos y diclorovos) y MALATION ** que es un pesticida organofosforado puro.

Estos compuestos fueron aplicados por aspersión a ratas - (rattus norvegicus) variedad albina de 200 gramos de peso aproximado, y se utilizaron diferentes concentraciones y tiempos de exposición con el objeto de conocer los cambios en los niveles de colinesterasa y observar las posibles variaciones en la conducta.

Para la realización de este experimento se emplearon sesenta y cuatro ratas (32 ratas hembra y 32 ratas macho), de las cuales quedaron como testigo catorce de ellas. Estos animales fueron confinados en jaulas de acrílico, se les dió alimento para rata en forma de Pelets y el agua fué suministrada en botellas con adaptación de gotero.

En la parte inicial de este trabajo se utilizó el compuesto GLUTOX, el cual fué mezclado con agua a la concentración de 1 ml./m^3 asperjándose esta solución con una

*, ** Helios de México.

máquina eléctrica (tornado). El plaguicida se recibió en forma de aerosol por cuarenta ratas, de ambos sexos, los diez ratones restantes se utilizaron para ser expuestos al Malation.

El tiempo en el que se llevó a cabo el trabajo con el plaguicida Glutox, fué en su primera fase de treinta días, con tres aplicaciones por semana (cada tercer día) doce exposiciones en total, y, conforme a los grupos y horarios siguientes:

GRUPO No. I	5 machos y 5 hembras con exposición al plaguicida de una hora al día, acumulando un total de 12 horas.
GRUPO No. II	5 machos y 5 hembras con exposición al plaguicida de 2 horas al día, acumulando un total de 24 horas.
GRUPO No. III	10 machos y 10 hembras con exposición al plaguicida de 4 horas al día, acumulando un total de 48 horas.
GRUPO No. IV	4 machos y 4 hembras. Grupo testigo.

Cabe hacer notar que entre cada exposición se dejaron 24 horas (aproximadamente) de descanso, que consistió

en sacarlas del cuarto contaminado para llevarlas a otra habitación suficientemente ventilada y con ambiente normal. De cada 3 aspersiones semanales se dejaron 72 horas en recuperación.

Para continuar con el trabajo y con el fin de poder observar cambios más severos que los anteriores se formaron nuevos grupos en los que se utilizaron animales al azar de los grupos anteriores.

Estos grupos quedaron en la forma siguiente:

Para formar el GRUPO No. V se tomaron 2 hembras y 2 machos del GRUPO No. I.

Para formar el GRUPO No. VI se tomaron 2 machos y 2 hembras del GRUPO No. II.

Para formar el GRUPO No. VII se tomaron 4 hembras y 4 machos del GRUPO No. III.

A estos grupos se les administró una dosis mayor del insecticida Glutox (7 ml./m^3) con una duración de 10 horas continuas dentro del ambiente contaminado.

De esta forma el GRUPO No. V acumula 12 horas de exposición al compuesto en la primera fase más 10 horas continuas de la segunda aspersión.

El GRUPO No. VI acumula 24 horas de exposición al insecticida en la primera parte más 10 horas de la segunda aspersión.

El GRUPO No. VII tiene en su haber 48 horas de exposición al plaguicida en la parte inicial, más 10 horas continuas de exposición al Clorofenvinfos-diclorovos.

Así el GRUPO No. V reúne 22 horas de exposición, el GRUPO No. VI, 34 horas y, el GRUPO No. VII, 58 horas en total.

Al término de las exposiciones mencionadas, los ratones - fueron sacrificados, esto consistió en cortar el cuello, para separar la cabeza del resto del cuerpo, quitar la - piel de la misma para abrir a partir del agujero magno y extraer el encéfalo. Posteriormente los órganos fueron procesados en el laboratorio .

Por lo que se refiere a medir los niveles de enzima colinesterasa, éstos fueron determinados utilizando el método de Michel. (10)

Continuando con el trabajo y a fin de realizar la comparación del insecticida Glutox (clorofenvinfos-diclorovos), que contiene sustancias organofosforadas, organocloro - das y vinilo, se utilizó un insecticida organofosforado -

puro, el Malation, para la aplicación práctica de este plaguicida en animales vivos, se emplearon 10 ratas (5 machos y 5 hembras), confinándolas en jaulas de acrílico por separado y se aplicó el pesticida por aspersión, este GRUPO - fué identificado con el No. VIII.

El tipo de alimento y suministro del agua de bebida fué - administrado en igual forma que en los casos ya referidos.

A estos 10 animales se les aplicó 7ml./m^3 del insecticida dejándolos dentro del área asperjada 10 horas continuas.

Estas ratas se sacrificaron al concluir la exposición, con el fin de medir en las muestras de encéfalo, los niveles - de colinesterasa.

R E S U L T A D O S

Durante los 30 días de exposición al compuesto Glutox, las ratas de los GRUPOS I, II y III, observaron los cambios de conducta siguiente:

Al transcurrir los primeros días de exposición, las ratas hembras exhibieron mayor actividad en comparación con los machos, éstos se mostraron aglomerados, inactivos y con el pelo erizado.

Posteriormente los animales se observaron activos en general (machos y hembras), haciéndose notorio en este lapso el pelo erizado en los machos, no ocurriendo así en las hembras.

Durante los últimos días el cambio de conducta se manifestó en forma de agresión en todos los animales, machos y hembras, es decir, que con frecuencia ocurrían peleas entre ellos mismos.

En lo que se refiere a las cantidades de alimento y agua consumidos en estos 30 días, podemos citar que no hubo grandes cambios en las cantidades ingeridas, sólo un pequeño aumento en el gasto de agua de bebida en los últimos días.

Los hallazgos de la medición de la actividad colinesterásica, obtenidos de los encéfalos de rata expuestos al insecticida, se expresan en unidad Δ pH/hr. y se reportan en la siguiente forma;

GRUPO No. I	Unidades Δ pH/hr.	Promedio por sexo en unidades Δ pH/hr.	Promedio por grupo.
No. 1 rata macho	0.23	0.28	0.25
No. 2 rata macho	0.37		
No. 3 rata macho	0.25		
No. 4 rata hembra	0.50		
No. 5 rata hembra	0.04		
No. 6 rata hembra	0.12		

GRUPO No. II

No. 7 rata macho	0.24	0.26	0.26
No. 8 rata macho	0.30		
No. 9 rata macho	0.24		
No. 10 rata hembra	0.43		
No. 11 rata hembra	0.14		
No. 12 rata hembra	0.25		

GRUPO No. III

No. 13 rata macho	0.12
No. 14 rata macho	0.21
No. 15 rata macho	0.35
No. 16 rata macho	0.20

	Unidades Δ pH/hr.	Promedio por sexo en uni- dades Δ pH/ hr.	Promedio por gru- po.
No. 17 rata macho	0.17	0.20	0.18
No. 18 rata macho	0.15		
No. 19 rata hembra	0.29		
No. 20 rata hembra	0.29		
No. 21 rata hembra	0.13		
No. 22 rata hembra	0.03		
No. 23 rata hembra	0.22		
No. 24 rata hembra	0.11	0.17	

GRUPO No. IV (GRUPO TESTIGO)

No. 25 rata macho	0.14	0.21	0.20
No. 26 rata macho	0.36		
No. 27 rata macho	0.16		
No. 28 rata macho	0.18		
No. 29 rata hembra	0.07		
No. 30 rata hembra	0.24		
No. 31 rata hembra	0.18	0.20	
No. 32 rata hembra	0.32		

En los grupos V, VI y VII, las alteraciones en la conducta se presentaron de la forma siguiente: convulsiones a espacios irregulares, posición de "descanso" sumamente rígida, ojos saltones con exceso de brillo, mirando fijamente y sin parpadeo. Al tratar de distraer a estos

animales de su estado de letargo, asediandolos con un objeto largo de madera; observamos que su actitud aún con reflejos lentos fué agresiva, pero no dirigida hacia el objeto sino en cualquiera dirección, inclusive contra las jaulas, posterior a este manejo, una tetania muscular (lomo arqueado y rígido) se hizo manifiesta, así como ataxia y parálisis en los animales del grupo VI y VII. Del grupo No. VII y muy probablemente a consecuencia de la elevación de las dosis, murieron 2 ratas machos.

Al término de esta exposición los animales fueron sacrificados en la forma antes descrita y las muestras de los cortes de encéfalo se trabajaron en el laboratorio.

Los valores de los niveles de colinesterasa de las ratas de los grupos V, VI y VII, expuestos a la concentración de 7 ml./m³ del insecticida Glutox se vierten a continuación:

GRUPO No.	Unidades Δ pH/hr.	Promedio por sexo en unidades Δ pH/hr.	Promedio por grupo.
No. 33 rata macho	0.10	----- 0.09 ----- 0.07	----- 0.08
No. 34 rata macho	0.08		
No. 35 rata hembra	0.06		
No. 36 rata hembra	0.09		

	Unidades Δ pH/hr.		Promedio por sexo en uni- dades Δ pH/ hr.	Promedio por gru- po.
GRUPO No. <u>VI</u>				
No. 37 rata macho	0.07	 — — 	0.08	 — —
No. 38 rata macho	0.10			
No. 39 rata hembra	0.06			
No. 40 rata hembra	0.09			
			0.07	
GRUPO No. <u>VII</u>				
No. 41 rata macho	0.12	 — — — — 	0.10	 — —
No. 42 rata macho	0.09			
No. 43 rata macho	0.08			
No. 44 rata hembra	0.11			
No. 45 rata hembra	0.00			
No. 46 rata hembra	0.08			
No. 47 rata hembra	0.09			
No. 48 rata hembra	0.16			
			0.09	
			0.08	

En el GRUPO No. VIII, se observó en el transcurso de las primeras horas de exposición: nerviosismo ascendente, posteriormente fueron detectados signos tales como: Miosis, lagrimeo y salivación profusa, malformación de las heces fecales, incontinencia urinaria, tetania muscular y finalmente convulsiones intermitentes.

A estos animales también se les sometió a una agresión con un objeto largo de madera, pero en este caso y en general

se les observó temerosos y en franca renuncia al asedio. A continuación se enlistan los resultados de las ratas expuestas al insecticida Malation.

GRUPO No.		Unidades Δ pH/hr.	Promedio por sexo en uni- dades Δ pH/ hr.	Promedio por gru- po
GRUPO No. VIII				
No. 49	rata macho	0.01	0.04	0.04
No. 50	rata macho	0.04		
No. 51	rata macho	0.11		
No. 52	rata macho	0.01		
No. 53	rata macho	0.07		
No. 54	rata hembra	0.02		
No. 55	rata hembra	0.05		
No. 56	rata hembra	0.03		
No. 57	rata hembra	0.03		
No. 58	rata hembra	0.10		

GRUPO No. IX (GRUPO TESTIGO)

No. 59	rata macho	0.23	0.31	0.27
No. 60	rata macho	0.49		
No. 61	rata macho	0.22		
No. 62	rata hembra	0.19		
No. 63	rata hembra	0.15		
No. 64	rata hembra	0.36		

Los niveles de colinesterasa del hígado no fueron lo suficientemente altos para dar una respuesta positiva en la técnica utilizada.

D I S C U S I O N

En el presente estudio, los niveles de actividad de la colinesterasa fueron determinados en el núcleo caudado del encéfalo de ratas de laboratorio expuestas a diferentes concentraciones de los insecticidas GLUTOX y MALATION, observándose mediante el método de Michel, la inhibición de la enzima colinesterasa en una relación directa al grado de exposición y al tipo de pesticida. En estudios previos Peter E. Berteau y Wallace A. Deen (1978) reportaron actividades colinesterásicas similares a las presentadas en este experimento, con la utilización de los insecticidas, Cloropyrifos, Malation, Naled y Resmethrin, aplicados en aspersión a ratas de laboratorio. (2)

En nuestra exposición las ratas asperjadas con el plaguicida Malation, presentaron una reducción muy marcada en la actividad colinesterásica, debiéndose esta baja fundamentalmente a que el producto mencionado es un pesticida organofosforado puro, es decir no se encuentra mezclado con alguna otra sustancia que pudiera ha-

cer variar los índices de la enzima en cuestión. En anteriores observaciones (Hassan, A.D., Abdel H.F., and Afifi L. M. 1977), se encontró que ratones alimentados con insecticida Leptophos, a la concentración de 10-30 y 90 ppm, en un período de 10 semanas observaron cambios en los niveles de colinesterasa del núcleo caudado. Estos niveles fueron de 0.24 hasta 0.17. (8)

Cabe aclarar que dicho insecticida Leptophos es una mezcla de sustancias en las que intervienen organofosforados, organoclorados y un agregado final de bromo, de tal forma la alteración de la enzima citada no es tan marcada como en el caso de la utilización de los compuestos organofosforados.

En el estudio presente en la utilización del plaguicida GLUTOX, los síntomas mostrados durante la exposición fueron una mezcla de signos de intoxicación por organofosforados y organoclorados; sialorrea, miosis, ataxia parálisis, convulsiones, etc., y los resultados de la medición de acetilcolinesterasa, fueron de 0.26 a 0.07.

Estudios anteriores de Nobuhiro Konno e Hideo Kinebuchi (1977) refieren en sus experiencias con el insecticida Leptophos problemas de ataxia y parálisis en gallinas

adultas, presentándose en éstas, los signos citados a los 15 días el primero y al 18 y 19 día el segundo, así como pérdida de peso del 14vo. día en adelante. En aves jóvenes no ocurrieron síntomas durante los 28 días de exposición. (10)

Jorge Brandao Linhares y Rosalino Gonçalves Neves (1979) en su experiencia con Paration Metílico, intoxican experimentalmente bovinos a los que administraron entre 50 y 150 mg/Kg. de peso vivo, observando signos de envenamiento tales como: disnea y rigidez muscular en algunos de los animales, en otros de ellos se presenta aumento en la motilidad intestinal con contracción involuntaria de los músculos esqueléticos e incapacidad para permanecer erguidos. Al examen de sangre en el laboratorio, la enzima colinesterasa se vió inhibida entre el 13 y el 35 % . (1)

Por otra parte las alteraciones que acarrea el uso de insecticidas organofosforados son presentados por David Moscioni A., Judith Engel L. y John Casida E. (1979)

En sus trabajos con embriones de pollo tratados con Diazinon, éstos presentan 3 tipos distintos de Teratogénesis en el desarrollo del embrión: cuello torcido, emplume anormal y artrogriposis. (11)

C O N C L U S I O N E S

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que la utilización del insecticida MALATION, aplicado por aspersión a ratas de laboratorio inhibe la acetilcolinesterasa cerebral en forma definitiva.

Por otra parte la exposición de organismos vivos al pesticida GLUTOX, compuesto que alberga en su integración moléculas de cloro, fosforo y vinil, nos arroja niveles de acetilcolinesterasa variables, en relación directa al tiempo de exposición y dosis recibida, (0.08 Δ pH/hr.), observándose que la inhibición de la enzima, no es tan marcada como en el caso del MALATION (0.04 Δ pH/hr.) - insecticida organofosforado puro .

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Brandao L.J., Gonclaves N.R. y Soares L.L. Snais Clinicos, Niveis de Acetilcolinesterase e Transaminases na Intoxicacao Experimental de Bovinos - com Paration Metilico. Arquivos de Neuro Psiquiatria. 37: 52-58 (1979).
- 2.- Berteau E.P. and Wallace A.D.: A comparasion of oral and Inhalation Toxicities of four insecticides to mice and rats. Bull. Environ. Contam. - and Toxicol. 19: 113-120 (1978).
- 3.- Disney R.W.: Radiometric Detection of Exposure - to insecticides. Biochem. Pharmacol. 15: 361-366. (1966)
- 4.- L.G., Courtney K.D. and Featherstone R.M.: A - new and rapid colormetric, Determination of Acetylcholinesterase, Activity. Biochem. Pharmacol 7: 88-95 (1961).
- 5.- Elliot M. and James N.F.: Insecticides Pesticides Toxicology. Chem. Soc. Rev. 7: 473-486. (1975).
- 6.- Frear D.E.H.: Chemistry of Insecticides and Fungicides. Biochim. Biophys. 225: 468-482 (1978)

- 7.- Goodman L.S. y Gilman A.: Bases Terapéuticas y Farmacológicas de la Medicina, 5ta. Ed. nueva Editorial Interamericana. Mexico, D.F. (1978).
- 8.- Hassan A.D., Abdel .F., and Afifi L.M.: Chemistry and Toxicology of Pesticide Chemicals. V. Some pharmacological aspects of Leptophos exposure in the rat. Bull. Environ. Contam. and Toxicol. 18: 640-647 (1977).
- 9.- Konno N. and Kinebuchi H.: Residues of Phosvel in Plasma, and in adipose tissue of hens, after single oral administration. Toxicol. Appl. Pharmacol. 45: 541-547 (1978).
- 10.- Michel H.O.: Determination of Acetilcolinesterase. J. Lab. Clin. Med. 34: 1564-1568 (1949)
- 11.- Moscioni A.D., Engel L.J. and Casida E.J. - - Kynurenine Formamidase inhibitions as a possible mechanism for certain teratogenic Effects of organophosphorus and Methilcarbamate insecticides in chicken embryos. Biochem. Pharmacol. 26: 2251-2258 (1977).
- 12.- Organización mundial de la Salud: Ecología de los vectores y lucha antivectorial, informe de la Oms. Serie de Información Técnica No. 501 (1972).

- 13.- Radeleff R.D.: Veterinary Toxicology. Lea Febiger Philadelphia. (1964).
- 14.- Shepard H.H.: The Chemistry and Toxicology of - Insecticides. Burgess Publishing Co. Mineapolis (1977).
- 15.- Vázquez Y.C.: La Biosfera, las plagas de insectos. Naturaleza 10: (2) 86-97 (1979).