

49
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MODIFICACION DE LA FUNCION RESPIRATORIA
INDUCIDA POR PARATION Y SU RELACION CON
LA PERMEABILIDAD VASCULAR PULMONAR
EN COBAYOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :

JAIME CHAVEZ ALDERETE



DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARIO HUMBERTO VARGAS BECERRA

FACULTAD DE CIENCIAS
SECRETARIA ESCOLAR

OCTUBRE DE 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

MODIFICACION DE LA FUNCION RESPIRATORIA INDUCIDA POR PARATION Y SU RELACION
CON LA PERMEABILIDAD VASCULAR PULMONAR EN COBAYOS.

realizado por JAIME CHAVEZ ALDERETE.

con número de cuenta 8724073-5 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Mario Humberto Vargas Becerra.

Vargas Becerra

Propietario Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez.

Montaña Ramírez

Propietario Dra. María Luisa Fanjúl Moles.

Fanjúl Moles

Suplente Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte.

Gonsebatt Bonaparte

Suplente Biol. Armando Muñoz Gononfont

Muñoz Gononfont

FACULTAD DE CIENCIAS
COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

Agradecimientos

A MIS ASESORES:

Dr. Mario Humberto Vargas B.

Dr. Luis Manuel Montaña R.

**Por orientarme y haberme dado la oportunidad de pertenecer al grupo de
trabajo del laboratorio de investigación en asma.**

A:

La Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.

El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Por brindarme y facilitarme sus instalaciones.

A mi Padre y a mi Madre por el apoyo incondicional que tuve durante todos
mis estudios, mejor herencia no me pueden dejar.

A todos los miembros de la Familia Chávez Alderete

A mis amigas y colegas del laboratorio de investigación en asma.

(María, Paty, Blanca, Pittis, Lala, Vero)

Gracias por aguantarme.

A la vida tomada de los cobayos.

A mis inseparables amigos del alma

(Pancho, Juancho y Lalo).

Gracias a cada personas que me han brindado
su amistad en cada momento

así como también a

ABREVIATURAS

Pt	Paratión
Pox	Paraoxón
Ach	Acetilcolina
Achasa	Acetilcolinesterasa
AE	Azul de Evans
i.p	Vía intraperitoneal
SSF	Solución salina fisiológica
DL ₅₀	Dosis letal 50%
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
NO	Óxido nítrico
SP	Sustancia P
NKA	Neurocinina A
NANC	Sistema de relajación no adrenérgico no colinérgico
Te	Tiempo espiratorio
Rt	Tiempo de relajación
PFI	Pico del flujo inspiratorio
PFE	Pico del flujo espiratorio
r=	Coefficiente de correlación

INDICE

	Pág.
Resumen	1
Introducción	2
• Generalidades de los organofosforados	2
• Metabolismo de los organofosforados y su relación con el citocromo P450	7
• Generación de edema inducido por paratión	14
Planteamiento del problema	16
Hipótesis	17
Objetivos	17
Material y métodos	18
• Animales	18
• Diseño experimental	18
• Administración de paratión	19
• Análisis de la función respiratoria	19
• Técnica de azul de Evans	23
• Relación peso seco/ peso húmedo	25
• Fármacos	25
• Análisis de los datos	26
Resultados	26
• Análisis de la broncoconstricción	27
• Evaluación del edema	30
• Análisis de la frecuencia respiratoria y su relación con la broncoconstricción	33
Discusión	41
Conclusión	47
Referencias	48

1

"Modificación de la función respiratoria inducida por paratión y su relación con la permeabilidad vascular pulmonar en cobayos."

RESUMEN

Los insecticidas organofosforados como el paratión, son un grupo de compuestos cuyo principal efecto es la inhibición irreversible de la acetilcolinesterasa. El paratión tiene gran toxicidad cuando se transforma en su metabolito activo paraoxón, conversión que se lleva a cabo principalmente en el hígado y en menor proporción en el pulmón. Una intoxicación con paratión provoca broncoconstricción y edema del parénquima pulmonar. El objetivo principal de este trabajo fue determinar la toxicidad aguda del paratión sobre las vías aéreas y evaluar la participación de edema como mecanismo de esta toxicidad. Se utilizaron cobayos de cualquier sexo. Se colocó a cada uno de los animales en un pletismógrafo corporal de libre movimiento durante dos horas, con el cual se analizó la función respiratoria registrando la frecuencia respiratoria y el índice de broncoconstricción. Después de tomar un registro basal, se les inyectó en dosis única el paratión (3.2, 10 ó 17 mg/Kg intrapentoneal). A los grupos control se les inyectó el solvente del paratión (propilenglicol y etanol 15:1 v.v. intrapentoneal). Para la evaluación del edema se anestesiaron los animales con ketamina y diazepam intrapentonealmente. Se diseccionó y canuló la vana yugular para administrar 30 mg/Kg de azul de Evans (AE). Pasados 5 minutos se sacrificó al cobayo con una sobredosis única de pentobarbital, y se expuso el bloque cardiopulmonar. Para remover el exceso de AE se perfundió con 100 ml de solución salina fisiológica al 0.9% (SSF) por ventrículo izquierdo a una presión de 100 mmHg y 50 ml de SSF a una presión de 40 mmHg por ventrículo derecho. Se tomaron fragmentos de tejido del lóbulo diafragmático derecho e izquierdo, bronquio principal derecho e izquierdo y del tercio medio de la tráquea. Estos tejidos se pesaron en una balanza analítica electrónica y se incubaron en 2 ml de formamida al 100% por 24 horas a 60°C para extraer el AE de los tejidos. Mediante espectrofotometría a una longitud de onda a 620 nm se determinó la concentración de AE que había en cada ml de sobrenadante. Los tejidos se colocaron en una estufa a 70°C durante 5 días para deshidratarlos. Luego se pesaron nuevamente y se calculó la relación peso seco/peso húmedo expresada como el porcentaje de agua contenida en los tejidos. Nuestros resultados muestran que en las hembras se observó la generación de broncoconstricción, evaluado por el índice de broncoconstricción. A la dosis de 10 mg/Kg de paratión el índice de broncoconstricción se incrementó significativamente ($p < 0.05$) desde los 20 minutos posteriores a la administración del paratión, prolongándose esta diferencia por un lapso de 2 horas, volviéndose altamente significativa ($p < 0.01$) a los 60 minutos la cual se mantuvo hasta que terminó el registro. En los machos hubo un incremento significativo a la concentración de 17 mg/Kg de paratión ($p < 0.05$) desde los 40 minutos posteriores a la administración del paratión, prolongándose esta diferencia hasta el final del registro. Al evaluar la generación de edema solo se observó en las muestras de parénquimas pulmonares mas no en vías aéreas centrales. Al analizar los datos obtenidos de los grupos experimentales 3.2, 10 ó 17 mg/Kg, se encontró que el paratión aparte de generar broncoconstricción, tiene efecto sobre la frecuencia respiratoria, causando una disminución de la misma. Podemos concluir que las hembras son más susceptibles a los efectos broncoconstrictores del paratión que los machos. No se observa la generación de edema de las vías aéreas centrales, pero sí en las muestras de parénquima pulmonar y que el decremento en la frecuencia respiratoria pueda ser un efecto secundario del paratión sobre la frecuencia respiratoria o bien, un efecto indirecto debido a la broncoconstricción.

INTRODUCCIÓN

Generalidades de los organofosforados

Los insecticidas que pertenecen al grupo de compuestos organofosforados, como el paratión, fueron sintetizados en los años cuarentas e introducidos en principio como plaguicidas de alta eficacia (1). Dichos compuestos se siguen empleando en la agricultura y en la medicina veterinaria, aunque se conozca que son de alto riesgo para la salud. Su uso constante ha provocado envenenamientos accidentales y voluntarios, tanto en humanos como en animales, por lo que representan un grave problema de salud pública, tanto por su elevada incidencia como por la severidad de los síntomas (2,3,4,5).

Los organofosforados como el paratión son sustancias de naturaleza lipídica, lo que los hace fácilmente absorbidos por cualquier vía de entrada al organismo, como la cutánea, digestiva o inhalatoria. Además son moléculas de difícil degradación orgánica, por lo que puede ocurrir una intoxicación por acumulación de este compuesto en el organismo (6), que si bien no es tan severa como con compuestos organoclorados, puede producir la muerte del sujeto debido a los desórdenes respiratorios, o bien a síntomas nerviosos que algunas veces son irreversibles (7). En estudios toxicológicos basados en compuestos organofosforados, se ha demostrado que las hembras son significativamente más susceptibles a los efectos tóxicos que los machos, y que también la especie determina diferencias (8,9,10). La molécula de paratión (diethyl p-nitrofenol fosforotioato) por sí misma tiene poca actividad biológica, afectando principalmente el sistema nervioso (Fig.1). Sin embargo, cuando esta

molécula es biotransformada y bioactivada en su metabolito activo paraoxón (dietil p-nitrofenol fosfato) por el sistema del citocromo P450, principalmente en la fracción microsomal hepática y pulmón, afecta irreversiblemente la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (4). La enzima acetilcolinesterasa es considerada generalmente como la molécula blanco de la toxicidad aguda de los organofosforados. La biotransformación y bioactivación del paratión a paraoxón induce un incremento en la permeabilidad vascular pulmonar responsable de edema pulmonar, el cual ha sido estudiado en pulmón aislado de conejo (4).

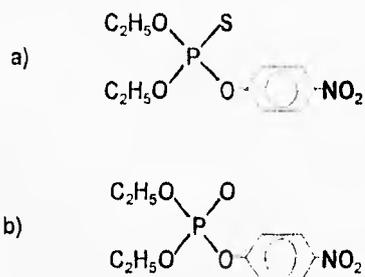


Fig. 1. a) Paratión: O,O-dietil-O-P-nitrofenol fosforotioato (11)
b) Paraoxón: dietil p-nitrofenol fosfato (11).

El paratión es altamente tóxico para los mamíferos. En ratas se ha encontrado que la DL_{50} oral es de 3.0 a 3.6 mg/Kg para hembras, y 13 mg/Kg para machos, en tanto que la DL_{50} cutánea para las hembras es de 6.8 mg/Kg y para machos de 21 mg/Kg (12,13). La vida media de los organofosforados en general así como de sus derivados es relativamente corta (semanas); sin embargo, independientemente de la gravedad de los efectos anticolinérgicos, transcurrido cierto tiempo (3-4 semanas)

pueden aparecer signos y síntomas de neurotoxicidad retardada, que se manifiesta por ligeras perturbaciones sensitivas, ataxia, y debilidad en general. En casos severos, la debilidad puede conducir a la parálisis total. Otras lesiones generadas por el paratión son las caracterizadas por una desmielinización y degeneración axonal; esto debido aparentemente a la inhibición de una enzima, tipo esterasa, denominada esterasa neurotóxica que estaría ligada a las lesiones (1).

Los compuestos organofosforados afectan al sistema nervioso autónomo y sistema nervioso motor somático. El sistema nervioso autónomo regula las actividades de estructuras que no están bajo control voluntario, como son la respiración, la circulación, el metabolismo, la temperatura corporal, la sudoración, las secreciones de algunas glándulas endocrinas, etc. El músculo liso de las vías aéreas del cobayo presenta diferencias regionales en su inervación. El sistema que regula al músculo liso traqueal, está regido por tres divisiones: la división simpática (noradrenalina como mediador químico), la división parasimpática (acetilcolina) y el sistema de relajación no adrenérgico no colinérgico (péptido intestinal vasoactivo, [VIP] y óxido nítrico, [NO]).

El músculo liso bronquial está inervado por el sistema nervioso parasimpático y el sistema de contracción no adrenérgico no colinérgico (sustancia P [SP], neurocinina A [NKA] y otros péptidos (15). El sistema nervioso parasimpático es uno de los mecanismos de control de la contracción de las vías aéreas en todos los animales, incluyendo el humano. Las fibras preganglionares de los nervios colinérgicos surgen del núcleo vagal del tallo cerebral, se prolongan por el nervio vago hasta hacer sinapsis con los ganglios de las paredes de las vías aéreas. De estos surgen las fibras

posganglionares pequeñas en comparación con los nervios preganglionares, las cuales se dirigen a las células blanco como músculo liso y glándulas. La densidad de la inervación colinérgica se ve decrementada en los bronquiolos y desaparece en los alveolos. La estimulación de esta inervación causa la liberación de acetilcolina de las vesículas agranulares en las terminaciones nerviosas colinérgicas y, a su vez, este neurotransmisor se difunde rápidamente por el espacio sináptico hasta los receptores colinérgicos de las células blanco generando contracción. La acetilcolina es hidrolizada por la acetilcolinesterasa que se localiza en ese mismo espacio.

El paratión es un excelente bloqueador de esta esterasa lo que causa broncoconstricción (15), como se ha descrito en casos de envenenamiento agudo en humanos y animales (2,3,4), sugiriendo que la acetilcolina mantiene el tono basal de las vías aéreas sanas. Una intoxicación con paratión también genera una secreción excesiva de glándulas traqueobronquiales, en donde se ha demostrado que hay también receptores muscarínicos en glándulas submucosas en el epitelio de las vías aéreas.

El sistema nervioso simpático se localiza en el segmento cervical y lumbar de la médula espinal. Las fibras preganglionares tienen su origen en los nervios raquídeos y hacen sinapsis en los ganglios cercanos a la columna vertebral. Las fibras posganglionares van desde estos ganglios hasta desembocar en el pulmón, donde se mezclan con las fibras colinérgicas para formar densos plexos alrededor de las vías aéreas. Las fibras nerviosas simpáticas inervan glándulas submucosas, arterias bronquiales y en menor proporción a la tráquea y bronquios.

Un tercer componente en el sistema nervioso autónomo es el sistema no adrenérgico no colinérgico (NANC), estudiado ampliamente en el tracto gastrointestinal, tracto urogenital, ojo, sistema cardiovascular y pulmón, donde se ha demostrado que tiene una porción excitatoria y una porción inhibitoria. Los mecanismos NANC en el sistema respiratorio producen broncoconstricción y broncodilatación, vasoconstricción y vasodilatación y la secreción de moco, indicando que la naturaleza de los neurotransmisores es diferente para cada uno. La porción inhibitoria (i-NANC), relaja al músculo liso de las vías aéreas y datos actuales sugieren que en la mayoría de las especies el neurotransmisor del sistema i-NANC es (VIP) descubierto inicialmente en el duodeno de porcinos. Las propiedades del VIP son similares a la de los agonistas β -adrenérgicos, los cuales son potentes relajantes del músculo liso. Además, el VIP coexiste con la acetilcolina en algunos nervios colinérgicos y tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación de este neurotransmisor. Se cree que el NO es otro mediador del i-NANC. Algunas de las actividades biológicas que se le atribuyen al NO son la relajación del músculo liso de los vasos sanguíneos y de las vías aéreas. Se desconoce si el NO es liberado como neurotransmisor o es un mediador controlado por un neurotransmisor clásico. Si el NO es secretado como neurotransmisor, aún no se conocen los nervios que lo liberan (14).

La porción excitatoria (e-NANC) produce broncoconstricción. La SP, neuroquinina A y otros péptidos, sustancias a las que en conjunto se les conoce como taquicinas, son considerados como los neurotransmisores del sistema e-NANC. Estos compuestos son liberados en forma antidrómica por una población de nervios

sensoriales o aferentes llamados fibras-C (16) . Estas fibras se encuentran rodeando los vasos sanguíneos, glándulas exocrinas y músculo liso; por lo que al ser estimuladas generan broncoconstricción y un aumento en secreciones traqueobronquiales.

Metabolismo de los organofosforados y su relación con el citocromo P450

Los humanos y animales, principalmente domésticos, están constantemente expuestos a contaminantes ambientales que pueden ser de origen natural o de fabricación humana. A estos compuestos "extraños" para el organismo se les ha llamado compuestos xenobióticos. Una vez dentro del organismo, son transformados en compuestos diferentes a los primarios. En general los compuestos más lipofílicos son rápidamente absorbidos por el organismo, a través de la piel, tracto gastrointestinal o vía respiratoria, y acumulables fácilmente en el organismo. Una vez que son transformados pueden ser eliminados por diferentes vías sin haber cambios en su composición química. Las vías o rutas utilizadas son la vía urinaria, bilis, materia fecal y el aire espirado. Los organismos animales han desarrollado innumerables procesos bioquímicos para transformar los componentes xenobióticos. Estos procesos bioquímicos son llamados de biotransformación y son usualmente de naturaleza enzimática.

Entre las enzimas involucradas destacan las oxidasas, las monooxigenasas o también llamadas hidroxilasas y las oxidasas de función mixta (7, 17,18). El proceso final de las reacciones de la biotransformación puede resultar, por una parte, en

generar metabolitos químicamente distintos a la forma original del compuesto, por ejemplo un metabolito más hidrofílico, lo cual lo hace menos peligroso para el organismo. Por otro lado, esta biotransformación puede bioactivar compuestos inocuos o poco peligrosos a compuestos altamente tóxicos, como es el caso de la bioactivación del paraoxón. La biotransformación y bioactivación de paratión, así como la gran mayoría de compuestos organofosforados, se lleva a cabo principalmente en la fracción microsomal hepática y en menor proporción en algunos otros órganos como el pulmón, que son los órganos encargados en depurar cualquier compuesto absorbido por el organismo, antes de ser distribuidos a cualquier otro tejido u órgano.

Con base a diferentes estudios toxicológicos, se han encontrado otros órganos con diferentes capacidades para biotransformar compuestos xenobióticos, como se puede ver en el cuadro 1. En las reacciones de biotransformación y bioactivación del paratión está involucrado un sistema de monooxigenasas, denominado citocromo P450. El sistema del citocromo P450 es hasta donde se conoce, un acoplamiento de sistemas enzimáticos compuesto de dos enzimas: la NADPH-citocromo P450 reductasa, y otra enzima que contiene un grupo hemo o hemoproteína (19). Estas enzimas se localizan embebidas en la matriz fosfolipídica del retículo endoplásmico. Tales fosfolípidos juegan un papel muy importante en las reacciones del citocromo P450, pues facilitan la interacción entre estas dos enzimas. Acompañando este complejo, hay otro citocromo llamado citocromo b_5 y su asociada reductasa. La función del citocromo b_5 y citocromo b_5 reductasa en las reacciones mediadas por el citocromo P450 no se ha establecido con claridad.

El NADPH-citocromo P450 reductasa tiene preferencia por el NADPH que es su cofactor. Esta es una flavoproteína capaz de transferir uno de los dos electrones al citocromo P450. El citocromo P450 tiene propiedades redox únicas y espectrales, gracias a que cuando se reduce el citocromo P450 (Fe^{2+}) forma una ligadura con monóxido de carbono y la máxima absorbancia de luz ocurre a los 450 nm. Esta propiedad espectral es presente solo cuando el citocromo está intacto y catalíticamente funcional. Cuando se desnaturaliza, pierde su único pico espectral de 450 nm y produce su absorbancia máxima a los 420 nm, similar a otras hemoproteínas.

Hasta la fecha se han identificado más de 70 subfamilias y alrededor de 400 formas diferentes de citocromo P450, tanto en procariontes como eucariontes (20). En animales, la expresión de estas enzimas puede variar tanto dentro de una misma especie, así como por el órgano, edad, sexo, estrés, nutrición, entre otros factores además de la exposición química que se emplee.

Cuadro 1. Capacidad de los órganos involucrados en la biotransformación

CAPACIDAD	ÓRGANO
Alta	Hígado
Media	Pulmón, riñón, intestino
Baja	Piel, testículos, placenta

La biotransformación y bioactivación del paratión se efectúa mediante la reacción de desulfuración oxidativa, la cual es mediada, como ya se mencionó, por la monooxigenasa en unión con el sistema del citocromo P450, que cataliza reacciones

en las que solo uno de los dos átomos de O_2 de la cadena del transporte de electrones se incorpora al sustrato orgánico, siendo el otro reducido a una molécula de H_2O (19).

En las reacciones catalizadas por el citocromo P450 (Fig.2), el sustrato (RH) se combina con la forma oxidada del citocromo P450 (Fe^{3+}) y forman el complejo sustrato-citocromo P450. Este complejo acepta un electrón del NADPH (vía NADPH-citocromo P450 reductasa), que reduce al hierro en el citocromo P450 (Fe^{2+}). El complejo sustrato citocromo P450 reducido (Fe^{2+}) se combina con oxígeno molecular que acepta otro electrón del NADPH. En algunos instantes, el segundo electrón es donado por NADH vía citocromo b_5 . En una serie de pasos que todavía no está completamente entendido, ambos electrones son transferidos al oxígeno molecular. Resultando una especie de oxígeno altamente reactivo e inestable. Un átomo de este oxígeno es introducido al sustrato, mientras que el otro es reducido en agua. El sustrato oxigenado se disocia, dando por una parte el sustrato con un grupo hidroxilo y por otro, la regeneración de la forma oxidada del citocromo P450 (19).

Los niveles de citocromo P450 que se encuentran en algunos animales como las ratas en edad adulta, tienen su origen en etapas tempranas de su desarrollo ontogénico, y en edad adulta, estos niveles únicamente son moduladas por factores hormonales; las cuales solo pueden inducir la sobreexpresión de los niveles existentes, mas no la expresión genética de los mismos (21). En los humanos, puede existir la sobreexpresión de los niveles de citocromo P450 así como también existe expresión genética espontánea de la misma.

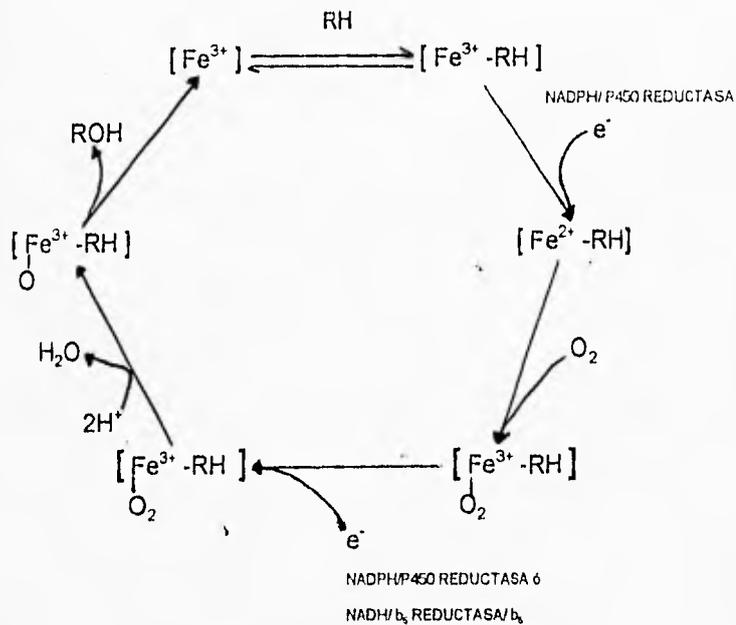


Fig.2. El ciclo de reacción del citocromo P450. Ferrocitocromo P450 es representado por Fe^{3+} ; RH, es el sustrato del P450 y ROH es el producto de la oxidación.

Numerosos estudios han demostrado que la transferencia del átomo de azufre de la molécula de paratión al citocromos P450 que ocurre durante la bioactivación oxidativa del paratión a paraoxón, así como de otros xenobióticos, dando como resultado la inactivación irreversible de la enzima P450 (22). Una vez bioactivado el paratión a paraoxón debe ser hidrolizado mediante diferentes hidrolasas como son: las paraoxonasas, esterasas, carboxilesterasas, amidasas, etc., que dan como resultado,

por un lado, un grupo p-nitrofenol que es eliminado por el organismo, y por otro lado, un grupo dietil fosfato que se une con la acetilcolinesterasa activa, dando como resultado la inactivación de la misma (8,23). Los organofosforados han sido designados como inhibidores directos de la acetilcolinesterasa, la enzima que normalmente hidroliza la acetilcolina neurotransmitida, formando un complejo enzimático fosforilado que no se disocia. En presencia de un inhibidor de la acetilcolinesterasa, la concentración de acetilcolina liberada por el botón sináptico puede incrementarse a niveles anormales generando con ello una "crisis principalmente colinérgica" (24).

La inhibición de la unión de la acetilcolina con la acetilcolinesterasa, uniéndose el paratión a dicha molécula puede ser de dos tipos: de tipo irreversible, formando un complejo enzimático fosforilado que no se disocia, o bien, una inhibición reversible lenta (Fig.3). Las enzimas que hidrolizan al paratión, como las paraoxonasas, se han identificado en diferentes tejidos de varios animales y su amplia distribución existe en diferentes especies de animales. Las esterasa (tipo A y B) son otras enzimas que hidrolizan al paraoxón, en especial la tipo A. La esterasa tipo A ha sido definida como un grupo de enzimas capaces de hidrolizar al paraoxón, en contraste con la esterasa tipo B, la cual es inhibida cuando ocurre la hidrólisis del paraoxón (8). Los mamíferos tienden a exhibir alta actividad de la esterasa A en la sangre y en el hígado, y este es, aparentemente el factor importante en determinar el grado de susceptibilidad del organismo a la toxicidad de los organofosforados. Aunque se exhiben altas concentraciones de esterasa A, no ha sido fácil determinar cuál es sustrato

específico, ya que su estudio ha resultado complejo.

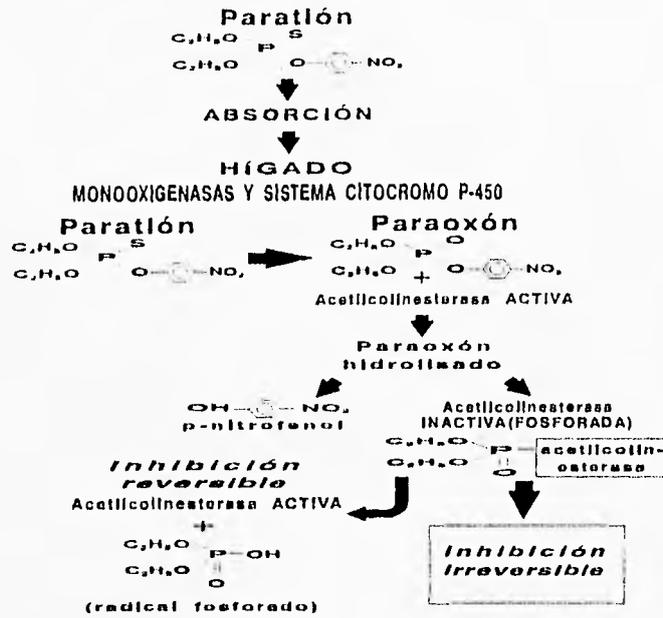


Fig.3. Biotransformación y bioactivación del paraoxón en el hígado.

Se sabe que la hidrólisis del paraoxón es dependiente del calcio contenido en los tejidos (8), sugiriendo que el calcio juega un papel muy importante en la hidrólisis del paraoxón por la esterasa A. Por un lado, porque el calcio es requerido en la reacción catalítica para mantener la conformación del sitio activo. Por el otro lado,

porque tres átomos de calcio facilitan la remoción del dietil fosfato de la esterasa A probablemente por la polarización del puente P=O de la dietil esterasa A-fosfatasa intermedia (23).

Generación de edema inducido por paratión

La pared de ciertos vasos (venas y capilares) de la microcirculación representa una barrera entre el tejido y la sangre. Esta barrera deja pasar libremente el agua, electrólitos y pequeñas moléculas proteínicas. El término incremento de la permeabilidad vascular se refiere a la alteración de esta barrera con la consecuente modificación de difusión o paso de proteínas plasmáticas dentro del tejido extravascular y la acumulación excesiva de líquido en los espacios tisulares, conocida como edema (25). Cabe señalar que el edema no puede descubrirse en los tejidos hasta que el volumen del líquido intersticial ha aumentado 30% por arriba de lo normal (28).

El edema pulmonar es una de las consecuencias en intoxicaciones agudas con compuestos como el paratión y se presenta cuando la permeabilidad de los capilares pulmonares aumenta, y su membrana se ha hecho tan permeable que pueden atravesarla incluso moléculas de proteína plasmática, que fácilmente pasan a los espacios intersticiales generando el incremento de líquido en los intersticios celulares. Algunos estudios concluyen que el edema pulmonar ocasionado por compuestos organofosforados, es el resultado de una hipoxia, falla cardíaca, efectos en el sistema nervioso central o directamente de la toxicidad en el pulmón (1,4,26).

En un estudio realizado recientemente (4), se muestra que el paratión induce directamente edema pulmonar debido a un incremento en la permeabilidad endotelial o vascular, antes que cualquier cambio en la presión capilar. El aumento en la permeabilidad vascular, con el consecuente edema, es una respuesta a una inflamación aguda, pero el mecanismo que los suscita y su desarrollo no están del todo caracterizados (27). En 1951 Starling (26,28), propuso que sobre los líquidos y los solutos de los capilares actuaban dos fuerzas; una de ellas es la presión hidrostática capilar, que tiende a mover el agua y los solutos fuera de los capilares. La otra es la presión coloidosmótica o también llamada oncótica, que se debe a la presencia de proteínas en el plasma sanguíneo. Esta presión tiende a atraer principalmente agua y con ella pequeñas moléculas hacia los capilares. El movimiento neto real de las sustancias depende en gran parte de las diferencias entre estas dos presiones. Se considera que la pared capilar es libremente permeable al agua y a todos los solutos, con excepción de macromoléculas de peso molecular mayor de 65000 Da.

La ecuación que explica este movimiento es: $Q=K (P_c-P_i) - \sigma (\pi_c-\pi_i)$; donde Q es el flujo neto de la salida, K es el coeficiente de filtración, P_c y P_i son las presiones hidrostáticas en el capilar y el espacio intersticial, respectivamente, y π_c e π_i son las presiones coloidosmóticas, y σ es el coeficiente de reflexión, el cual indica la efectividad de la membrana para impedir el paso de la proteína en comparación con el paso del agua a través del endotelio, y está reducida en enfermedades que causan lesión celular y aumentan la permeabilidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los organofosforados como el paratión representan un grupo de insecticidas altamente tóxicos, tanto para animales como humanos, y su uso indiscriminado sigue siendo causa de numerosos envenenamientos, con las consecuentes repercusiones socioeconómicas en los sectores público y privado. El presente trabajo se enfocará a caracterizar en un modelo *in vivo* el efecto del paratión como generador de broncoconstricción así como de edema pulmonar.

HIPÓTESIS

1. La administración aguda de paratión provoca broncoconstricción en cobayos.
2. En la broncoconstricción inducida por paratión participa el edema de las vías aéreas o del parénquima pulmonar.
3. Este fenómeno es modulado por el sexo del animal, con una mayor predisposición a la broncoconstricción en las hembras.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la administración aguda del paratión sobre el calibre de las vías aéreas así como la participación del edema en dicha respuesta.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar que la administración aguda de paratión a cobayos sanos produce broncoconstricción.
2. Determinar si en esta respuesta obstructiva hay la generación de edema en tráquea y bronquios.
 - 2a. Determinar la relación peso seco/peso húmedo en fragmentos de tráquea, bronquios y parénquima pulmonar.
 - 2b. Determinar la concentración de azul de Evans extravasado como un indicador de edema en fragmentos de tráquea, bronquios y parénquima pulmonar.
3. Demostrar que los cobayos presentan una susceptibilidad diferencial relacionada con el sexo, comparando las respuestas de las vías aéreas de ambos sexos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 46 cobayos de la raza Hartley de uno u otro sexo, con un peso corporal promedio entre 500 y 600 gramos. Los animales se mantuvieron en bioterio bajo condiciones estándar y con alimentación *ad libitum*.

Diseño experimental

Se emplearon 7 grupos de animales divididos de la siguiente manera: un grupo control y dos grupos experimentales con 3.2 y 10 mg/Kg de paratión en hembras, y un grupo control y tres grupos experimentales con 3.2, 10 y 17 mg/Kg en machos. Inicialmente se hizo un registro de diversas variables respiratorias en un pletismógrafo corporal de libre movimiento (ver adelante). Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con paratión o con su vehículo (propilenglicol y etanol) y reintroducidos inmediatamente después al pletismógrafo corporal de libre movimiento para el registro de variables respiratorias durante 2 horas.

Se emplearon otros dos grupos de cobayos hembras anestesiados (uno control y uno experimental con 10 mg/Kg de paratión) para la evaluación de edema en tráquea, bronquios y pulmón, mediante la técnica de azul de Evans y de peso seco/peso húmedo (ver adelante).

Administración de paratión

El paratión (3,2, 10 ó 17 mg/Kg) fue administrado por vía intraperitoneal en dosis única a cada animal de los grupos experimentales. El volumen total de la mezcla paratión-solvente inyectada a cada animal nunca fue mayor de 0.25 ml. A los animales de los grupos controles únicamente se les inyectó el solvente del paratión por vía intraperitoneal (propilenglicol y etanol).

Análisis de la función respiratoria

Se colocó a cada uno de los animales en un pletismógrafo de cámara única para animales en libre movimiento (Buxco Electronics Inc, Nueva York) en el cual el animal recibe un flujo continuo de aire, así como la opción de beber agua *ad libitum* (Fig. 4).

Este sistema de pletismografía está basado en la medición directa de las fluctuaciones de presión que se presentan dentro de la cámara. Dichas fluctuaciones fueron captadas por un sensor de presión diferencial (SenSym, mod SX05, U.S.A.), conectado a un preamplificador y, posteriormente, los resultados fueron almacenados en una computadora personal provista de un programa especial para el manejo automatizado de los datos evaluados en cada experimento (Buxco BioSystem XA, versión 0.9.3, Nueva York).

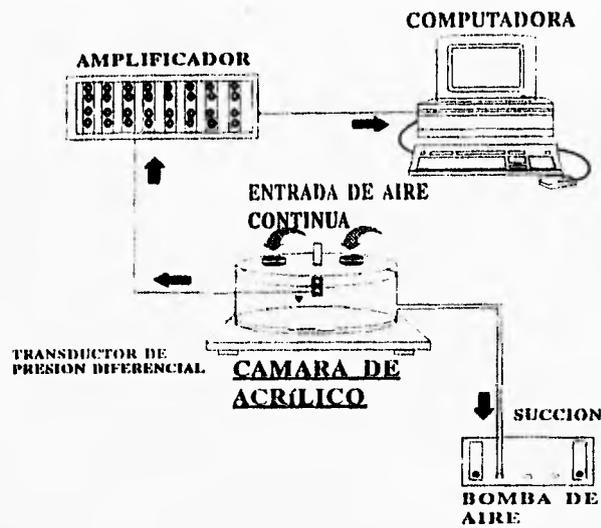


Fig.4. Modelo experimental de pletismografía

El pletismógrafo cuantifica, entre otras cosas, el índice de broncoconstricción, que refleja la obstrucción de las vías aéreas. La base teórica del índice de broncoconstricción es que en la fase inspiratoria el tórax del animal se expande, incrementándose la presión en la cámara. Sin embargo, el aire que entró al animal tiende a causar una disminución de presión dentro de la caja. En condiciones normales

existe un discreto desfaseamiento o retraso entre ambos eventos. Cuando existe obstrucción de las vías aéreas, este desfaseamiento entre la expansión del tórax y su compensación por el ingreso de aire al mismo es más prolongado.

Esta información es procesada por el programa computacional para dar el valor del índice de broncoconstricción, de acuerdo con la fórmula descrita en la Fig. 5.

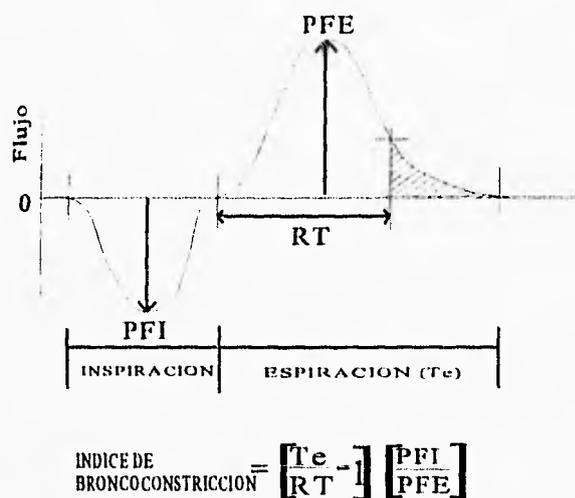


Fig.5. Parámetros relacionados en el índice de broncoconstricción.

donde :

Te = Tiempo espiratorio

RT = Tiempo de relajación

PFI = Pico del flujo inspiratorio

y PFE = Pico del flujo espiratorio

En estudios previos se ha encontrado que este índice de broncoconstricción puede ser empleado para caracterizar las respuestas obstructivas de las vías aéreas ante un estímulo antigénico en cobayos inmunizados (29). Por otra lado, en nuestro laboratorio se encontró que la nebulización a cobayos con dosis crecientes de agonistas que producen contracción del músculo liso de las vías aéreas, como histamina o acetilcolina, ocasiona un incremento de este índice de broncoconstricción en forma dependiente de la dosis y se correlaciona con las manifestaciones de dificultad respiratoria del animal.

Durante el experimento se registraron los siguientes parámetros: la frecuencia respiratoria, el volumen corriente, el tiempo inspiratorio, el tiempo espiratorio, entre otros. Sin embargo, para los fines del presente trabajo únicamente se evaluaron el índice de broncoconstricción y la frecuencia respiratoria. Antes de cada experimento cada animal se pesó y posteriormente se introdujo al pletismógrafo. Después de un período de habituación de 15 minutos, se tomó un registro basal del índice de broncoconstricción durante 5 minutos. Tanto en los grupos experimentales como en los grupos controles, se sacó al animal de la cámara después del registro basal y se inyectó con paratión o con su vehículo. A continuación, se volvió a colocar dentro del pletismógrafo y minutos después se reinició el registro de los parámetros respiratorios, en intervalos de 10 minutos durante 2 horas.

Debido a que el índice de broncoconstricción es calculado por el programa en cada una de las respiraciones, se decidió considerar el promedio de estos valores en los últimos 5 minutos de cada intervalo (10 minutos). Se incluyeron solamente las respiraciones con volumen corriente mínimo de 1 ml, tiempo mínimo inspiratorio de 0.15 seg, tiempo máximo inspiratorio de 3 seg y diferencia máxima entre volúmenes inspiratorio y espiratorio del 10%. Se rechazaron aproximadamente de 20 a 30% de las respiraciones por cada intervalo de tiempo los cuales ocurrieron en especial durante los movimientos voluntarios del animal.

Técnica de azul de Evans

En términos generales este procedimiento se apego a lo descrito en la literatura (25,27,30,31,32,33). Cobayos hembras se anestesiaron por vía intraperitoneal aplicando una dosis inicial de 100 mg/Kg de ketamina y 2.5 mg/Kg de diazepam, y 10 minutos después una segunda dosis de 50 mg/Kg de ketamina y 2.5 mg/Kg de diazepam. Una vez anestesiado el animal se disecó y canuló una vena yugular, por la cual se le administró 30 mg/Kg del colorante azul de Evans, diluido previamente en 1 ml de solución salina fisiológica (SSF). Cinco minutos después se le administraron 10 mg/Kg de paratión (grupo experimental) o el vehículo del paratión (grupo control). Noventa minutos después se sacrificó al animal, se cortó la aorta abdominal y posteriormente se abrió el tórax para exponer el bloque cardiopulmonar. Para eliminar el azul de Evans que pudiera permanecer en el lecho intravascular de los tejidos de interés, se perfundió con 100 ml de SSF por el ventrículo izquierdo a una presión de

100 mmHg; posteriormente se hizo una incisión en la aurícula izquierda, pinzando la vena cava inferior a nivel del diafragma y se perfundió con 50 ml de SSF por el ventrículo derecho, a una presión de 40 mmHg.

Posteriormente el tejido conjuntivo circundante de las vías aéreas se eliminó utilizando un microscopio estereoscópico, y se tomaron muestras de los dos bronquios principales (aproximadamente 0.5 cm de cada uno) y del tercio medio de la tráquea (aproximadamente 1 cm), así como de parénquima pulmonar (aproximadamente 1 cm³) de cada uno de los dos lóbulos caudales. El exceso de agua superficial de estos tejidos se eliminó mediante contacto suave con una gasa. El peso de cada tejido (peso húmedo) se cuantificó en una balanza analítica (Ohaus, modelo GA 200D, Alemania).

Cada tejido se colocó en tubos cerrados conteniendo 2 ml de formamida al 100%, y se incubaron a 60 °C por 24 horas para extraer el azul de Evans de los tejidos.

La cantidad total de azul de Evans en cada uno de los fragmentos de tejido se calculó mediante lectura espectrofotométrica del sobrenadante a 620 nm de longitud de onda. Finalmente, los tejidos se colocaron dentro de una estufa a 70°C durante 5 días, y una vez deshidratados se pesaron nuevamente (peso seco). La cantidad de azul de Evans en los tejidos se expresó como ng colorante/mg de tejido seco.

En el caso de los bronquios, los valores de las dos muestras obtenidas de cada animal se promediaron para considerar un valor único de este tejido, y el mismo procedimiento se aplicó para las muestras de parénquima pulmonar.

Relación peso seco/peso húmedo

Para obtener la relación entre el peso seco y el peso húmedo de tráquea, bronquios y parénquima, se utilizaron los mismos tejidos obtenidos para la técnica de azul de Evans (ver arriba). Para la evaluación de edema en los tejidos se calculó el contenido de agua con la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de agua} = 1 - (\text{Peso seco} / \text{Peso húmedo})$$

Se consideró que existía edema en los tejidos cuando el contenido de agua fue estadísticamente mayor que el obtenido en los grupos controles. Al igual que con la técnica de azul de Evans, en cada animal se consideraron en forma conjunta los pesos de ambos bronquios y, por otro lado, los pesos de ambos fragmentos de parénquima pulmonar.

Fármacos

El etilo de paratión (Pestanal®, Riedel deHaën, Alemania) se disolvió en una mezcla de propilenglicol (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) y alcohol etílico anhidro (Técnica Química, S.A. México) (10:1.5 v/v), para obtener una concentración final de paratión de 30 mg/ml. Se emplearon estos dos solvente porque se sabe que el paratión es poco hidrosoluble (6). La ketamina (Imalgen 1000®, Rhone Merieux de México), el diazepam (Valium 10®, Roche de México) y el pentobarbital sódico (Anestesal®, Smith Kline Norden de México) se utilizaron a la concentración comercial.

Análisis de datos

Las diferencias en el contenido de agua, así como en el índice de broncoconstricción de los diferentes grupos se evaluaron para cada intervalo de tiempo mediante análisis de varianza y prueba de Dunnett (34). Para buscar posibles asociaciones entre dos eventos se emplearon análisis de regresión de línea recta y análisis de correlación de Pearson. El nivel de significancia se fijó a valores de $p < 0.05$ a nivel bimarginal. Los resultados son expresados en el texto y en las gráficas como promedio \pm error estándar.

RESULTADOS

En los cobayos hembras la aplicación intraperitoneal de la dosis baja de paratión (3.2 mg/Kg) no causó ninguna alteración visible en su comportamiento durante el tiempo de estudio (2 horas), sin embargo, sí se modificó su función respiratoria. La aplicación de la dosis alta (10 mg/Kg) ocasionó que entre los 30 y 40 minutos después se advirtiera dificultad en los movimientos e incapacidad para sostenerse en sus extremidades posteriores, lo cual persistió con la misma intensidad hasta el final del estudio (2 horas), así como la modificación de su función respiratoria.

En los cobayos machos no se observaron efectos de dificultad para los movimientos a las dosis de 3.2 ó 10 mg/Kg, como tampoco variación en su función respiratoria. Sin embargo, a la dosis de 17 mg/Kg de paratión, se observó dificultad para los movimientos e incapacidad para sostenerse en sus extremidades posteriores, lo cual persistió, como en las hembras, con la misma intensidad hasta el final del estudio, así como también hubo variación de su función respiratoria.

Análisis de la broncoconstricción

En respuesta al paratión, la obstrucción de las vías aéreas, expresada como el índice de broncoconstricción aumentó en las hembras (Fig.6). Con la concentración de 3.2 mg/Kg de paratión este incremento en el índice de broncoconstricción fue moderado y no llegó a ser significativo en comparación con el grupo control. Con la concentración de 10 mg/Kg de paratión, el incremento fue mucho mayor, alcanzando significancia estadística ($p < 0.05$), a partir de los 20 minutos (0.5035 ± 0.0553), con respecto al grupo control (0.2861 ± 0.0339), y mas aún después de 60 minutos en adelante, (control 0.2719 ± 0.0370 vs grupo con 10 mg/Kg 0.5685 ± 0.0578 , $p < 0.01$). Los animales correspondientes a la concentración de 10 mg/Kg de paratión mostraron ligeramente dificultad respiratoria, en especial en el tiraje intercostal, aunque ninguno presentó cianosis.

En los machos (Fig.7) hubo un ligero incremento en el índice de broncoconstricción después de la aplicación de 3.2 y de 10 mg/Kg de paratión, pero las diferencias con el grupo control no llegaron a ser significativas. A la dosis de 17 mg/Kg de paratión hubo un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.01$), a los 40 (0.7436 ± 0.0243), 50 (0.7392 ± 0.0489) y 120 minutos (0.7188 ± 0.0816), con respecto a sus controles (0.3721 ± 0.0638 ; 0.3952 ± 0.0425 y 0.3540 ± 0.0247 respectivamente), aunque esta diferencia no fue constante, ya que a los 60 (0.6477 ± 0.0481) y 80 minutos (0.7041 ± 0.0775), las diferencias significativas son menores ($p < 0.05$), con respecto a sus grupos controles (0.3850 ± 0.0507 y 0.3820 ± 0.0379 respectivamente ($p < 0.01$)).

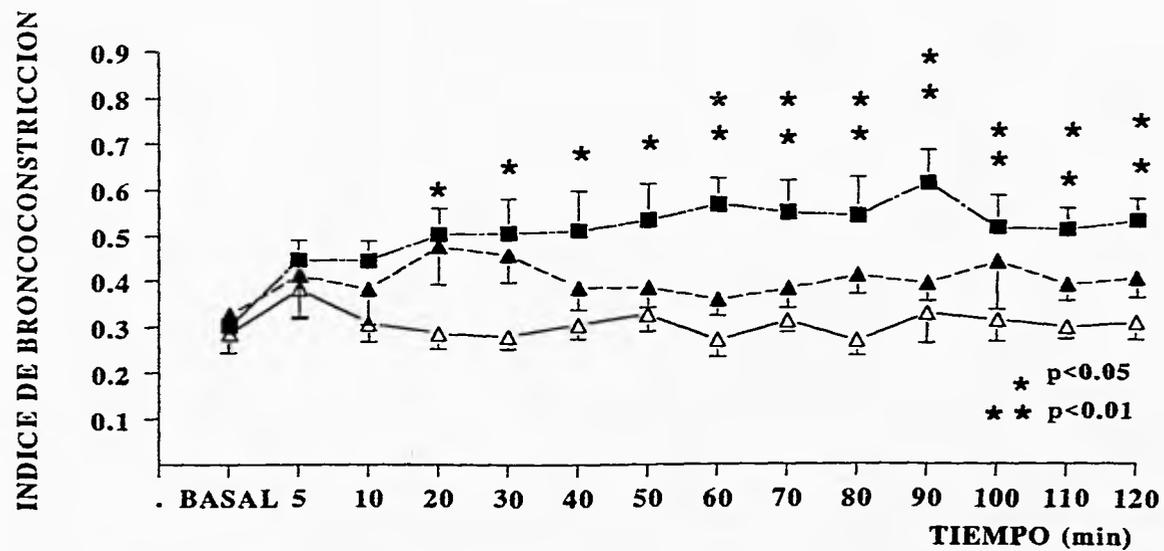


Fig.6. Efecto del paratuberculosis sobre la broncoconstricción en cobayos hembras a diferentes concentraciones en un curso temporal. En triángulos vacíos, el grupo control (n=6); en triángulos llenos, el grupo con 3.2 mg/Kg de paratuberculosis (n=6) y en cuadros llenos, el grupo con 10 mg/Kg de paratuberculosis (n=6). Todos los valores son expresados como $\bar{x} \pm EE$. Las diferencias significativas corresponden al grupo control vs el grupo de 10 mg/Kg de paratuberculosis (*p<0.05, **p<0.01).

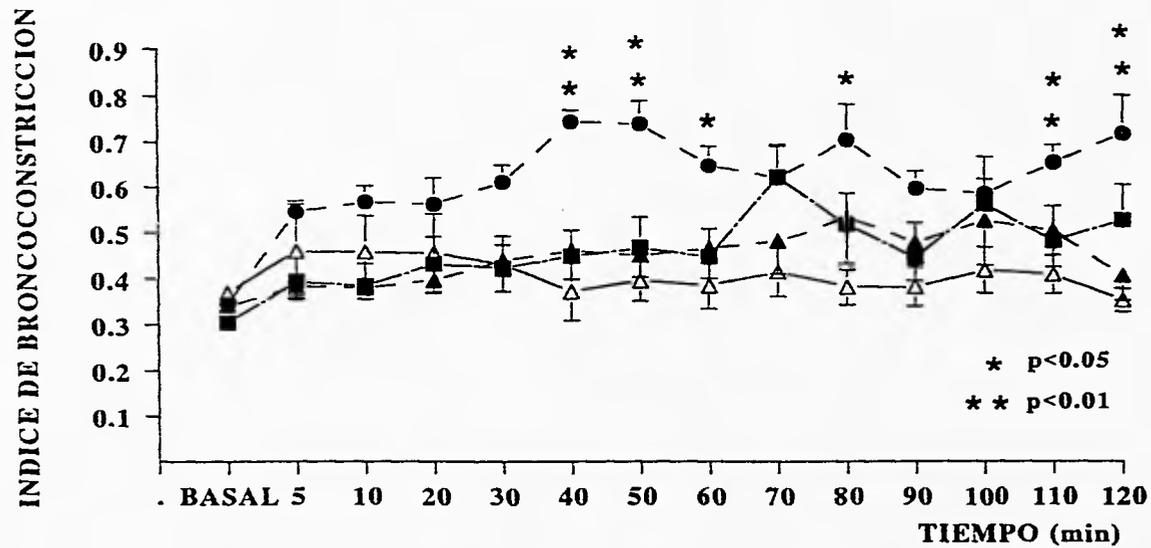


Fig.7. Efecto del paratuberculosis sobre la broncoconstricción en cobayos machos a diferentes concentraciones en un curso temporal. En triángulos vacíos, el grupo control (n=6); en triángulos llenos, el grupo con 3.2 mg/Kg de paratuberculosis (n=6); en cuadros llenos, el grupo con 10 mg/Kg de paratuberculosis (n=6) y en círculos llenos, el grupo de 17 mg/Kg de paratuberculosis (n=6). Todos los valores son expresados como $\bar{x} \pm EE$. Las diferencias significativas corresponden al grupo control vs el grupo de 17 mg/Kg de paratuberculosis (*p<0.05, **p<0.01).

Evaluación del edema

En los cobayos hembras que fueron anestesiados, la administración de 10 mg/Kg de paratión produjo un incremento significativo ($p < 0.01$) posteriores a los 90 minutos de la administración de paratión, en el contenido de agua en los tejidos en parénquimas pulmonares con respecto al grupo control (82.19 ± 0.15 vs 80.97 ± 0.29), mas no en las vías aéreas centrales (traquea y bronquios) (Fig. 8).

En la evaluación del edema mediante la técnica de extravasación de azul de Evans, los resultados obtenidos no muestran efecto de 10 mg/Kg de paratión, posteriores a los 90 minutos de administración, en las vías aéreas centrales, como tampoco en el parénquima pulmonar de cobayos hembras anestesiados (Fig. 9).

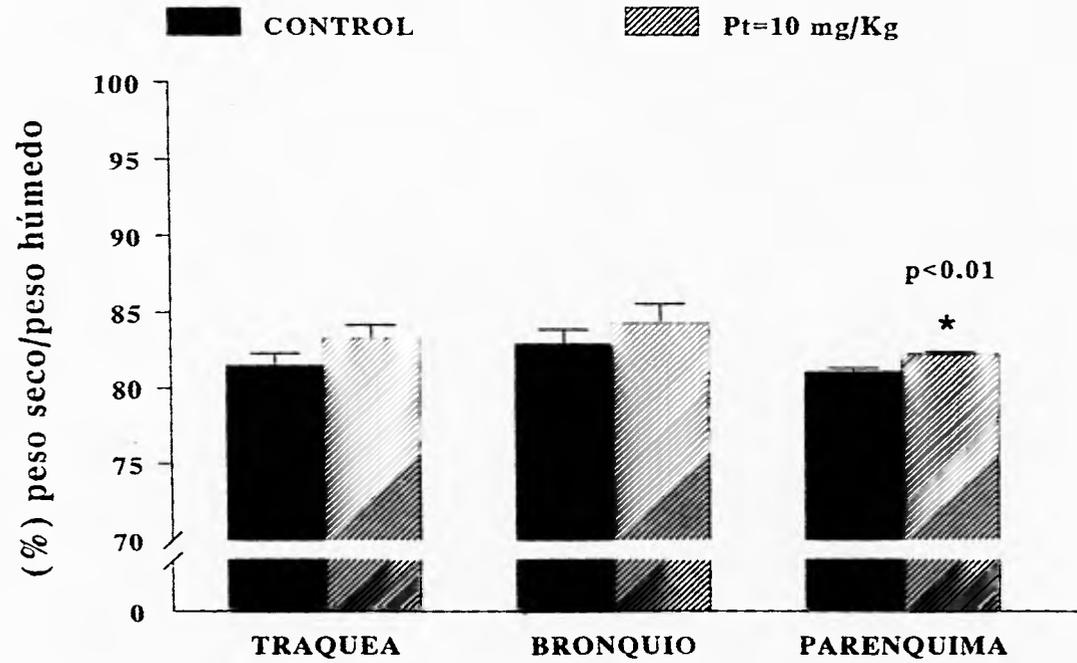


Fig. 8. Contenido de agua en parénquima pulmonar y vías aéreas 90 minutos después de haber administrado 10 mg/Kg de paratión en cobayos hembras anestesiados. En barras llenas el grupo control (n=4) y en barras c/lineas transversales, el grupo con 10 mg/Kg de paratión (n=4). Todos los valores son expresados como $\bar{x} \pm EE$. La diferencia significativa corresponde únicamente a parénquima pulmonar (*p < 0.01)

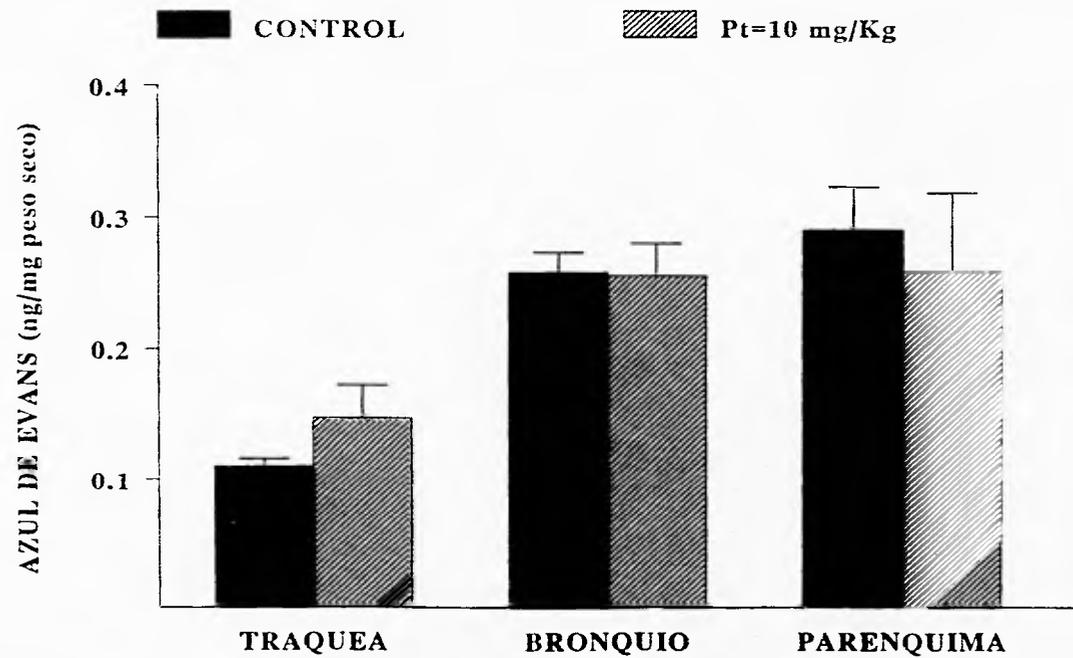


Fig.9. Contenido de azul de Evans en parénquima pulmonar y vías aéreas 90 minutos después de haber administrado 10 mg/Kg de paratuberculin a cobayos hembras anestesiadas. En barras llenas el grupo control (n=4) y en barras c/lineas transversales, el grupo con 10 mg/Kg de paratuberculin (n=4). Todos los valores son expresados como $\bar{x} \pm EE$ Las diferencias entre el grupo control y el experimental no son significativa.

Análisis de la frecuencia respiratoria y su relación con la broncoconstricción.

Al analizar los datos obtenidos de los diferentes grupos experimentales 3.2, 10 ó 17 mg/Kg, se encontró que el paratión además de generar broncoconstricción, actúa sobre la frecuencia respiratoria, causando bradipnea.

En el grupo control de las hembras, a las cuales únicamente se les administró el vehículo del paratión (Fig.10), no se observa decremento de la frecuencia respiratoria. Lo mismo se observa a la dosis de 3.2 mg/Kg de paratión (Fig.11); sin embargo en la dosis de 10 mg/Kg de paratión se observó una relación inversamente proporcional entre el incremento en el índice de broncoconstricción y la frecuencia respiratoria (Fig.12. $r=-0.71$, $p<0.0042$).

En el grupo de los machos, el grupo control que solo recibió el vehículo del paratión (Fig.13), no mostró decremento de la frecuencia respiratoria. Sin embargo, a las dosis de 3.2, 10 y 17 mg/Kg de paratión, se observó una marcada correlación inversa entre el decremento en la frecuencia respiratoria y el índice de broncoconstricción ($r=-0.88$, $p<0.0001$; $r=-0.72$, $p<0.003$ y $r=-0.76$, $p<0.001$) Fig 14, 15 y 16 respectivamente.

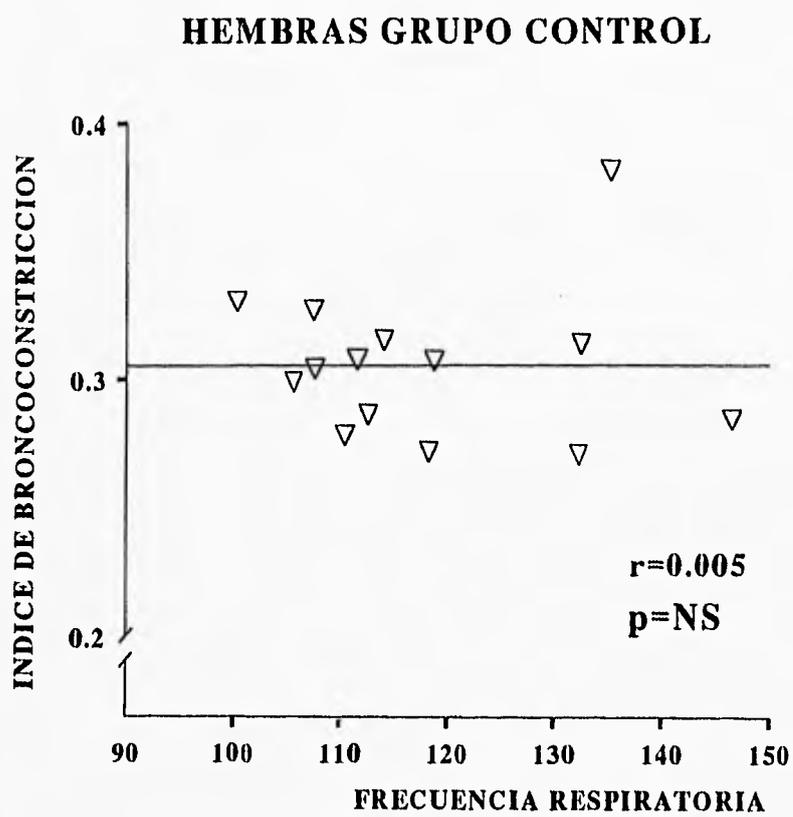


Fig.10. Asociación entre el índice de broncoconstricción y la frecuencia respiratoria en respuesta al propilenglicol y etanol .

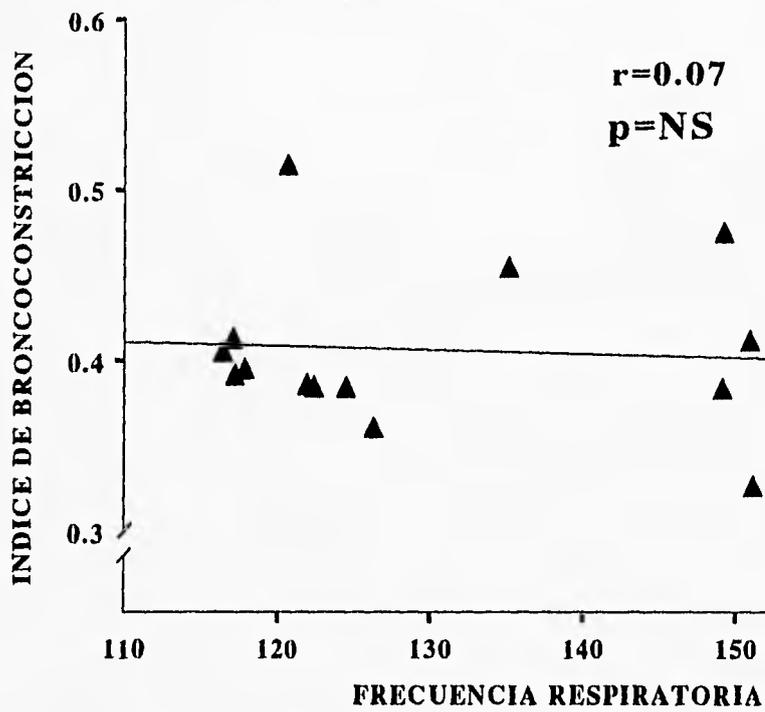
HEMBRAS CON 3.2 mg/Kg DE PARATION

Fig.11. Asociación entre el índice de broncoconstricción y la frecuencia respiratoria en respuesta a 3.2 mg/Kg de paration.

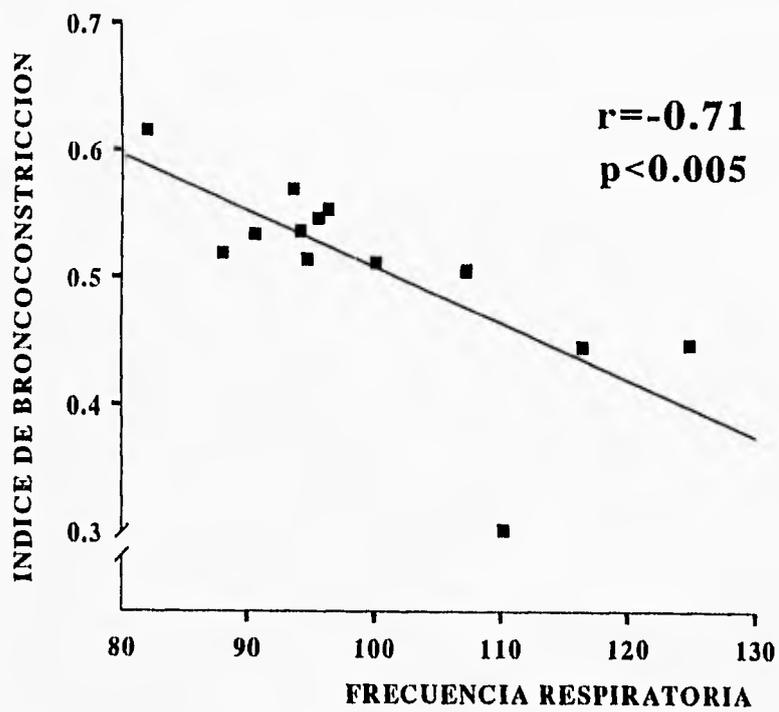
HEMBRAS CON 10 mg/Kg DE PARATION

Fig.12. Asociación entre el índice de broncoconstricción y la frecuencia respiratoria en respuesta a 10 mg/Kg de paratión.

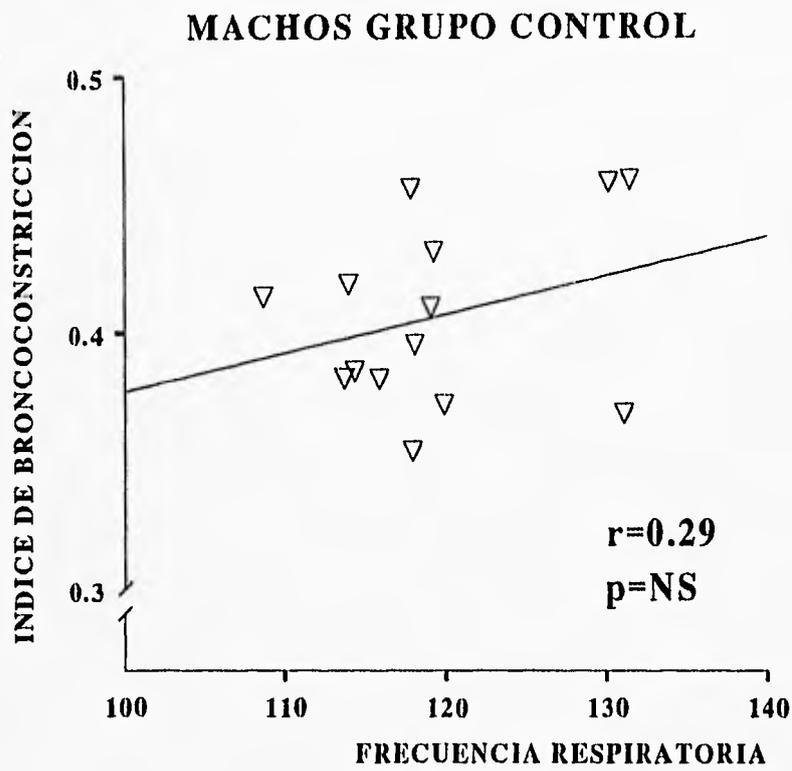


Fig.13. Asociación entre el índice de broncoconstricción y la frecuencia respiratoria en respuesta al propilenglicol y etanol .

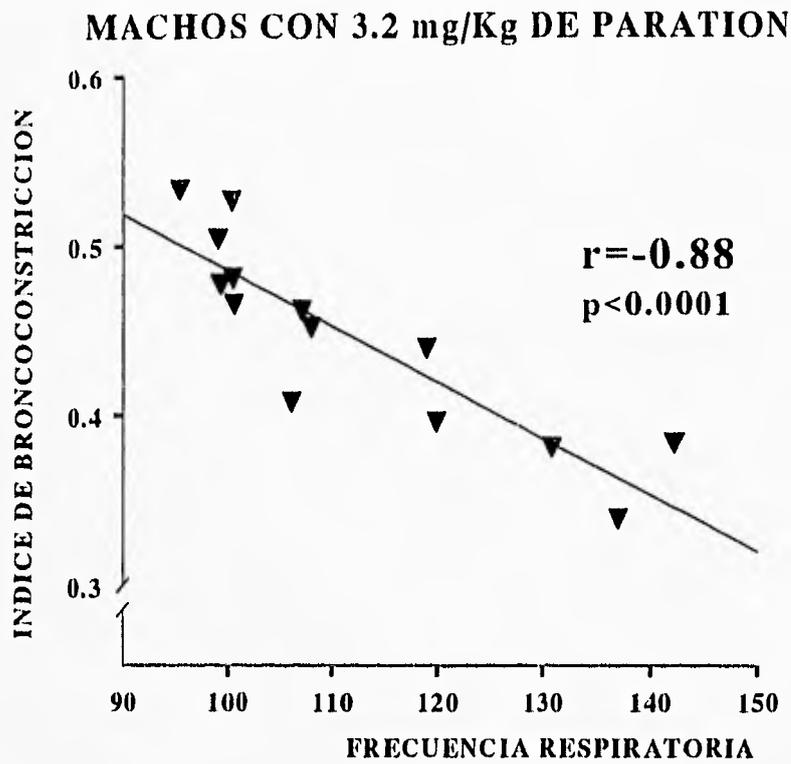


Fig.14. Asociación entre el índice de broncoconstricción y la frecuencia respiratoria en respuesta a 3.2 mg/Kg de paratión.

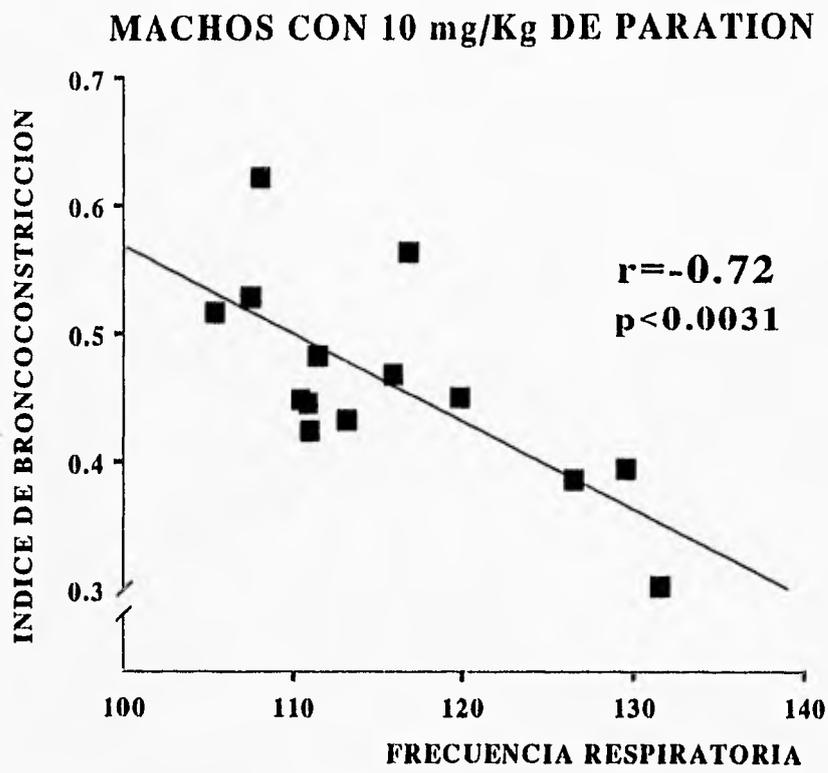


Fig.15. Asociación entre el índice de broncoconstricción y la frecuencia respiratoria en respuesta a 10 mg/Kg.

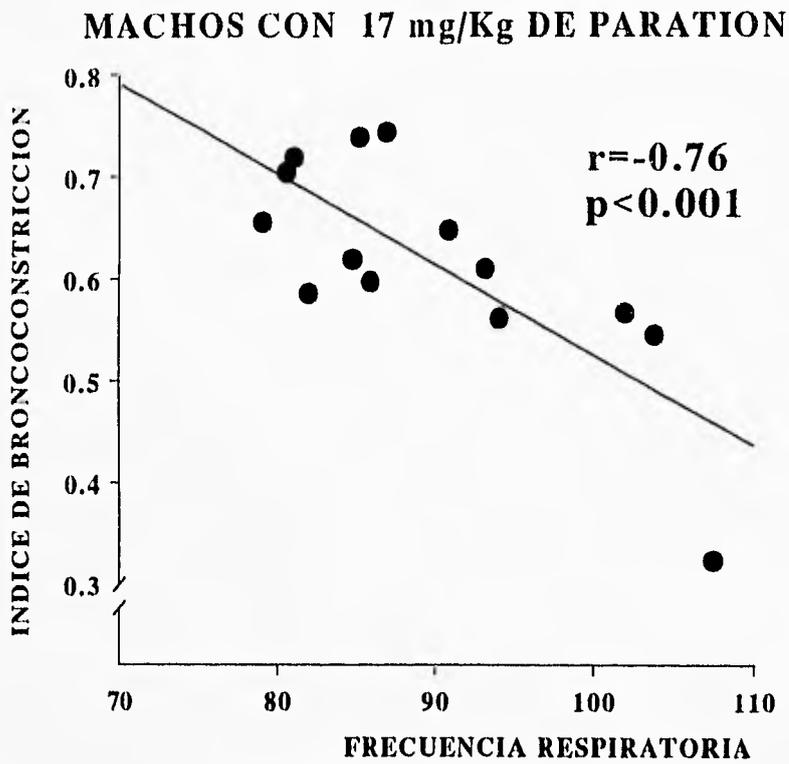


Fig. 16. Asociación entre el índice de broncoconstricción y la frecuencia respiratoria en respuesta a 17 mg/Kg de paratión.

DISCUSIÓN

La broncoconstricción es una de las alteraciones fisiológicas importantemente asociada a una intoxicación con insecticidas organofosforados como el paratión. En este trabajo se encontró que la administración aguda de paratión genera obstrucción de las vías aéreas de cobayo sanos y que dicha obstrucción es de manera dependiente de la dosis y del sexo.

Se observó que la administración aguda de paratión no desencadena los trastornos respiratorios, reflejados como la broncoconstricción, inmediatamente después a su administración; sino que el incremento de dicha broncoconstricción es progresiva, observándose minutos después a su administración. El incremento fue significativo 20 minutos después a la administración intraperitoneal de paratión, manteniendo un incremento discreto pero continuo, y no fue hasta los 60 minutos cuando alcanza su efecto máximo sobre las vías aéreas, manteniéndose hasta el final del registro. Esta latencia en el efecto puede deberse al tiempo requerido para ser absorbido y metabolizado por los diferentes tejidos involucrados como son principalmente el hígado y el pulmón.

Sabemos que las intoxicaciones por paratión pueden ser ocupacionales o voluntarias y que las vías más comunes de entrada son por medio de la piel, la inhalatoria o la digestiva, las cuales son debidas principalmente a la falta de conocimiento en el manejo de estos compuestos. En nuestro laboratorio la administración del paratión a cada uno de los animales fue por vía intraperitoneal. Esta vía es una de la forma más seguras de administración de fármacos altamente tóxicos,

por otra parte esta vía favorece la absorción rápida del fármaco y pasa al torrente sanguíneo en cuestión de minutos, puesto que la cavidad abdominal cuenta con una gran superficie de absorción, además que las dosis de paratión administradas son en razón de miligramos. La administración de paratión a través de otra vía no es conveniente, debido principalmente al manejo de este compuesto, ya que la administración por vía inhalatoria, por ejemplo el nebulizado de paratión, que debe ser en dosis altas, así como de volúmenes grandes, además de que se corre un alto riesgo de contaminación ambiental en el aérea de trabajo por paratión.

El mecanismo que subyace a la broncoconstricción por efecto de paratión, es la inhibición de la acetilcolinesterasa (2,3). Entre otras alteraciones del aparato respiratorio inducidas por paratión destacan, por importancia, el incremento en las secreciones traqueales y bronquiales, las cuales no fueron cuantificables en este modelo, así como el edema en el parénquima pulmonar debido principalmente al aumento en la permeabilidad vascular pulmonar inducido por la acumulación de acetilcolina. En un modelo *ex vivo* estudiando el bloque cardiopulmonar de conejos (2) se informa que la perfusión de paratión (4×10^{-4} M) produce un incremento en el coeficiente de filtración capilar-pulmonar. Por otro lado, Delaunois y col. (15) comprobaron que la acumulación de acetilcolina (10^{-5} M) produce un efecto máximo en los valores del coeficiente de filtración capilar. Estas evidencias señalan que el paratión inhibe la hidrólisis de acetilcolina la cual se acumula en los pulmones y se genera posteriormente edema pulmonar.

El edema generado por la administración de paratión solo se observó en los

fragmentos de parénquima pulmonar y no en las vías aéreas centrales. En este mismo grupo de animales, no pudo ser cuantificable el edema causado por paratión en ninguno de los tejidos mediante la técnica de azul de Evans. En 1995 Dreyfuss (35) publicó que si se mantiene un animal ventilado mecánicamente por tiempo prolongado, se induce edema pulmonar si el volumen corriente se aumenta considerablemente en las primeras respiraciones al iniciar el experimento, así como por la administración endovenosa de ciertos fármacos. En el caso de este estudio, se puede refutar esta idea porque la ventilación mecánica no fue mayor a 6 ml, pues se administra 1 ml por cada 100 gramos de peso corporal, y no varió más de 1 ml en todo el experimento. Por otro lado, la generación de edema podría estar enmascarada por algún proceso fisiológico compensatorio central en el animal consciente, en tanto que en un animal anestesiado y muscularmente paralizado, estos mecanismos pueden estar bloqueados o disminuidos y por consiguiente el edema pulmonar es cuantificable.

Existen diferentes estudios sobre los efectos del paratión, los cuales incluyen condiciones *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Los resultados de cada uno de los modelos experimentales son diferentes y en ocasiones no pueden compararse. Recientemente Delaunois y col. (4), demostraron que en condiciones *ex vivo*, extrayendo el bloque cardiopulmonar de conejos, el paratión genera edema en el parénquima pulmonar ya que incrementa el peso y tamaño de los pulmones, el cual es explicado por un incremento en la permeabilidad del endotelio. Esto es visto en nuestros resultados en animales anestesiados, ya que se observa un incremento significativo en el contenido de agua alojada en las muestras de parénquimas pulmonares, expresando estas

diferencias como edema del parénquima pulmonar.

Por otro lado, observamos que los cobayos hembras son más vulnerables al paratión que los cobayos machos. Las respuesta pudiera estar modulada por los ciclos hormonales de los cobayos hembras, ya que todos los factores que pudieran influir en la respuesta como alimentación, estrés y condiciones ambientales generales fueron controladas y similares para ambos grupos. Estas diferencias con respecto al sexo son de gran influencia para la biotransformación de diversos xenobióticos, ya que el sexo está relacionado con el complejo enzimático citocromo P450 (1,2,21). Como ya se sabe, el P450 juega un papel importante en la oxidación de numerosos compuestos, recordando que los niveles de este complejo enzimático en roedores adultos está modulado por factores endocrinos como hormonas sexuales (21). Las ratas machos presentan una mayor cantidad de citocromo P450 hepático, por ejemplo P450 2C11, que puede ser expresado por la testosterona, en comparación con las hembras que no lo expresan (21). Con esta evidencia en los niveles circulatorios de esta enzima y con los resultados obtenidos en el presente trabajo se comprueba que las hembras son más vulnerables a los efectos tóxicos del paratión que los machos. Hay que tomar en cuenta las aportaciones realizadas en diferentes animales para estudiar los efectos del paratión, esto a diferentes niveles. Entre los animales más utilizados se encuentran las ratas, los cobayos, conejo, cerdos y recientemente peces y aves han sido de gran interés (6,9,10,29,36). Por ejemplo, los niveles de toxicidad para los mamíferos es muy amplio (demostrado en la DL_{50}), la cual va desde los límites de mg/Kg hasta g/Kg.

Hay varios factores que tienen influencia sobre la toxicidad a los insecticidas en

cualquier especie que se hable. El factor más obvio es la sensibilidad del órgano blanco, pero la disposición y metabolismo tienen también una considerable significancia. Algunos insecticidas pueden ser activados metabólicamente e interaccionar con moléculas blancas, tal es el caso del paratión que es activado mediante su oxidación por el citocromo P450 a su metabolito activo el paraoxón, con alto poder anticolinérgico. Esto hace que los datos encontrados en cada modelo experimental cambien y las relaciones entre especies sean casi imposibles de asociarlas.

Por ejemplo, se ha mostrado que las aves son más susceptibles a los efectos tóxicos de los organofosforados que los mamíferos (8,9,10), probablemente debido a que exhiben bajos niveles de esterase tipo A (requerida para hidrolizar al paraoxón), en comparación con la alta actividad de esterase A encontrada en sangre e hígado de mamíferos. Por otro lado, la expresión del citocromo P450 en mamíferos como el humano, se debe principalmente a su actividad y expresión genética.

En respuesta al decremento en la frecuencia respiratoria, el sistema respiratorio presenta dos centros principales de control respiratorio; el centro inspiratorio y el centro espiratorio. Cada uno cuenta con diversos tipos de células capaces de ser eléctricamente estimuladas, así como ser inhibidas. Tanto el paratión como el paraoxón pudieran tener efectos secundarios sobre el sistema respiratorio, demostrado en el decremento significativo sobre la frecuencia respiratoria tanto en hembras como en machos. Este efecto debe ser confirmado con inhibidores del citocromo P450 para dilucidar si las dos moléculas o solo una, es o son responsables del decremento de la frecuencia respiratoria en intoxicaciones generadas con estos organofosforados.

En las hembras se nota una correlación inversa entre el incremento en el índice de broncoconstricción y la frecuencia respiratoria, lo cual era de esperarse, debido a que el organismo "prefiere" sacrificar la frecuencia respiratoria o sea, respirar menos, por incrementar el volumen de aire que pueda entrar a las vías aéreas, esto debido a que tiene que contrarrestar la resistencia que oponen las vías aéreas a la salida y entrada de aire.

En los machos, aunque no se observa un incremento en el índice de broncoconstricción a las dosis de 3.2 y 10 mg/Kg de paratión, sí se observa un franco decremento en la frecuencia respiratoria. Esta respuesta en las hembras muy probablemente está enmascarada con el índice de broncoconstricción, en cambio, en los machos, esta respuesta está favorecida por el hecho de que no hay broncoconstricción.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que:

1. La administración aguda de paratión genera broncoconstricción en cobayos sanos y conscientes.
2. En dicha broncoconstricción, probablemente tenga participación la generación de edema del parénquima pulmonar, mas no edema de las vías aéreas centrales.
3. Los cobayos hembras son más vulnerables a la administración aguda de paratión, cuantificada como el incremento del índice de broncoconstricción, en comparación con los cobayos machos.
4. Solo en los cobayos hembras anestesiados el paratión generó edema en parénquimas pulmonares.
5. El decremento en la frecuencia respiratoria puede ser un efecto secundario del paratión o paraoxón sobre la función respiratoria o bien, un efecto indirecto debido a la broncoconstricción.

REFERENCIAS

1. Goodman G.A, Goodman L.S, Gilman A. 1991. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Editorial Médica Panamericana (octava edición). Buenos Aires, 143-160 pp.
2. Sutiak V, Gustin P, Delaunois A, Ansay M. Protective effect of chloramphenicol against parathion induced pulmonary oedema in rabbits: influence of sex. *J.Vet. Pharmacol. Therap.* 1994; 17: 77-79.
3. Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Role of Neuropeptides in Acetylcholine-Induced Edema in Isolated and Perfused Rabbit Lung. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994; 266 (2): 265-491.
4. Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Altered Capillary Filtration Coefficient in Parathion and Paraoxon Induced Edema in Isolated and Perfused Rabbit Lungs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992; 116: 161-169.
5. Delaunois A. *Approch physio-pathologique et pharmacotoxicologique de l'oedeme pulmonaire provoqué par les organo-phosphores*. Tesis de Doctorado. Université de Liège. Faculté de Médecine Vétérinaire. Belgique
6. Chang SK, Williams PL, Dauterman WC, Riviere JE. Percutaneous absorption, dermatopharmacokinetics and related bio-transformation studies of carbaryl, lindane, malathion, and parathion in isolated perfused porcine skin. *Toxicology.* 1994. 91: 269-280.
7. Henoa S, Corey G. 1986. *Plaguicidas organofosforados y carbámicos*. Serie vigilancia 2. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud; Organización Mundial de la Salud. 194 p.

8. Gil F, Gonzalvo M C, Hernandez A, Villanueva E, Pla A. Differences in the kinetic properties, effect of calcium and sensitivity of inhibitors of paraoxon hydrolase activity in rat plasma and microsomal fraction from rat liver. *Biochemical Pharmacology*. 1994, 48 (8): 1559-1568.
9. Fryday SL, Hart ADM, Marczylo T.H. Effect of sublethal exposure to an organophosphate on the flying performance of captive starlings. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1995. 55 (3): 366-373.
10. Thompson HM, Langton SD, Hart ADM. Prediction of inter-species differences in the toxicity of organophosphorus pesticides to wildlife. A biochemical approach. *Pharmacology Toxicology & Endocrinology*. 1995.11:1; 1-12.
11. Martin H. 1964. *The scientific principles of crop protection*. Edward Arnold, LTD. London. 376 p.
12. Cremlyn R. 1990. *Plaguicidas modernos y su acción bioquímica*. Limusa, México. 356 p.
13. *The Merck Index and Encyclopedya of Chemicals, Drug and Biologicals*. 1989. Eleventh Edition. Published by Merck & Co., Inc.
14. Sommer. Cervantes M^a. Eugenia Betina. *Efectos presinápticos y postsinápticos en el músculo liso de las vías aéreas del cobayo después de la exposición aguda a ozono*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria. U.N.A.M. 1995.
15. Delaunois A, Gustin P, Ansay M. Multiple Muscarinic Receptor Subtypes Mediating Pulmonary Oedema in the Rabbit. *Pulmonary Pharmacology*. 1994; 7: 185-193.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

16. Delaunois A, Gustin P, Dessy-Doize C, Ansay M. Modulatory effect of neuropeptide Y on acetylcholine-induced oedema and vasoconstriction in isolated perfused lung of rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 1994; 113: 973-981.
17. *Plaguicidas. Salud y Ambiente. Memorias de los Talleres de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México. 1982; Xalapa Ver. Méx. 1983. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. 421 p.*
18. Lehninger AL, Nelson D, Cox MM. 1993. *Principios de Bioquímica*. Ed. Omega, segunda edición, Barcelona. 1013p.
19. Murray M, Gorgon FR. Selectivity in the inhibition of Mammalian Cytochromes P-450 by Chemical Agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990. 42:2; 85-101.
20. Graham-Lorence S, Peterson AJ. P450s Structural similarities and functional differences. *The FASEB Journal.* 1996.10:2;206-214.
21. Kraner CJ, Morgan TE, Halpert JR. Selective suppression of rat hepatic cytochrome P-450 2C11 by chloramphenicol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994. 270 (3): 1367-1372.
22. Murray M, Butler AM. Identification of a reversible component in the in vitro inhibition of rat hepatic cytochrome P-450 2B1 by parathion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995. 227;2: 639-644.
23. Vitarius JA, Sultatos LG, The role of calcium in the hydrolysis of the organophosphate paraoxon by human serum A-esterase. *Pharmacology.* 1994. 56:2; 125-134.
24. Padilla S, Wilson ZV, Bushnell JP. Studies on the correlation between blood

cholinesterase inhibition and target tissue inhibition in pesticide-treated rats. *Toxicology*. 1994. 92: 11-25.

25. Udaka K, Takeuchi Y, Movat HZ. Simple Method for Quantitation of Enhanced Vascular Permeability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1970. 133: 1384-1387.

26. Drake RE, Gabel JC. Pulmonary Edema Fluid Clearance Pathways. *News in Physiology Science*. 1995. 10; 107-111.

27. Sheppard D, Scypinski L, Horn J, Gordon T, Thompson JE. Granulocyte-mediated airway edema in guinea pig. *J. Appl. Physiol.* 1986. 60:4; 1213-1220.

28. West BJ. 1980. *Fisiopatología pulmonar*. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires. 224p.

29. Chand N, Nolan K, Pilar J, Lomask M, Diamantis W, Sofia RD. Aeroallergen-induced dyspnea in freely moving guinea pigs: quantitative measurement by bias flow ventilated whole body plethysmography. *Allergy*. 1993; 48 :230-235.

30. Evans T.W, Rogers D.F, Belvisi M.G, Rohde J.A.L, Chung P.J. Endotoxin-induced plasma exudation in guinea-pig airways in vivo and the effect of neutrophil depletion. *Eur. Respir. J.* 1990; 3: 299-303.

31. Reynolds A.M, Steven P.Z, Scicchitano R, Mcevoy D. Airway hypocapnia increases microvascular leakage in the guinea-pig trachea. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 145: 80-84.

32. Evans T.W, Chung K.F, Rogers D.F, Barnes P.J. Effect of platelet-activating factor on airway vascular permeability: possible mechanisms. *J. Appl. Physiol.* 1987; 63: 479-

484.

33. Klaesner JW. Optical measurements of lung microvascular filtration coefficient using polysulfone fibers. *Exp. Biol. Med.* 1994. 22;6: 660-673.

34. Dunnett CH W. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *American Statistical Association Journal.* Dec. 1955: 1096-1121.

35. Dreyfuss D, Soler P, Saumon G. Mechanical Ventilation induced pulmonary edema: interaction with previous lung alterations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995. 151; 1568-1575.

36. Chambers E J, Russell L C. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. *Toxicology.* 1995. 105; 291-304.