

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

IDENTIFICACION DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA TOXICIDAD AGUDA INDUCIDA POR PARATION EN EL APARATO RESPIRATORIO

T E S I S QUE PRESENTA: M. EN C. PATRICIA SEGURA MEDINA PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (FARMACOLOGIA)

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMIREZ

COASESORES: DR. MARIO HUMBERTO VARGAS BECERRA DR. PASCAL GUSTIN



MEXICO, D. F.

2000

276744



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.

*Por que tu guías mis pasos y enriqueces
siempre mi alma con Tu amor, Gracias Señor*

*Para el amor de mi vida, Jorge y para mis
dos pequeñas bendiciones, Ana Valeria y
María Astrid. Por que sus sonrisas, su
amor y su ternura son la fuerza de mi
espíritu.*

*En especial para ti Papá, porque tu
sabiduría es mi inspiración para siempre
seguir superándome*

*Para mi Mamí Conny, Yaya y Abi, y para
todos mis hermanos, hermanas, sobrinos y
sobrinas.*

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis forma parte de un proyecto de investigación que en forma conjunta fue realizado por el Departamento de Investigación en Asma del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la Secretaría de Salud, el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Lieja en Bélgica. Este proyecto fue parcialmente apoyado por la Comunidad Económica Europea (CI1*CT93-0032), el PUIS-UNAM (394-446/17-X-94) y el CONACYT (F643-M9406). Por lo que agradezco al Pueblo de México, a la Comunidad Europea y en especial al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, cuyo apoyo económico permitió que esta investigación fuera concluida satisfactoriamente.

Con especial afecto agradezco al Dr. Pascal Gustin y a la Dra. Annie Delaunois cuyo apoyo académico y amistad permitieron que mi estancia en Bélgica fuera ampliamente enriquecedora. De igual manera, quiero agradecer a mis tutores Dr. Luis M. Montaña y Dr. Mario H. Vargas, así como a mi compañero y amigo Jaime Chávez, ya que la paciencia y apoyo académico de los tres permitió la exitosa terminación de esta tesis. Finalmente quiero agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Asma del INER y los del Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria de Lieja por su amistad, apoyo y motivación a mi trabajo.

INDICE

Página

| | |
|--|----|
| ABREVIATURAS/GLOSARIO | 2 |
| RESUMEN | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| Insecticidas organofosforados | 5 |
| Uso de los agentes organofosforados | 5 |
| Intoxicaciones por organofosforados | 6 |
| Importancia del citocromo P450 en el metabolismo de los agentes organofosforados | 6 |
| Inhibición de la acetilcolinesterasa por plaguicidas organofosforados | 10 |
| Signos de intoxicación | 10 |
| Efecto del paratión en las vías aéreas del cobayo | 11 |
| OBJETIVOS | 15 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 16 |
| Diseño experimental | 16 |
| Cobayos | 16 |
| Conejos | 16 |
| Técnica de pleτισmografía en cobayos | 17 |
| Efecto del salbutamol | 19 |
| Medición de la producción de moco | 19 |
| Pulmón aislado y perfundido de conejo | 20 |
| Técnica de la preparación | 20 |
| Evaluación funcional: determinación de la reactividad pulmonar | 22 |
| Curvas concentración-respuesta | 22 |
| Evaluación bioquímica: determinación de actividades enzimáticas | 22 |
| Actividad de la ACE pulmonar | 22 |
| Actividad del citocromo P450 pulmonar | 23 |
| Actividad de la paratión oxidasa | 24 |
| Actividad de la EROD | 25 |
| Fármacos | 25 |
| Análisis estadístico | 26 |
| RESULTADOS | 27 |
| Experimentos en cobayos | 27 |
| Efecto del paratión en el músculo liso de las vías aéreas | 27 |
| Efecto del paratión sobre la producción de moco en cobayos | 28 |
| Experimentos en conejos | 28 |
| Inhibición de la ACE | 28 |

| | |
|---|-----------|
| Efecto del paratión sobre la mecánica respiratoria en el pulmón de conejo | 30 |
| Hiperreactividad de las vías aéreas | 30 |
| Efecto del pretratamiento repetitivo con dosis subclínicas de paratión en el conejo | 32 |
| Efecto en la actividad del P450 | 32 |
| Efecto en la inhibición de la ACE inducida por la IC50 de paratión | 32 |
| Efecto en la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por la IC50 de paratión | 33 |
| Diferencias sexuales en la actividad del P450 pulmonar del conejo | 33 |
| DISCUSIÓN | 35 |
| Mecanismos de toxicidad pulmonar aguda del paratión | 35 |
| Mecánica respiratoria | 35 |
| Papel del citocromo P450 | 36 |
| Diferencias Sexuales en la respuesta al paratión | 36 |
| Participación de la contracción del músculo liso traqueobronquial | 37 |
| Participación de la secreción de moco en las vías aéreas | 38 |
| Participación de Edema | 38 |
| Hiperreactividad de las vías aéreas | 39 |
| Efecto del pretratamiento repetitivo con dosis subtóxicas de paratión | 40 |
| CONCLUSIONES | 42 |
| REFERENCIAS | 43 |

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Página

| | |
|---|----|
| Figura 1. Uso de paratión en EUA durante 1992 | 5 |
| Figura 2. Vías propuestas de biotransformación del paratión | 7 |
| Figura 3. Mecanismo de oxidación del paratión por parte del citocromo P450..... | 9 |
| Figura 4A,B. Efecto del paratión sobre el índice de resistencia pulmonar (iRL) en cobayos hembras..... | 12 |
| Figura 5A,B. Efecto del paratión sobre el índice de resistencia pulmonar (iRL) en cobayos machos..... | 12 |
| Figura 6. Efecto del paratión en la reactividad de las vías aéreas a la acetilcolina en cobayos machos..... | 13 |
| Figura 7. Efecto del paratión (10 mg/Kg) en el contenido de agua tisular en tráqueas, bronquios y parénquima pulmonar de cobayos hembras..... | 13 |
| Figura 8. Diseño experimental de los experimentos en pulmón aislado y perfundido..... | 17 |
| Figura 9. Sistema de pletismografía para cobayos en libre movimiento..... | 17 |
| Figura 10. Representación esquemática de un ciclo respiratorio..... | 18 |
| Figura 11. Circuito de perfusión utilizado para el pulmón aislado y perfundido de conejo..... | 21 |
| Figura 12. Efecto del salbutamol sobre la broncoobstrucción inducida por paratión..... | 27 |
| Tabla 1. Monosacaridos totales presentes en el lavado broncoalveolar de cobayos hembras tratadas con paratión..... | 28 |
| Figura 13. Correlación entre la concentración de paratión y su inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa (ACE) en los pulmones de conejo..... | 29 |
| Figura 14. Correlación entre el porcentaje de inhibición de la actividad de la ACE inducida por paratión y la reactividad de las vías aéreas a acetilcolina..... | 29 |
| Figura 15. Efecto del paratión (60 min) sobre la resistencia pulmonar (RL) en la preparación de pulmón aislado y perfundido de conejo..... | 30 |
| Figura 16 A,B,C. Efecto del paratión sobre la reactividad de las vías aéreas a la acetilcolina, histamina y sustancia P en el pulmón aislado de conejo..... | 31 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Efecto del pretratamiento repetitivo con dosis subclínicas de paratión en la actividad del P450 pulmonar..... | 32 |
| Figura 18. Efecto del pretratamiento repetitivo con dosis subclínicas de paratión en la hiperreactividad de las vías aéreas a acetilcolina inducida por la IC50 de paratión..... | 33 |
| Tabla 2. Actividad de la paration-oxidasa y la EROD en conejos hembras y machos..... | 34 |

ABREVIATURAS/GLOSARIO:

| | |
|-------------------|---|
| ACE | Acetilcolinesterasa (enzima que degrada a la acetilcolina, y que es inhibida por los insecticidas organofosforados). |
| ACH | Acetilcolina (neurotransmisor colinérgico) |
| EROD | 7-etoxiresorufin-O-desetilasa (isoenzima del citocromo P450: CYP 1A1, encargada de la biotransformación del 7-exotiresorufin en resorufin). |
| CP ₁₀₀ | Concentración provocativa 100% (concentración de un agonista que causa un cien por ciento de incremento del valor basal de la resistencia pulmonar R _L). |
| CGL | Cromatografía gas-liquido. |
| DP ₂₀₀ | Dosis provocativa 200% (dosis de un fármaco que aumenta dos veces el valor basal del índice de resistencia pulmonar iR _L). |
| IC ₅₀ | Concentración inhibitoria 50% (concentración de un compuesto que produce el 50% de su efecto inhibitorio máximo) |
| iR _L | Índice de la resistencia pulmonar total (índice que durante la pletismografía en cobayos da una estimación de los cambios en la resistencia pulmonar) |
| P450 | Citocromo P450 |
| P _A | Presión alveolar (la presión del gas en el interior de los alvéolos). |
| P _a | Presión arterial. |
| Penh | Abreviatura de <i>enhanced pause</i> (índice que durante la pletismografía en cobayos da una estimación de los cambios en la resistencia pulmonar. También se le llama iR _L). |
| Pt | Paratión |
| Pv | Presión venosa. |
| R _{aw} | Resistencia de las vías aéreas |
| R _L | Resistencia pulmonar total (constituye la suma de la Raw y la Rti) |
| R _{ti} | Resistencia del tejido pulmonar |
| SP | Sustancia P (neurotransmisor polipeptídico del sistema excitatorio no adrenérgico y no colinérgico) |
| V | Volumen |

IDENTIFICACIÓN DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA TOXICIDAD AGUDA INDUCIDA POR PARATIÓN EN EL APARATO RESPIRATORIO.

M.C. PATRICIA SEGURA MEDINA

RESUMEN

Antecedentes: El uso de insecticidas organofosforados es aún muy frecuente y cada año su uso sin control origina miles de intoxicaciones en todo el mundo. Aunque sus mecanismos de toxicidad han sido estudiados en diversos órganos, la información referente al aparato respiratorio es sorprendentemente escasa, a pesar de que en muchos casos de intoxicación la causa del fallecimiento suele ser de origen respiratorio. En un trabajo previo analizamos las modificaciones inducidas por un agente organofosforado, el paratión (Pt), sobre la mecánica de las vías aéreas y la reactividad a la acetilcolina (ACh, 0.1-3.2 mg/ml, 2 min, vía inhalatoria) utilizando un pletismógrafo para cobayos en libre movimiento. Se observó que la administración de Pt (3.2-17 mg/Kg i.p.) induce un incremento, dosis-dependiente, del índice de resistencia pulmonar (iRL), que fue más intenso en los cobayos hembras. Dicho incremento en la iRL inducido por el Pt fue completamente abatido por inhibición farmacológica del citocromo P450 (P450) con piperonilbutóxido (500 mg/Kg. i.p.). Adicionalmente observamos que el Pt es capaz de inducir edema en el tejido pulmonar, el cual podría contribuir a la broncoobstrucción inducida por el Pt. Finalmente se determinó que una dosis subumbral de Pt produce hiperreactividad a la ACh en cobayos. **Objetivo:** En el presente trabajo se estudió la participación del músculo liso traqueobronquial y el incremento en la secreción de moco en la toxicidad inducida por el Pt, sobre las vías aéreas del cobayo. Así mismo se caracterizaron los efectos que el Pt desencadena en otra especie animal, el conejo desde un punto de vista bioquímico y funcional. **Métodos:** En un estudio *in vivo* utilizando pletismografía de libre movimiento en cobayos: 1. Se determinó el papel de la contracción del músculo liso de las vías aéreas en el incremento del iRL inducido por el Pt administrando un relajador β -adrenérgico el salbutamol 2. Se estudió el probable incremento en la secreción de moco inducida por Pt en lavados broncoalveolares de cobayos. Utilizando la preparación de pulmón aislado y perfundido de conejo 3. Se estudiaron los efectos agudos del Pt sobre la mecánica de las vías aéreas y su reactividad a la ACh (10^{-8} - 10^{-3} M), histamina (10^{-8} - 10^{-3} M) y sustancia P (10^{-10} - 10^{-6} M). 4. Adicionalmente fue estudiado el posible desarrollo de tolerancia con la administración previa de dosis bajas de Pt (1 mg/Kg. s.c. diario, 7 días) en la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (ACE) y el P450 pulmonar y la reactividad de las vías aéreas a la ACh. **Resultados y Conclusiones:** 1) En cobayos el incremento en el iRL inducido por el Pt fue revertido un 50% al administrar salbutamol (2 mg/ml, 2 min vía inhalada, o 10 μ g/Kg. i.p.). El efecto del salbutamol fue transitorio (5-10 min), lo que sugiere que este β -adrenérgico desencadena mecanismos obstructivos adicionales en presencia del Pt. 2) El Pt incrementó las secreciones mucosas medidas a través del contenido de monosacáridos totales en el lavado broncoalveolar 3) En el pulmón aislado de conejo se observó que el Pt fue incapaz de modificar la resistencia basal por sí solo, sin embargo el Pt indujo hiperreactividad de las vías aéreas a la ACh e histamina. La hiperreactividad a histamina fue prevenida por la atropina 4) La exposición repetitiva a dosis bajas de Pt (1 mg/Kg. s.c., 7 días) causó ~80% de inhibición de la actividad del P450 en conejos, que no fue suficiente para prevenir el efecto tóxico de una dosis mayor de Pt sobre la actividad de la ACE ni para evitar la inducción de hiperreactividad de las vías aéreas por parte del Pt.

IDENTIFICATION OF MECHANISM INVOLVED IN THE ACUTE AIRWAY TOXICITY INDUCED BY PARATHION.

M.SC. PATRICIA SEGURA MEDINA

ABSTRACT

Organophosphates are still widely used worldwide and cause thousands of intoxications every year. In a previous work we investigated the modifications induced by an organophosphate agent the parathion (Pth), on airway mechanics and responsiveness to acetylcholine (ACh, 0.1 to 3.2 mg/ml, 2 min inhalation each dose) using a plethysmographic technique for unrestrained guinea pigs. We found that Pth (3.2 to 17 mg/Kg., i.p.) produced a dose-dependent increase in a lung resistance index (iRL). This increase in iRL was greater in female animals, and completely blocked by pharmacological inhibition of P450 with piperonyl butoxide (500 mg/Kg. i.p.). In male guinea pigs a subclinical dose of Pth (10 mg/Kg. i.p.) induced airway hyperresponsiveness to ACh. Additionally, we found that Pth increased the water content in lung parenchyma samples, but not in trachea or bronchi. Based on these observations, the aim of the present investigation was to evaluate others mechanism involved on airway Pth effects. We evaluated the participation of airway smooth muscle contraction using an unrestrained guinea pig plethysmograph. The increase of respiratory secretions after Pth (10 mg/Kg. i.p.) administration in guinea pigs was analyzed by a colorimetric method. On the other hand, we investigated the airway modifications induced by Pth in rabbits, using biochemical and functional approaches. The isolated perfused rabbit lung preparation was used to study the acute effects of Pth on airway responsiveness to ACh (10^{-8} to 10^{-3} M), histamine (10^{-8} to 10^{-3} M) and substance P (10^{-10} to 10^{-6} M). Additionally we studied the effects of Pth on pulmonary acetylcholinesterase and cytochrome P450 (P450) activities, and their modifications with previous administration of Pth (1 mg/Kg. s.c. daily, 7 days). We found that: 1) In guinea pigs the increase in iRL induced by Pth was greatly reverted (~50%) by salbutamol (2 mg/ml, 2 min inhalation, or 10 µg/Kg. i.p.). This salbutamol effect was transient (5-10 min), suggesting that this bronchodilator triggered additional obstructive mechanisms. 2) Pth augmented the respiratory secretions measured through monosaccharide content in bronchoalveolar lavage. 3) In isolated perfused rabbit lung preparation Pth (10^{-6} M) did not modify the baseline lung resistance, but it produced airway hyperresponsiveness to ACh and histamine, the latter prevented by atropine (10^{-5} M). 4) Repetitive exposure to subclinical doses (1 mg/Kg. s.c.) of Pth during one week caused ~80% inhibition of P450 activity in rabbits, which was not enough, to prevent the functional manifestation of Pth toxicity in the airways.

INTRODUCCION

INSECTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.

Uso de los agentes organofosforados. Los plaguicidas organofosforados, familia de compuestos a la cual pertenece el paratión (Pt)(O,O-dietil O-4p-nitrofenil fosforotionato), fueron sintetizados en los años cuarenta e introducidos al mercado como plaguicidas de alta eficacia [Taylor, 1985]. A pesar de conocerse que estos compuestos representan un alto riesgo para la salud, todavía siguen empleándose a gran escala en el mundo entero, como insecticidas y antihelmínticos, provocando envenenamientos tanto en seres humanos como en animales [Del Valle, 1967; Delaunoy *et al.*, 1992b]. Tan sólo en los Estados Unidos de América (EUA) aún se emplean casi 5,000 toneladas anuales de Pt en los diversos cultivos [United States Geological Survey 1992] (Fig. 1).

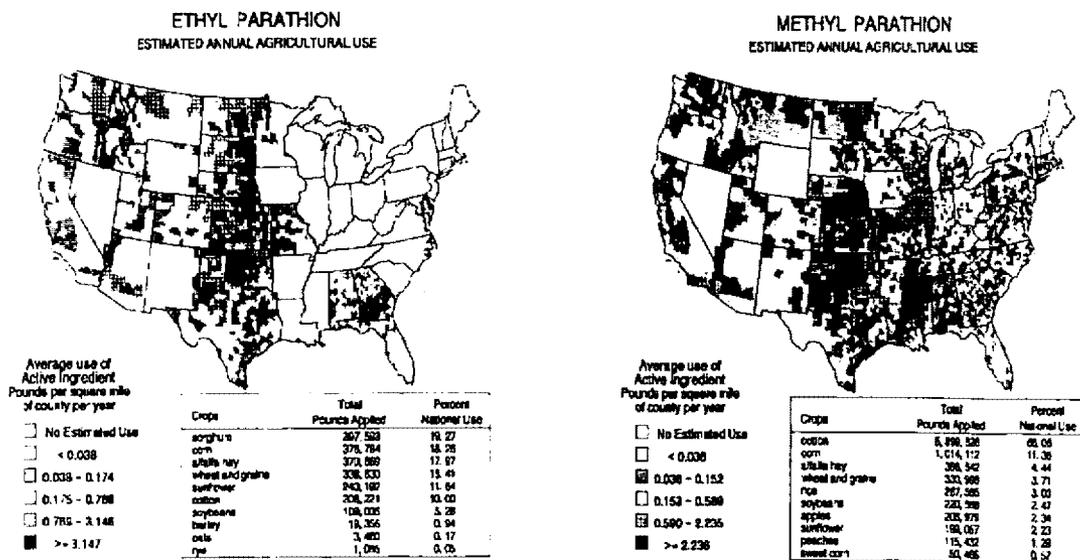


Figura 1. Uso de paratión en EUA durante 1992

Intoxicaciones por organofosforados. La elevada incidencia de intoxicaciones por insecticidas organofosforados, así como la intensidad de sus síntomas, provocan que éstas representen un grave problema de salud pública [Taylor, 1985; Henoa y Corey, 1986; Tsachalinas *et al*, 1971]. Así, se ha calculado que el número de intoxicaciones anuales por plaguicidas en el mundo aumentó de 500,000 en 1972 a 5,000,000 en 1990, y que de las 148 intoxicaciones masivas por plaguicidas ocurridas entre 1951 y 1990, el 39% fueron causadas por compuestos organofosforados [Levine y Doull, 1992]. En EUA, donde el uso de cualquier plaguicida está estrictamente regulado, con cierta frecuencia se informa de intoxicaciones por estos insecticidas [Anonymous, North Dakota Pesticide Quarterly 1997]. En los países en desarrollo se desconoce la magnitud del problema, pero seguramente es mucho mayor debido a que en estos países se compran cantidades cada vez mayores de plaguicidas organofosforados por su bajo costo, lo que se suma a la grave ausencia de una regulación legal adecuada para su utilización y la falta de equipo protector debido a su alto costo o al clima caluroso [United Nations Environment Programme 1998].

Importancia del Citocromo P450 en el metabolismo de los agentes organofosforados. Los seres vivos se hallan continuamente expuestos a diversos agentes químicos del ambiente llamados *xenobióticos*. En general los compuestos más lipofílicos son fácilmente absorbidos y difícilmente eliminados del organismo. Afortunadamente los organismos animales han desarrollado diversos procesos metabólicos para convertir dichos compuestos a metabolitos más hidrofílicos para facilitar su excreción. A dichos procesos bioquímicos se les denomina como *biotransformación* y son usualmente de naturaleza enzimática [Sipes y Gandolfi, 1990]. Los organofosforados como el Pt son sustancias liposolubles, lo que los hace fácilmente absorbibles por cualquier vía de entrada al organismo como la cutánea, digestiva o inhalatoria. Además, son moléculas de difícil degradación metabólica, por lo que puede ocurrir una intoxicación por acumulación de estos compuestos, que si bien no es tan severa como la generada por los compuestos organoclorados [Hatch, 1982].

En ocasiones el proceso de biotransformación es capaz, de convertir una sustancia química inocua, en un metabolito activo que puede ser potencialmente dañino para el organismo, dicho proceso se denomina como *bioactivación*. Este es el caso del Pt, en condiciones *in vitro*, la molécula de Pt tiene un efecto biológico pobre, sin embargo, una vez que ha sido absorbida es biotransformada y bioactivada a paraoxón (O,O-dietil p-nitrofenil

fosfato) por el sistema enzimático del citocromo P450 (P450) principalmente en la fracción microsomal hepática y en el pulmón [Taylor, 1985, Neal 1972].

El proceso metabólico del Pt puede seguir dos reacciones posibles, una reacción de oxidación donde el grupo sulfuro del Pt es sustituido por un oxígeno, dando lugar al paraoxón (Fig. 2) [Neal 1971]. Una segunda reacción puede presentarse, la dearilación del Pt que genera su inactivación al ser biotransformado directamente a para-nitrofenol (PNP) y ácido dietilfosfórico, ambos compuestos inocuos para el organismo (Fig. 2)[Kamatagi *et al.* 1976]. Adicionalmente una tercera vía metabólica del Pt ha sido descrita, donde enzimas solubles (transferasas y fosfatasas) dependientes de glutatión contribuyen a la detoxificación del Pt y del paraoxón [Sultatos 1992]. Las vías de eliminación del paraoxón incluyen su hidrólisis por enzimas A-esterasas dependientes de calcio llamadas paraoxonasas, que lo convierten a ácido dietilfosfórico y PNP, el cual es conjugado con moléculas acarreadoras formando PNP- β -glucuronido o PNP-sulfato que son finalmente desechados en la orina [Qiao *et al.* 1994].

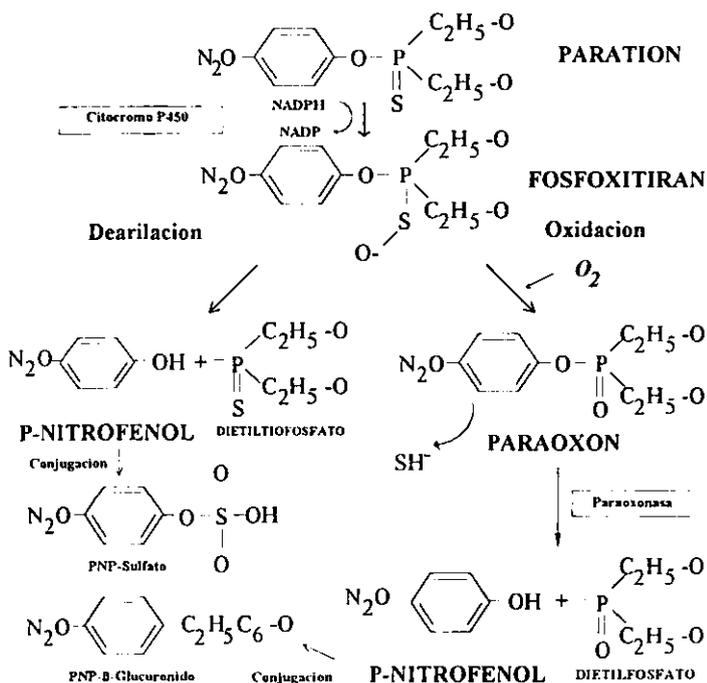


Figura 2. Vías propuestas de biotransformación del paratión

El sistema de monoxigenasas del citocromo P450, constituye el complejo enzimático más importante asociado a las reacciones de biotransformación primaria de un xenobiótico. El complejo P450 está constituido por dos enzimas acopladas: una enzima hemoprotéica la citocromo P450 y la NADPH-citocromo P450 reductasa, en una proporción de 10 citocromos por cada reductasa [Benet et al., 1996]. Las reacciones oxidativas catalizadas por el P450 requieren de la presencia de un cofactor, la flavoproteína NADPH que es la encargada de transferir uno o dos electrones al P450, así como también, se necesita oxígeno molecular para completar la reacción. En la figura 3 podemos observar una representación esquemática del proceso de oxidación de un xenobiótico por parte del P450, poniendo como ejemplo al Pt. En primer lugar, el Pt (substrato) se une a la forma oxidada del P450 (Fe^{3+}) formando un complejo enzima-sustrato. La NADPH-citocromo P450 reductasa acepta entonces un electrón proveniente del NADPH, lo que a su vez genera la reducción del complejo P450-xenobiótico. El complejo reducido P450 (Fe^{2+})-substrato reacciona con un oxígeno molecular y un segundo electrón donado por la flavoproteína, formando una especie reactiva de oxígeno. Por último, un átomo de oxígeno es liberado como agua, mientras que el segundo átomo de oxígeno es transferido al Pt. El xenobiótico oxidado (paraoxón), así como un grupo tiol son finalmente liberados. La enzima P450 en su forma oxidada queda activa para ser nuevamente utilizada [Benet et al., 1996].

En estudios *in vitro* utilizando microsomas hepáticos se ha demostrado que el átomo de azufre electrofílico que se libera durante la biotransformación del Pt, puede unirse covalentemente al sitio activo del P450 inactivándolo [Halpert *et al.*, 1980], disminuyendo así su actividad catalítica, es decir que el Pt podría ocasionar la autoinhibición de su bioactivación. El descubrimiento de este fenómeno, permite especular que dosis subtóxicas de Pt pudieran tener un efecto protector contra una exposición subsecuente a una dosis tóxica del mismo. Sin embargo, la existencia de este fenómeno nunca se ha demostrado en condiciones *in vivo*.

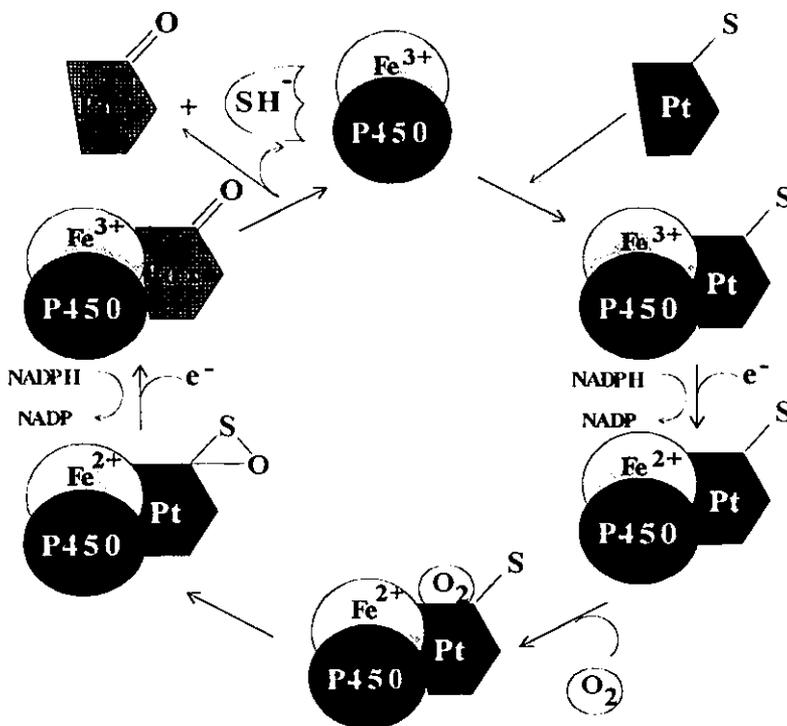


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de oxidación del paratión por parte del citocromo P450. Adaptado de Benet et al., 1996

En 1987 se unificó una nomenclatura para clasificar a la superfamilia multigénica del P450 en base a la homología de sus secuencias de aminoácidos. De esta manera los citocromos son considerados de la misma familia génica cuando presentan más de un 40% de similitud en sus secuencias, esto es representado por la abreviación CYP y un número arábigo que identifica a cada familia. Si el 60% de la secuencia es idéntica, pertenecen entonces a la misma subfamilia, la cual es designada por una letra mayúscula. Finalmente, una isoenzima específica es caracterizada con un número arábigo suplementario [Sipes y Gandolfi, 1990]. Como ejemplo tenemos a la 7-etoxiresorufin-O-desetilasa (EROD) enzima responsable de la desetilación del 7-etoxiresorufin en resorufin, que pertenece a la familia 1, a la subfamilia A y es la isoenzima 1, es decir CYP1A1. Existen más de 500 genes y pseudogenes del P450 identificados en la

naturaleza, aunque en mamíferos la mayor actividad oxidativa de los xenobióticos es llevada a cabo principalmente por las familias CYP1, 2 y 3. [Benet et al., 1996].

En humanos, se ha determinado que la bioactivación del Pt en paraoxón es catalizada principalmente por las isoformas hepáticas CYP3A4 y CYP3A5, sin embargo se ha demostrado que otras isoenzimas como CYP1A1, CYP2B6 y CYP2C8 son capaces, también de metabolizar, en menor grado al Pt *in vitro* [Mutch et al., 1999]. Para el caso de la rata se sabe, que la CYP2B1 es la principal isoenzima responsable de bioactivar al paraoxón en microsomas hepáticos [Murray y Buttler, 1995]. En conejos se piensa que es una isoforma de la subfamilia 2B la que metaboliza al Pt en hígado, sin embargo las isoformas específicas de P450 encargadas del proceso catalítico oxidativo del Pt en el pulmón de conejos y cobayos, no se conocen aun con exactitud, por lo que en nuestro estudio la(s) isoenzima(s) del P450 involucrada(s) en dicho proceso de bioactivación se denomina(n) genéricamente como paratióxi-oxidasa.

Inhibición de la acetilcolinesterasa por plaguicidas organofosforados. Los principales efectos tóxicos inducidos por los agentes organofosforados, como el paraoxón, se basan en su capacidad de bloquear irreversiblemente la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (ACE) [Taylor, 1985]. Durante el proceso normal de hidrólisis de la acetilcolina (ACh), sustrato natural de la ACE, el grupo hidroxil-serina del centro catalítico de la enzima, es acetilado dejando libre a la molécula de colina, la inmediata separación hidrolítica del acetato y la ACE (aproximadamente en 0.15 milisegundos) completa la reacción. En presencia de un compuesto organofosforado la inhibición de la ACE se origina con la unión mimética del plaguicida al grupo hidroxil-serina de la ACE por una reacción de transesterificación o transfosforilación. Dicha unión se dice que es irreversible por que el complejo fosforil-ACE es hidrolizado de manera excesivamente lenta, el tiempo aproximado de unión entre la molécula fosforil-ACE es de 60 hrs, por lo que la capacidad catalítica de esa molécula de ACE se pierde por completo. Este fenómeno, trae como consecuencia la acumulación y persistencia anormal del neurotransmisor ACh en la sinapsis colinérgica y las uniones neuromusculares [Chambers, 1992].

Signos de intoxicación: Entre las principales manifestaciones de la intoxicación aguda por insecticidas organofosforados están las alteraciones neuromusculares (espasmos musculares),

gastrointestinales (vómito, diarrea) y neurológicas (depresión del centro respiratorio, convulsiones) [Taylor, 1985; Mayer y Schlackman, 1975; Lerman y Gutman, 1988]. Sin embargo, dentro de las alteraciones más graves y que pueden ocasionar la muerte del paciente son las respiratorias, destacando entre ellas el edema pulmonar no cardiogénico [Kass *et al*, 1991]. Por otro lado, aunque algunos estudios en animales han encontrado que los organofosforados producen también obstrucción de las vías aéreas [Lekeux *et al*, 1986, Abbrecht *et al*, 1989], los mecanismos por los cuales ocurre este fenómeno no han sido bien dilucidado. Esto resulta relevante porque la obstrucción de las vías aéreas puede ser ocasionada directamente por espasmo del músculo liso, edema de las paredes traqueobronquiales y/o aumento de las secreciones bronquiales, e indirectamente por una mayor excitabilidad (hiperreactividad) del músculo liso a los neurotransmisores o autacoides endógenos. Su tratamiento, en consecuencia, será diferente de acuerdo al principal mecanismo responsable.

EFECTO DEL PARATIÓN EN LAS VÍAS AÉREAS DEL COBAYO.

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación se analizaron mediante pletismografía para cobayos en libre movimiento, las modificaciones inducidas por el Pt, sobre la mecánica de las vías aéreas y la reactividad a la ACh (0.1-3.2 mg/ml, 2 min, vía inhalatoria). En dicho estudio se observó que la administración de Pt (3.2 a 17 mg/Kg., i.p.) induce un incremento dosis-dependiente del índice de resistencia pulmonar (iRL), que fue más intenso en los cobayos hembras, ya que con 10 mg/Kg., i.p. presentaron una broncoobstrucción sostenida desde los 20 min posteriores a la administración (Fig. 4A) ($p < 0.05$ a $p < 0.01$). Mientras que los machos necesitaron la aplicación de una dosis más alta de Pt (17 mg/Kg., $n = 6$) para incrementar de manera significativa el valor basal del iRL 40 min después de su administración ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, Figura 5A). Dicho incremento en la iRL inducido por el Pt fue completamente abatido por inhibición farmacológica del P450 con piperonilbutóxido (500 mg/Kg i.p.), tanto en hembras ($n = 8$, Figura 4B) como en machos ($n = 7$, Figura 5B).

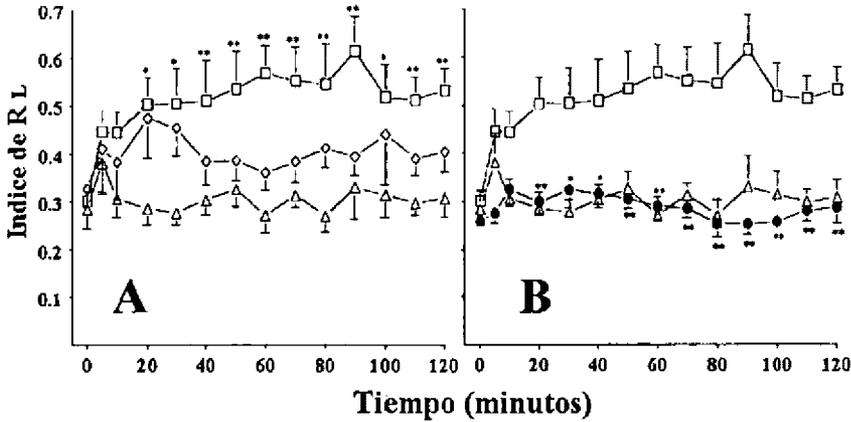


Figura 4A,B. Efecto del paratión (Pt) sobre el índice de resistencia pulmonar (iRL) en cobayas hembras. El Pt se aplicó por vía intraperitoneal en el tiempo 0 a dosis de 3.2 mg/Kg. (rombos) y 10 mg/Kg. (cuadros). El grupo control (triángulos) recibió sólo propilenglicol vehiculo del Pt. En B se muestra cómo la administración de 500 mg/Kg. de piperonilbutóxido (círculos negros) bloqueó por completo el efecto de 10 mg/Kg. de Pt.. Los símbolos representan el promedio ± EE de 6 a 8 animales. *p < 0.05 y **p < 0.01 comparados con los grupos control (A) o Pt 10 mg/Kg. (tomado de Chávez J. 1996).

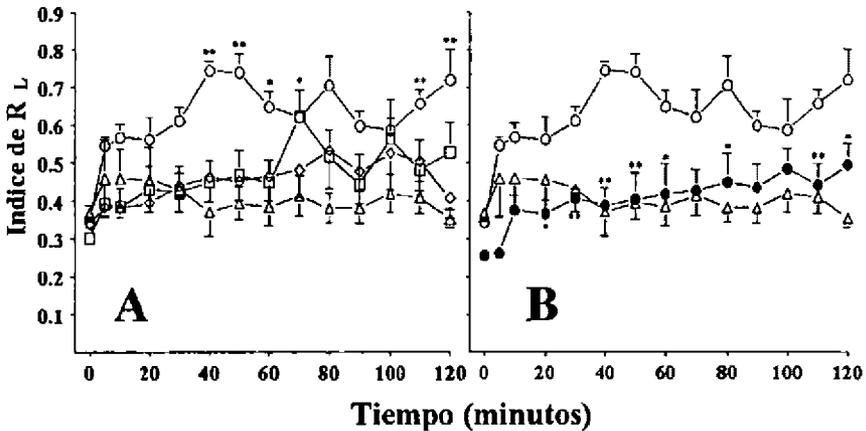


Figura 5A,B. Efecto del Paratión (Pt) sobre el índice de resistencia pulmonar (iRL) en cobayas machos. El Pt se aplicó por vía intraperitoneal en el tiempo 0 a dosis de 3.2 (rombos), 10 (cuadros) ó 17 mg/Kg. (círculos abiertos). El grupo control (triángulos) fue inyectado sólo con propilenglicol vehiculo del Pt. En B se muestra cómo la administración de 500 mg/Kg. de piperonilbutóxido (círculos negros) bloqueó por completo el incremento en el iRL inducido por el Pt.. Los símbolos representan el promedio ± EE de 6 a 7 animales. *p < 0.05 y **p < 0.01 significancia obtenida cuando se comparan con los grupos control (A) o (B) Pt 10 mg/Kg. (tomado de Chávez J. 1996).

Por otra parte, se determinó que una dosis de Pt (10 mg/Kg.) incapaz de modificar el iRL basal en cobayos machos, es capaz de inducir un incremento significativo de la reactividad de las vías aéreas a la ACh al compararla con la reactividad obtenida antes de la aplicación del agente organofosforado ($p < 0.01$, Fig. 6), es decir generó hiperreactividad de las vías aéreas.

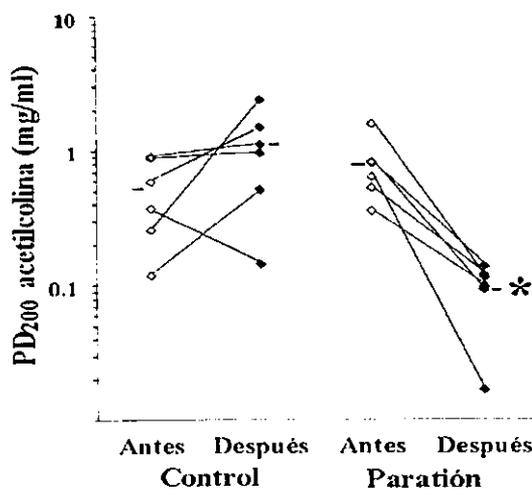


Figura 6. Efecto del paratión (Pt) en la reactividad de las vías aéreas a la ACh en cobayos machos. Los animales fueron inyectados con vehículo ($n=6$) o Pt (10 mg/Kg.) dosis que no modificó los valores basales del índice de resistencia pulmonar iRL ($n=7$). * $p < 0.01$ comparado con su reactividad antes del Pt o del vehículo, DP200 (Dosis provocativa 200% dosis de un fármaco que produce un aumento de dos veces el valor basal de la iRL). (tomado de Chávez J. 1996)

En el mismo estudio se comprobó la participación de edema del tejido pulmonar en la broncoobstrucción inducida por el Pt. La administración de 10 mg/Kg. de Pt en cobayos hembras, incrementó significativamente el contenido de agua tisular en los fragmentos de parénquima pulmonar ($p < 0.01$, Fig. 7). Sin embargo, el contenido de agua en los fragmentos traqueales y bronquiales no fue modificado por la administración de Pt.

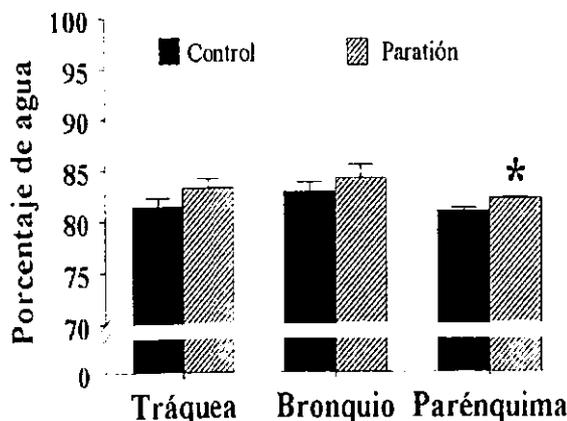


Figura 7. Efecto del paratión (10 mg/Kg.) en el contenido de agua tisular en tráqueas, bronquios y parénquima pulmonar provenientes de cobayos hembras. El paratión (barras oscuras) o el vehículo (barras rayadas) fueron administrados 90 min antes de realizar la medición * $p < 0.01$. (tomado de Chávez J. 1996).

Considerando todo lo anterior, en el presente estudio se investigó la participación de otros mecanismos que podrían estar involucrados en la toxicidad aguda inducida por Pt en las vías aéreas del cobayo, como el incremento en la producción de moco, y la participación del músculo liso traqueobronquial. Por otra parte, se determinaron los efectos del Pt en un modelo de pulmón aislado y perfundido en conejo, aplicando para ello técnicas bioquímicas y de medición de la función respiratoria.

I. Objetivo general

Identificar los mecanismos involucrados en la toxicidad pulmonar aguda inducida por Pt a nivel funcional y bioquímico en dos especies animales.

II. Objetivos específicos:

En el modelo de cobayo *in vivo* los objetivos específicos fueron:

- 1) Evaluar mediante pletismografía de libre movimiento la posible participación de la contracción del músculo liso en el incremento en el iRt. inducido por el Pt.
- 2) Determinar la posible participación de la hipersecreción de moco en la modificación de la mecánica respiratoria inducidos por Pt.

En el modelo *ex vivo* usando la preparación de pulmón aislado y perfundido de conejo, los objetivos específicos fueron:

- 1) Evaluar el efecto agudo del Pt sobre las actividades enzimáticas de la ACE y del P450 pulmonares.
- 2) Determinar el efecto agudo del Pt sobre la mecánica ventilatoria pulmonar.
- 3) Investigar el efecto de la aplicación aguda de Pt sobre la reactividad de las vías aéreas a la ACh, histamina y sustancia P (SP).
- 4) Determinar si la aplicación repetida de dosis subtóxicas de Pt en conejos origina autoinhibición de su bioactivación y por tanto una probable disminución de los efectos inducidos por una dosis tóxica subsecuente de Pt.

MATERIAL Y METODOS

Diseño experimental

Cobayos. Con el propósito de determinar la participación del músculo liso traqueobronquial y la secreción de moco en la respuesta broncoobstructora del Pt (10 mg/Kg., i.p.) en cobayos hembras se realizaron los siguientes experimentos: **1)** La contracción del músculo liso de las vías aéreas inducida por el Pt fue evaluada mediante la administración inhalada o intraperitoneal de salbutamol, un broncodilatador adrenérgico β_2 , utilizando un modelo de pletismografía de libre movimiento, y **2)** la participación del incremento en la producción de moco generada por el Pt fue medida indirectamente determinando el contenido total de monosacáridos en lavados broncoalveolares (LBA) provenientes de cobayos hembras inyectadas con Pt.

Conejos. Con el fin de determinar los efectos tóxicos inducidos por el Pt en el aparato respiratorio, las preparaciones de pulmón aislado y perfundido de conejos sanos fueron incubadas con una concentración única de Pt (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ó 10^{-4} M. durante 60 min). Se calculó la IC50 (concentración de Pt capaz de inhibir en un 50% la actividad de la ACE), comparando la actividad de la ACE en muestras de lóbulos pulmonares tomadas antes y después de la incubación con Pt (Fig. 8a). La reactividad de las vías aéreas a la ACh, histamina y SP fue evaluada después de la administración de la IC50 de Pt (Fig. 8b). El posible desarrollo de tolerancia a los efectos tóxicos del Pt por autoinhibición de su biotransformación, fue evaluado tanto a nivel bioquímico como funcional, analizando las modificaciones de la actividad enzimática de la ACE y del P450, así como la reactividad de las vías aéreas a la ACh, causadas por la administración de la IC50 de Pt en pulmones aislados y perfundidos provenientes de conejos tratados previamente con dosis subtóxicas de Pt (1 mg/Kg. s.c. diariamente por 7 días, Fig. 8c). No se observaron síntomas de toxicidad durante la administración repetida del Pt *in vivo*, excepto por ligera diarrea en un animal, que fue descartado del estudio.

Se eligió el uso de dos especies animales debido a que el conejo representa un excelente modelo para medir las actividades enzimáticas de la ACE y del P450 [Lessire *et al.*, 1996], mientras que el cobayo constituye uno de los mejores modelos para el estudio de la fisiología respiratoria. [Kallós y Kállos, 1984; Sommer *et al.*, 1998]

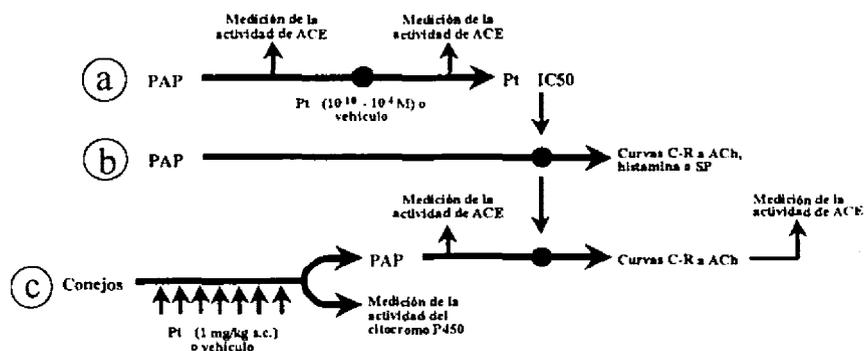


Figura 8. Diseño experimental de los experimentos en pulmón aislado y perfundido de conejo (PAP) (véase texto para mayor detalle) AC = acetilcolina, ACE = acetilcolinesterasa, C-R curvas concentración-respuesta, SP = sustancia P, Pt = paratión.

Técnica de pletismografía en cobayos. Cada uno de los cobayos (500-600 g) se introdujo en un pletismógrafo de cámara única para animales en libre movimiento (Buxco Electronics Inc, EUA) en el cual el animal recibe un flujo continuo de aire (aproximadamente 10 ml/s) que no interfiere con las señales respiratorias (Fig. 9). Este sistema de pletismografía ha sido previamente descrito en extenso [Chand *et al*, 1993; Hamelmann *et al*, 1997] y consiste en lo siguiente: La presión dentro del pletismógrafo es medida por un transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym, CA, EUA) conectado a un preamplificador, y continuamente analizado a través de un programa computacional específico (Buxco Biosystem XA v1.1).

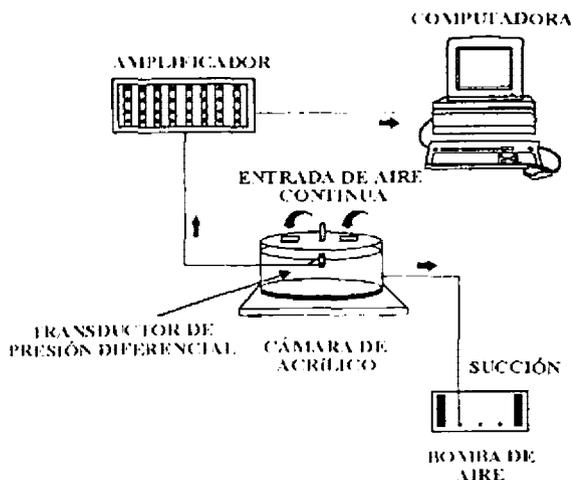


Figura 9. Sistema de pletismografía para cobayos en libre movimiento

En este sistema, el cambio en la presión de la cámara representa la diferencia entre la expansión/contracción del tórax y el volumen corriente (aire removido/añadido a la cámara durante la inspiración/espирación). En condiciones normales hay una estrecha correlación entre el movimiento de la caja torácica y el flujo nasal. Sin embargo, cuando existe obstrucción de las vías aéreas los movimientos torácicos pueden volverse más amplios, incluso aunque el volumen corriente permanezca sin cambios o disminuya. Los cambios de presión en la cámara son diferenciados para generar una señal de "pseudoflujo" que es posteriormente analizada por el programa computacional, para obtener un índice de la resistencia pulmonar (iR_L) llamado *Penh* (por sus siglas en inglés: *enhanced pause*). El valor de *Penh* es obtenido por la fórmula descrita en la figura 10:

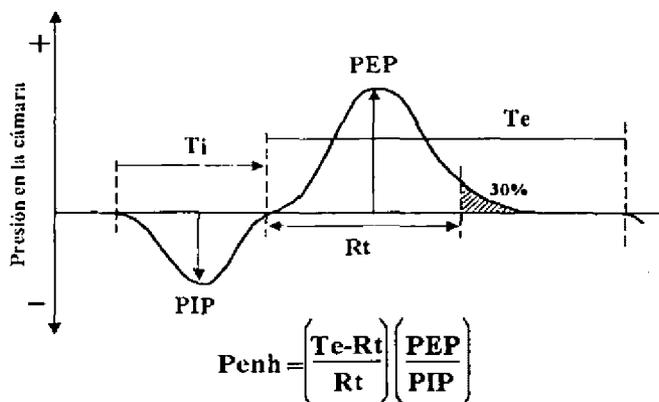


Figura 10. Representación esquemática de un ciclo respiratorio típico, mostrando los parámetros involucrados en la medición del *Penh*. Donde *Ti* = tiempo inspiratorio, *Te* = tiempo espiratorio, *PEP* = presión espiratoria máxima, *PIP* = presión inspiratoria máxima, *Rt* = tiempo de relajación. El *Rt* es medido como porcentaje del volumen corriente, en este ejemplo el 30% del aire no fue espirado.

Debido a que este índice es calculado por el programa en cada una de las respiraciones, los valores evaluados en este estudio fueron obtenidos del promedio de los últimos 5 min registrados en periodos de 10 min estudiados. Se incluyeron solamente las respiraciones con volumen corriente mínimo de 1 ml, tiempo mínimo inspiratorio de 0.15 s, tiempo máximo inspiratorio de 3 s y diferencia máxima entre volúmenes inspiratorio y espiratorio de 10%. Se rechazaron aproximadamente entre el 7 y 10% de las respiraciones por cada intervalo de tiempo, mismas que ocurrieron principalmente durante los movimientos voluntarios del animal.

Un estudio reciente demostró que el Penh correlaciona estrechamente con la medición de la presión intrapleural y de la resistencia pulmonar total (R_L) en ratones [Hamelmann *et al*, 1997]. En este sentido, cabe recordar que la R_L refleja la resistencia de la vía aérea (R_{aw}) y/o la resistencia del tejido parenquimatoso pulmonar (R_i). Por lo tanto, en este estudio el Penh es considerado como un índice de la resistencia pulmonar total (iR_L), como ha sido propuesto por otros autores [Chand *et al*, 1993; Hamelmann *et al*, 1997; Allen *et al*, 1995; Sommer *et al*, 1998].

Efecto del salbutamol. Con el propósito de evaluar si la contracción del músculo liso es un componente en el incremento del iR_L inducido por el Pt, a un grupo de cobayos hembras se les administró salbutamol por dos vías diferentes: a) Inhalatoria: nebulizando durante 2 min una solución de salbutamol (2 mg/ml) o b) intraperitoneal, inyectando 10 µg/Kg. de salbutamol. Ambas dosis corresponden a las dosis que se utilizan terapéuticamente en humanos y fueron aplicadas 90 min después de la administración i.p. de Pt (tiempo en el que se da el pico máximo de obstrucción inducido por el Pt). Para el proceso de nebulización se utilizó un nebulizador Bennet US-1, que genera una mezcla de partículas cuyo diámetro medio varía en la siguiente proporción: 44% partículas menores a 4 µm, 38% de 4 a 10 µm, y 18% mayores a 10µm a un flujo de 2 ml/min [Vargas *et al*, 1994].

Medición de la producción de moco. El probable aumento en la secreción de moco inducida por Pt fue indirectamente analizado en un grupo independiente de cobayos hembras mediante un ensayo colorimétrico. Para este fin, el contenido total de monosacáridos fue medido en lavados broncoalveolares (LBA) 120 min después de la administración de 10 mg/Kg. de Pt o del vehículo. Brevemente, los animales fueron profundamente anestesiados utilizando una sobredosis de pentobarbital sódico (50 mg/Kg. i.p.), en seguida se les colocó una cánula endotraqueal a través de la cual se realizó un LBA introduciendo 5 ml de solución salina (37°C) y 1 min después el fluido fue suavemente recuperado. Esta maniobra se repitió una vez más, y el líquido recuperado fue integrado al primer LBA, para posteriormente ser almacenado congelándolo a -70°C hasta su estudio. La concentración total de monosacáridos neutros en las muestras de LBA se analizaron mediante el método de Rimington [1940]. Los LBA fueron sonicados a 20°C, con 47 Hz (Ultrasonic Cleaners Model 8891, Cole Parmer Instrument, Vernon

Hilss, IL, USA) y dializados con una membrana de corte de 12,000 a 14,000 daltons (Spectra/Por, Spectrum, Laguna Hills, CA, USA). Este procedimiento de diálisis permite que únicamente aquellos monosacáridos neutros que se hallan unidos a partículas de alto peso molecular sean detectados (ej. glicoproteínas), lo cual descarta la cuantificación de aquellos monosacáridos libres provenientes del torrente sanguíneo. Adicionalmente, y con el fin de verificar que las glicoproteínas provenientes de la membrana plasmática no influyeran en las posibles diferencias en el contenido de monosacáridos totales, se realizaron cuentas celulares totales en algunos fluidos de LBA tanto de animales controles como de cobayos pretratados con el Pt. El método de Rimington consistió en lo siguiente: En un tubo de ensaye se colocaron 100 µl de muestra de LBA y se añadieron 200 µl de una solución de orcinol (0.1 M en 30% H₂SO₄) más 1.5 ml de H₂SO₄ al 60%. Dicha mezcla se incubó durante 20 min a 80°C y posteriormente, los tubos de ensaye se dejaron a temperatura ambiente durante 45 min en oscuridad total. Se tomaron 200 µl de cada medio de reacción que fueron transferidos a una microplaca de ELISA de 96 pozos y las placas fueron leídas en un espectrofotómetro de ELISA para determinar la absorbancia generada a 540 nm (Multiskan MS MCC/340, LabSystems, Helsinki, Finland). La concentración de monosacáridos en los LBA fue calculada en base a una curva estándar realizada con concentraciones crecientes de manosa (1 a 20 µg/ml).

Pulmón aislado y perfundido de conejo

Técnica de la preparación. Conejos Nueva Zelanda hembras y machos (2.5-3 Kg.) fueron profundamente anestesiados con una inyección intramuscular de buprenorfina (0.08 mg/Kg.) más ketamina (50 mg/Kg.). La tráquea de cada animal fue disecada y canulada, los animales fueron ventilados mecánicamente con aire humidificado usando un ventilador para roedores (Ugo Basile, Italia), con una frecuencia de 50 respiraciones por minuto y un volumen corriente de 5 ml/Kg.. El tórax se abrió mediante una incisión mediasternal y se inyectó heparina (2000 U/Kg.) en el ventrículo derecho para posteriormente desangrar al animal. El bloque cardiopulmonar fue rápidamente removido del tórax y pesado. Ambos ventrículos fueron abiertos y dos cánulas de vidrio (diámetro interno 3 mm, longitud 15 mm) se colocaron en la arteria pulmonar y en la aurícula izquierda, respectivamente. El tejido adyacente fue incluido en la ligadura de la arteria pulmonar y de la aurícula izquierda para disminuir la distensibilidad de

estas estructuras. La cánula traqueal fue conectada a un neumotacógrafo (Head 000, Fleisch, Zurich, Suiza) que fue mantenido a una temperatura constante, a fin de medir el flujo aéreo. La presión en cada uno de los puertos del neumotacógrafo fue medida a través de un transductor de presión diferencial (Sensym 324 SCXL004DN, USA). La resistencia de la cánula traqueal y los catéteres conectados a los transductores fue de $0.005 \text{ cm H}_2\text{O}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{s}$. Se tuvo especial cuidado para evitar la fuga de aire en el sistema. El bloque cardiopulmonar se conectó a una bomba de circulación (NY-7550-62 Masterflex, USA), y los pulmones se perfundieron con un flujo inicial de 20 ml/min. Este flujo se adaptó al comienzo de cada experimento para obtener una presión arterial de 12-15 cm H₂O. El circuito incluyó un reservorio venoso abierto con capacidad de 200 ml, un calentador electrónico y una trampa de burbujas (Fig. 11).

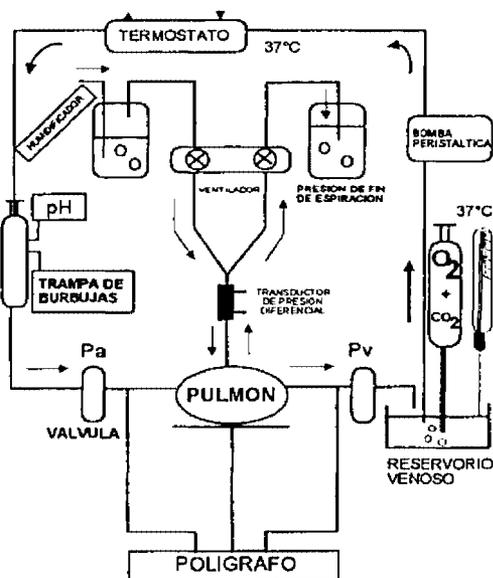


Figura 11. Circuito de perfusión y ventilación utilizado en el pulmón aislado y perfundido de conejo. Pa= presión arterial, Pv= presión venosa

El líquido de perfusión fue Krebs-Ringer bicarbonatado, con la siguiente composición (g/l): glucosa 0.98, NaCl 6.9, KCl 0.354, CaCl₂·2H₂O 0.373, MgSO₄ 0.293, KH₂PO₄ 0.162 y NaHCO₃ 2.10, además de 2.5% de albúmina bovina. El pH se ajustó a 7.4-7.5 añadiendo NaHCO₃ 1N y mantenido dentro de estos límites fisiológicos burbujearlo en el reservorio venoso con bióxido de carbono (95% CO₂, 5% O₂). La preparación fue cubierta con plástico para evitar la pérdida de líquido por evaporación y fue hiperinsuflada periódicamente para evitar atelectasias.

El flujo aéreo fue calculado por integración digital de la señal del volumen respiratorio con respecto al tiempo. La resistencia pulmonar total (R_L) fue calculada por la técnica de isovolumen [Frank *et al*, 1957]. La presión arterial (Pa) y la venosa (Pv) fueron medidas a través de dos catéteres delgados unidos a una rama colateral de las cánulas de la arteria pulmonar y de la aurícula izquierda, respectivamente, y conectados a un transductor de presión (P23XC, Statham, USA). Los transductores fueron colocados a nivel de los hilios pulmonares. El equilibrio de la preparación, usualmente obtenido después de 10-15 min, se caracterizó por una estabilidad en las presiones arterial, venosa y alveolar en condiciones de zona III ($P_a > P_v > P_A$, donde P_A es la presión alveolar al final de la espiración, preestablecida en 2 cm H_2O en el sistema). Todos los datos fueron captados por un amplificador de cuatro canales (AC264, EMKA Technologies, Francia) y digitalizados por una interfase conectada a una computadora con un programa especial (MacADIOS, GW Instruments).

Evaluación funcional: determinación de la reactividad pulmonar.

Curvas concentración-respuesta. La reactividad de las vías aéreas fue evaluada mediante la realización de curvas concentración respuesta a tres agonistas, con o sin la adición previa de la IC50 de Pt incubado durante una hora. Concentraciones crecientes de ACh (10^{-8} a 10^{-3} M), histamina (10^{-8} a 10^{-3} M) o sustancia P (10^{-10} a 10^{-6} M) fueron añadidas al líquido de perfusión con intervalos de 10 min. En cada preparación de pulmón aislado y perfundido sólo se realizó una curva concentración respuesta. Las respuestas broncoconstrictoras a estos agonistas fueron evaluadas como el incremento en la R_L . Además del Pt algunas preparaciones fueron también pretratadas con atropina (10^{-5} M, 30 min) antes de realizar las curvas concentración-respuesta a la histamina. En un estudio previo nosotros comprobamos que dicha concentración de atropina es capaz de bloquear las respuestas colinérgicas en nuestra preparación de pulmón aislado y perfundido de conejo [Delaunois *et al*, 1996]

Evaluación Bioquímica: Determinación de actividades enzimáticas

Actividad de la ACE pulmonar. La actividad de la ACE se determinó en muestras de lóbulos pulmonares usando un método colorimétrico basado en la reacción de Ellman [Ellman *et al*,

1961] y fue expresada como porcentaje de inhibición. En forma resumida, esta técnica consistió en homogeneizar un fragmento de pulmón en amortiguador de fosfatos (100 mg de tejido por ml de amortiguador) utilizando un homogeneizador (Ultra-turrax, Bruselas, Bélgica). El homogenado se centrifugó por 15 min a 3000 g. Después de filtrar el sobrenadante (filtro PTFE 22 μ m), 300 μ l fueron añadidos a una cubeta conteniendo 2.5 ml de ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB) (0.32 mM) y 300 μ l de amortiguador de fosfatos Tris-HCl (64 mM) pH 7.4. La probable unión del DTNB con algún sustrato sulfídrico presente en la muestra fue cuantificada en la muestra sin el sustrato, usando un espectrofotómetro (UV-160 Shimadzu, Japón) a una longitud de onda de 405 nm a 25°C. Inmediatamente después, 100 μ l del sustrato para la ACE (42 mM de acetiltiocolina) fueron añadidos en la cubeta y el cambio en la absorbancia por minuto emanado de la actividad enzimática colinérgica específica fue medido. La absorbancia de base se resta del valor obtenido a fin de expresar la actividad de la ACE en Unidades Internacionales (UI) de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$A \cdot 3200$$

$$\text{Actividad de la ACE (UI)} = \text{moles de sustrato hidrolizado/min/g tejido} = \frac{\text{-----}}{1.36 \times 10^4 \times 300 \times C_0}$$

Donde A es el cambio de absorbancia/min; 1.36×10^4 es el coeficiente de extinción del DTNB; C_0 es la cantidad de tejido en el sobrenadante (mg de tejido/ml de amortiguador); 3200 y 300 representan el volumen total (μ l) de la cubeta y el volumen (μ l) del sobrenadante añadido, respectivamente.

Actividad del citocromo P450 pulmonar. A fin de determinar las modificaciones en la actividad del P450 pulmonar inducidas por el Pt, en un grupo adicional de conejos, tanto hembras como machos se aplicaron dosis diarias subtóxicas de Pt (1 mg/Kg., 7 días por vía subcutánea), comparándola con la actividad de animales que recibieron únicamente el vehículo. La actividad enzimática del P450 fue medida en homogenados pulmonares mediante dos reacciones: a) la actividad oxidativa del P450 involucrada en la biotransformación del Pt en paraoxón y que recibe el nombre de paratión-oxidasa, así como b) la actividad de la isoenzima CYP 1A1 del P450, que cataliza la O-desetilación del 7-etoxiresorufin en resorufin, conocida como 7-etoxiresorufin-O-desetilasa (EROD). Adicionalmente, en un grupo independiente de

conejos, se determinó el efecto del piperonilbutóxido (500 mg/Kg., i.p., inhibidor específico del P450 [Erickson *et al.*, 1988]) sobre la actividad enzimática basal de la paratión-oxidasa y la EROD, así como las posibles diferencias en dicha actividad de acuerdo al sexo del animal.

Actividad de la paratión-oxidasa. La actividad enzimática de la paratión-oxidasa fue medida mediante la producción de paraoxón por cromatografía gas-líquido (CGL) de acuerdo al método descrito por Guengerich en microsomas pulmonares [Guengerich, 1977]. Para lo anterior, las muestras pulmonares fueron coladas a través de una prensa de órganos para remover el tejido conectivo, e inmediatamente fueron homogeneizadas en amortiguador de fosfato (1 g de tejido por 4 ml de amortiguador, pH 7.38). El homogenado se centrifugó por 60 min a 10,000 g, el sobrenadante fue filtrado a través de una gasa y ultracentrifugado por 60 min a 100,000 g. Al paquete de microsomas se le añadió amortiguador Tris-HCl (más EDTA 1 mM y KCl 0.154 M) y almacenado en nitrógeno líquido a -160°C hasta su uso. La concentración de proteínas totales en los microsomas fue determinada por el método de Lowry [1954]. El sistema enzimático oxidativo fue reconstituido al combinar 2 ml de Pt (54 μM) como sustrato, 100 μl de suspensión microsomal y 0.2 mM de β -NADPH como cofactor. La actividad de la paratión-oxidasa fue detenida después de 2 min acidificando el medio de reacción con 0.2 ml de HCl 1N. Los compuestos liposolubles no organofosforados fueron eliminados con 5 ml de hexano. La fracción orgánica se extrajo mediante desecación rotatoria al alto vacío a 40°C y los residuos fueron reconstituidos en 50 μl de etanol puro conteniendo diazinon (12 μM) como estándar interno. La concentración de paraoxón formado durante la reacción enzimática fue determinada por CGL (DN200, Delsi Nermag, USA) utilizando una columna DB1701 (J&W Scientific, USA) y un detector con alta sensibilidad para compuestos fosforados (TID). El gas acarreador (nitrógeno) se empleó a un flujo constante (0.6 bar). Las temperaturas del puerto de entrada, horno y detector fueron 220, 200 y 220°C , respectivamente. En estas mismas condiciones las curvas estándar fueron corridas. En un análisis cinético previo encontramos que el límite inferior de detección de este método es de aproximadamente 2.5 ng/ml de paraoxón [Lessire *et al.*, 1996]. Debido a que este método para cuantificar la actividad de la paratión-oxidasa se basa en la tasa de conversión de Pt a paraoxón, y ya que en el grupo experimental de conejos que recibieron Pt por 7 días era predecible encontrar residuos de paraoxón en el organismo, así que esta concentración previa de paraoxón (remanente, tiempo 0) se restó de la concentración

encontrada al final del experimento, lo que nos permitió evaluar la actividad real de la paratión-oxidasa presente al momento del análisis. La actividad de la paratión-oxidasa se expresó en pmol de paraoxón formado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína total⁻¹.

Actividad de la EROD. La actividad de la EROD fue medida por el método de Burke y Mayer [1974]. En forma breve, este método consiste en mezclar 100 μl de la suspensión de microsomas con MgCl_2 (50 μl de una solución 0.1 M) y el sustrato (etoxiresorufin, 1 μM) previamente diluido en amortiguador Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4). Después de un período de incubación de 5 min a 37°C, la reacción fue iniciada añadiendo β -NADPH como cofactor (0.2 mM) para tener un volumen final de 1 ml. La reacción fue detenida 7 min después agregando 2 ml de metanol. El medio de reacción fue centrifugado a 2000 g por 15 min y la fluorescencia del sobrenadante fue medida a través de un espectrofluorómetro (Perkin-Elmer, USA) utilizando 520 nm de longitud de onda de excitación y 585 nm de longitud de onda de emisión. Esta fluorescencia fue proporcional a la concentración del producto desetilado, es decir, del resorufin, transformado por los microsomas. La actividad de la EROD fue expresada como pmol de resorufin formado $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína total⁻¹.

Fármacos

El Paratión (Pestanal[®], O,O-dietil O-[4-nitrofenil] fosforotioato) y el paraoxón (O,O-dietil O-[4-nitrofenil] fosfato) fueron comprados de Riedel-de Haën, Alemania, y disueltos en propilenglicol y etanol (10:1.5 v/v). El cloruro de ACh, el acetato de sustancia P, el dihidrocloruro de histamina, y el sulfato de atropina (Sigma Chemical Co, EUA) fueron disueltos en solución salina (NaCl 0.9%). La acetilcolina, el ácido ditiobis-2-nitrobenzoico y el piperonilbutóxido fueron comprados de Aldrich Chemical, EUA, los dos primeros se disolvieron en amortiguador Tris-fosfato a pH 7.38. El resorufin, el etoxiresorufin y el β -NADPH fueron comprados de Sigma Chemical Co., EUA; los dos primeros fueron disueltos en dimetilsulfóxido. El diazinon fue comprado de Ehrenstorfer, Alemania. El sulfato de salbutamol (Ventolin[®]) fue comprado de Glaxo Wellcome, México.

Análisis estadístico

En la preparación de pulmón aislado y perfundido de conejo, la IC50 de Pt fue calculada mediante regresión de línea recta, relacionando el logaritmo de la concentración de Pt administrado y el porcentaje de inhibición de ACE inducido. Adicionalmente se empleó el coeficiente de correlación de Pearson para determinar la asociación estadística entre dichas variables. La reactividad de las vías aéreas se calculó basados en la concentración del agonista que incrementaba un cien por ciento el valor basal de la RL (CP100) en el pulmón aislado. Dicha concentración fue expresada como logaritmo negativo. Las diferencias entre los grupos estudiados se evaluaron mediante análisis de varianza, así como se empleó la prueba *t* de Student para datos pareados o no pareados. Finalmente cuando tres o más grupos fueron comparados entre sí, fue aplicado el método de Bonferroni o la prueba de Dunnett para la comparación múltiple de medias. La significancia estadística se fijó en $p < 0.05$ bimarginal. Los resultados son expresados en el texto y en las gráficas como promedio \pm error estándar.

RESULTADOS

Experimentos en cobayos

Efecto del Paratión en el músculo liso de las vía aéreas. El efecto broncodilatador del salbutamol fue en la meseta de broncostrucción máxima inducida por 10 mg/Kg. de Pt en cobayos hembras. Utilizando la vía inhalatoria, el salbutamol causó un decremento significativo del valor del iRL 5 min después de su administración (0.469 ± 0.058 , $p < 0.05$, Figura 12 panel superior) al ser comparado con el valor promedio de iRL (0.642 ± 0.035 , $n = 5$) obtenido en los últimos 30 min anteriores a la nebulización del salbutamol. De igual manera, al administrar el salbutamol por vía i.p. este broncodilatador disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el valor promedio de iRL inducido por el Pt 30 min antes de inyectar el salbutamol. El efecto protector del salbutamol fue transitorio, ya que se observó únicamente entre los 5 y los 10 min (0.426 ± 0.053 y 0.434 ± 0.05 , respectivamente, $n = 6$, Figura 12 panel inferior).

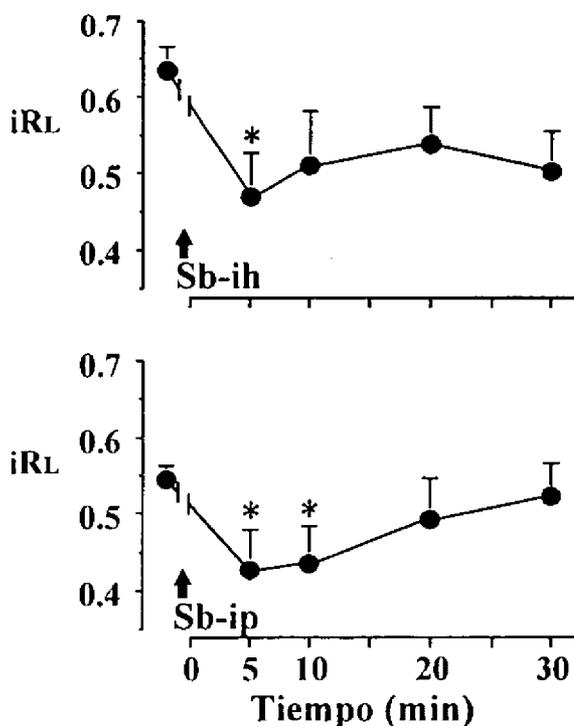


Figura 12. Efecto del salbutamol sobre la broncostrucción inducida por 10 mg/Kg. de Paratión en cobayos hembras. El salbutamol se administró por vía inhalada (Sb-ih, 2 mg/Kg., 2 min, $n=5$ panel superior) o por vía intraperitoneal (Sb-ip, 10 μ g/Kg., $n=6$; panel inferior). Los valores basales de iRL fueron calculados promediando los valores de iRL obtenidos los 30 minutos previos a la administración del salbutamol. * $p < 0.05$ comparado con el valor de iRL basal.

Efecto del Paratión sobre la producción de moco. La concentración de monosacáridos totales en los LBA se vio incrementada después de la administración de Pt ($p < 0.01$, $n = 4$, Tabla 1). Es importante mencionar que las diferencias encontradas para el contenido total de monosacáridos no fueron dadas por las células presentes en el fluido del LBA, ya que la cuenta celular total en los LBA fue similar entre el control y los cobayos pretratados con el Pt ($p = 0.55$, Tabla 1).

TABLA 1
MONOSACARIDOS TOTALES PRESENTES EN EL LAVADO BRONCOALVEOLAR
DE COBAYOS HEMBRAS TRATADAS CON PARATIÓN.

| | Monosacáridos totales ($\mu\text{g} / \text{ml}$ de LBA) $n= 4$ en ambos grupos | Células totales recuperadas en el LBA (células / ml de LBA) $n= 3$ en ambos grupos |
|-----------------|--|--|
| Paratión | $2.188 \pm 0.397^{**}$ | $453,517 \pm 21,188$ |
| Control | 0.391 ± 0.244 | $502,679 \pm 73,537$ |

El Paratión (10 mg/Kg, i.p.) o el vehículo (propilenglicol y etanol 10:1.5 v/v) fueron administrados 120 min antes de realizar los lavados broncoalveolares (LBA). Los valores representan el promedio \pm el error estándar. $** p < 0.01$ comparándolo con su respectivo grupo control al que se le administró únicamente vehículo.

Experimentos en conejos

Inhibición de la ACE. En los pulmones aislados del grupo control ($n=9$), los valores basales de la actividad de la ACE pulmonar no se modificaron 60 minutos después de la administración del vehículo (0.149 ± 0.016 vs 0.146 ± 0.018 IU). En contraste, el Pt indujo una inhibición de la actividad de la ACE pulmonar que fue dependiente de la concentración utilizada ($r=0.85$, $n=30$, $p < 0.0001$, Fig. 13). Basados en esta correlación fue calculado el logaritmo de la IC50 de

Pt, que fue de -6.4235 M. De acuerdo a dicho valor de IC_{50} , en los siguientes experimentos se usó 10^{-6} M de Pt para evaluar el efecto agudo de este compuesto sobre la reactividad de las vías aéreas y la actividad del P450.

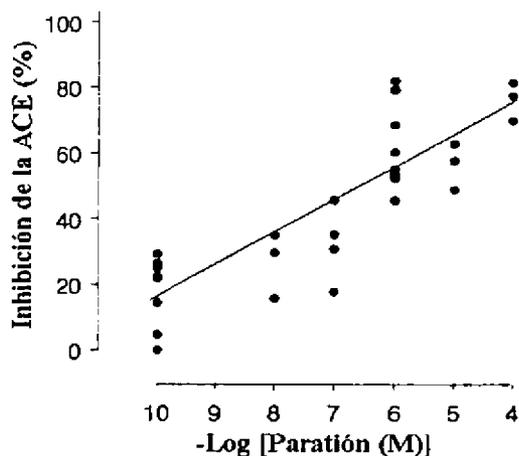


Figura 13. Correlación entre la concentración de Paratión utilizada y su efecto inhibitorio sobre la actividad de la acetilcolinesterasa (ACE) en los pulmones de conejo ($r = 0.85$, $p < 0.0001$).

Por otro lado, se observó una correlación estrecha entre la inhibición de ACE inducida por Pt y la reactividad de las vías aéreas a la ACh ($r=-0.76$, Fig. 14).

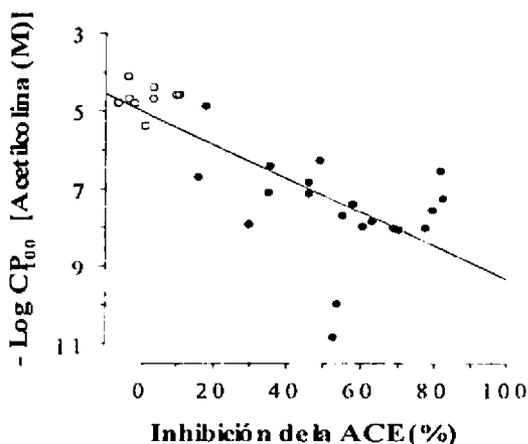


Figura 14. Correlación entre el porcentaje de inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa (ACE), inducida por diversas concentraciones de Paratión, y la reactividad de las vías aéreas a ACh ($r=-0.76$, $n=29$, $p < 0.001$). Los círculos abiertos representan los valores provenientes de los animales controles.

Efecto del Paratión sobre la mecánica respiratoria en el pulmón aislado y perfundido. El valor basal de la R_L registrada en todos los pulmones evaluados ($n=71$) fue 0.026 ± 0.001 $\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}$. En experimentos previos encontramos que en nuestra preparación de pulmón aislado y perfundido la R_L no cambia durante las primeras 3 h de duración de los experimentos [Delaunois *et al*, 1996]. En esta preparación ninguna de las concentraciones evaluadas de Pt (10^{-10} M hasta 10^{-4} M) fue capaz de modificar la R_L después de 60 min de incubación (Fig. 15).

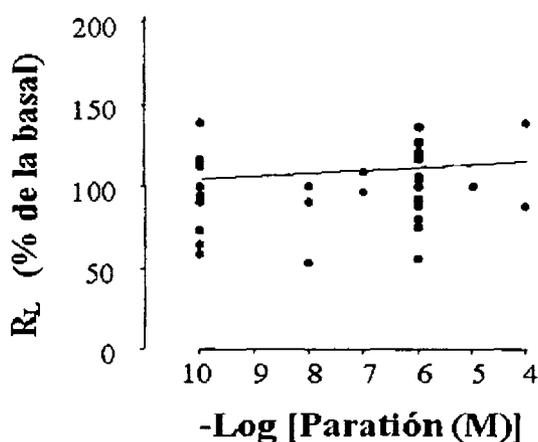


Figura 15. Efecto de la incubación con paratión (60 min) sobre la resistencia pulmonar (R_L) en la preparación de pulmón aislado y perfundido de conejo ($n=43$).

Hiperreactividad de las vías aéreas. La administración de la IC_{50} de Pt (10^{-6} M) indujo hiperreactividad de las vías aéreas a la ACh, ya que la curva concentración-respuesta se desplazó a la izquierda (Fig. 16A). El $-\log CP_{100}$ en este grupo (8.3005 ± 0.4771 , $n=8$) fue estadísticamente diferente del valor control (4.6631 ± 0.2232 , $n=9$, $p < 0.001$). De igual forma, la administración de la IC_{50} de Pt produjo un incremento en la reactividad de las vías aéreas a la histamina ($-\log CP_{100}$ 6.2347 ± 0.3314 , $n=5$ vs control 3.8422 ± 1.1396 , $n=5$, $p < 0.05$, Fig. 16B). La manifestación de dicha hiperreactividad fue bloqueada por la administración previa de atropina 10^{-5} M ($-\log CP_{100}$ 3.5940 ± 1.3610 , $n=3$, $p < 0.05$, Fig. 16B). Adicionalmente se corroboró que la concentración utilizada de atropina es incapaz de modificar la respuesta de contracción a la histamina 10^{-5} M en una preparación de músculo liso traqueal de cobayo (datos no mostrados). Las curvas concentración-respuesta a la sustancia P no fueron significativamente diferentes entre los animales controles y aquellos que recibieron la IC_{50} de

Pt ($-\log CP_{100}$ 6.8565 ± 0.1823 , $n=5$ vs 6.8523 ± 0.2235 , $n=5$, Fig. 16C).

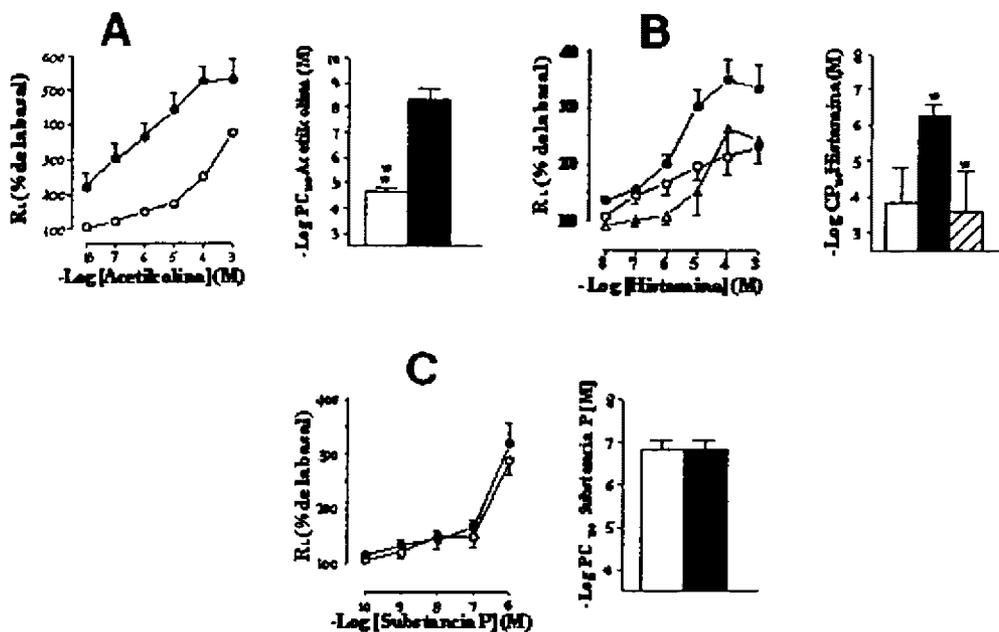


Figura 16. Efecto de la concentración inhibitoria 50% de paratón (IC_{50} , 10^{-6} M, 1 h) sobre la reactividad de las vías aéreas a la ACh (A), histamina (B) y sustancia P (C) en la preparación de pulmón aislado y perfundido de conejo. Los círculos y las barras abiertas corresponden a las preparaciones control, mientras que los círculos y las barras oscuras representan las preparaciones experimentales. En el panel B, los triángulos y la barra rayada corresponden a las preparaciones experimentales preincubadas con atropina (10^{-5} M durante 30 min antes de la administración de la IC_{50} de paratón ($n = 3$). Los símbolos representan el promedio \pm el error estándar (EE) de 5 a 9 preparaciones, exceptuando al grupo de atropina.

Efecto del pretratamiento repetitivo con dosis subtóxicas de paratión.

Efecto en la actividad del P450. Se observó una disminución significativa de dos las actividades enzimáticas dependientes del P450 (actividades de la paratión-oxidasa y de la EROD, Fig. 17A), en los pulmones provenientes de conejos pretratados durante 7 días con 1 mg/Kg. de Pt subcutáneo. Comparando con sus respectivos grupos controles, el pretratamiento con Pt inhibió un 80% la actividad de la paratión-oxidasa (1251.3 ± 160.9 , $n=10$, vs 253.6 ± 77.4 pmol-paraoxón/min/mg proteínas totales, $n=16$, $p < 0.01$, respectivamente), mientras que la actividad de la EROD fue disminuida un 73.0% (11.8 ± 2.3 , $n=10$, vs 3.2 ± 1.1 pmol-resorufin/min/mg proteínas totales, $n=5$, $p < 0.01$).

Efecto en la inhibición de la acetilcolinesterasa inducida por la IC50 de Paratión. La aplicación diaria y repetitiva de Pt no modificó por sí sola la actividad basal pulmonar de la ACE en forma significativa (0.121 ± 0.012 UI) con respecto a los animales que sólo recibieron el vehículo (0.139 ± 0.021 UI). Sin embargo, cuando fue evaluada la IC50 de Pt en estos animales, encontramos que el pretratamiento repetitivo bloqueó en forma parcial la capacidad inhibitoria del Pt sobre la actividad de ACE ($43.21 \pm 6.38\%$, $n=7$, $p < 0.05$), en comparación con los animales pretratados únicamente con el vehículo ($63.53 \pm 5.14\%$, $n=7$, Fig. 17B).

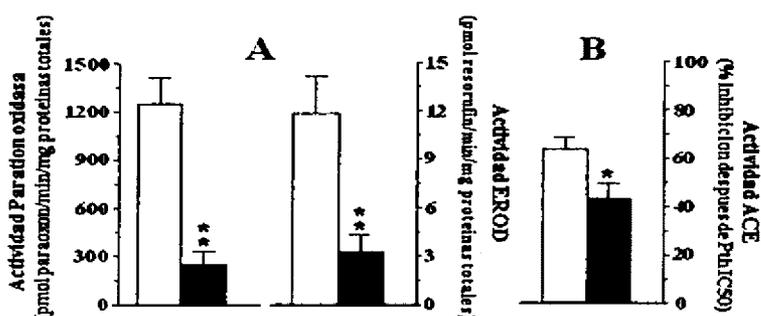


Figura 17. Efecto del pretratamiento repetitivo con dosis subtóxicas de paratión en la actividad de la paratión-oxidasa y la EROD, y (B) sobre el porcentaje de inhibición de la acetilcolinesterasa pulmonar (ACE) producida por la IC50 de paratión (10^{-6} M, 1 h). Los conejos controles recibieron únicamente el vehículo (barras abiertas, $n = 16$, 10 y 7, respectivamente) mientras que los sujetos experimentales recibieron 1 mg/Kg. de paratión, s.c. durante 7 días (barras oscuras, $n = 10$, 5 y 7, respectivamente). Todas las barras representan el promedio \pm error estándar. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$

Efecto en la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por la IC50 de Paratión. Como puede observarse en la Figura 18, la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por la IC50 de Pt ($-\log CP_{100} 8.3005 \pm 0.4767$, $n=8$) no fue modificada por el pretratamiento repetitivo con 1mg/Kg. de Pt durante 7 días ($-\log CP_{100} 8.9402 \pm 0.6148$, $n=8$)

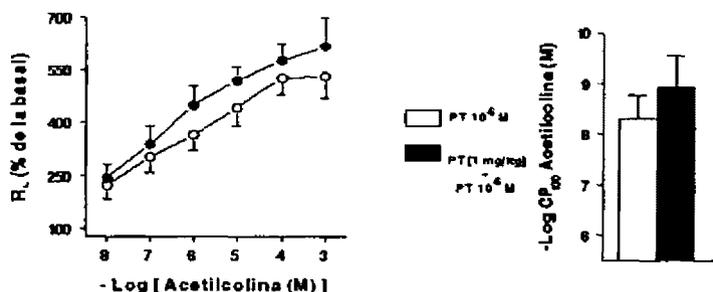


Figura 18. Efecto del pretratamiento repetitivo con dosis subtóxicas de paratión (Pt) en la hiperreactividad de las vías aéreas a ACh inducida por la IC50 de Pt (10^{-6} M, 1 h) en el pulmón aislado y perfundido de conejo. La hiperreactividad de las vías aéreas a la ACh inducida por la IC50 de Pt (círculos y barra abierta) no fue modificada, por la administración previa de Pt en los conejos (1 mg/Kg. s.c. durante 7 días, círculos y barras oscuros). Los símbolos representan el promedio + error estándar de 6 a 8 experimentos.

Diferencias sexuales en la actividad del P450 pulmonar del conejo.

Con el fin de evaluar si la actividad del P450 era diferente entre hembras y machos, los resultados obtenidos de la actividad del P450 fueron nuevamente analizados considerando el sexo del conejo. Encontramos que las hembras tienen una mayor actividad basal de EROD respecto a los animales machos ($p < 0.05$, Tabla 2) y aunque esta misma tendencia se observó para la actividad de paratión-oxidasa, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Por otro lado, en experimentos adicionales se corroboró que en ambos sexos el piperonilbutóxido tenía un potente efecto inhibitorio sobre la actividad del P450 ($p < 0.05$, Tabla 2).

TABLA 2
**ACTIVIDAD DE LA PARATION-OXIDASA Y LA EROD EN LOS MICROSOMAS
 PULMONARES DE CONEJOS HEMBRAS Y MACHOS.**

| | Actividad de la parati6n-oxidasa (pmol paraox6n/min/mg de prote6nas totales) | | Actividad de la EROD (pmol resorufin/min/ mg de prote6nas totales) | |
|---------|--|---------------------------|--|---------------------------|
| | Basal n= 5 | Piperonilbut6xido n= 3 | Basal n= 5 | Piperonilbut6xido n= 3 |
| Hembras | 1475.86 ± 234.48 | 441.38 ± 165.52 * | 13.93 ± 3.45 | 2.34 ± 0.83 * |
| Machos | 1062.07 ± 143.45 | 455.17 ± 88.28 * | 6.90 ± 1.38 † | 1.66 ± 0.33 * |

El piperonilbut6xido (500 mg/Kg. i.p.) fue administrado 30 min antes de tomar las muestras de pulm6n. Los valores representan el promedio ± el error estandar, * p < 0.05 comparandolo con su respectivo grupo basal y † p < 0.05 comparado con su respectivo grupo control femenino.

DISCUSION

En este estudio se evaluaron, a nivel bioquímico y funcional los diversos mecanismos involucrados en la toxicidad aguda sobre las vías aéreas inducida por Pt, en dos especies animales. Nuestros resultados al ser complementados con los datos preliminares mostrados en los antecedentes [Chávez 1996] nos permiten postular que el Pt genera alteraciones respiratorias agudas debido a una combinación de diversos mecanismos como son la contracción del músculo liso traqueobronquial, el incremento de la secreción de moco y el edema pulmonar. En este contexto, también se observó que dosis subtóxicas de Pt causan hiperreactividad de las vías aéreas, que los cobayos hembras son mucho más sensibles a los efectos tóxicos inducidos por el Pt, lo que podría ser atribuido a que su sistema P450 podría tener una mayor actividad basal, como fue bien demostrado en conejos hembras en el presente estudio. Finalmente se vio que la administración repetitiva de dosis bajas de Pt en conejos causa una disminución de los efectos tóxicos inducidos por el Pt a nivel bioquímico, sin embargo es insuficiente para prevenir el desarrollo de toxicidad de las vías aéreas a nivel funcional.

Mecanismos de toxicidad pulmonar aguda del Paratión

Mecánica respiratoria En condiciones *in vivo*, en cobayos evaluados mediante pletismografía de libre movimiento, la administración aguda de Pt indujo un incremento del iRl. dependiente de la dosis administrada [Chávez, 1996]. Sin embargo, en condiciones *ex vivo* en la preparación de pulmón aislado y perfundido de conejo, la administración de Pt (10^{-10} a 10^{-4} M) aún a concentraciones muy altas, no modificó la Rl. basal después de 60 min de incubación, a pesar de que con las concentraciones mayores se obtenía más de un 60% de inhibición de la ACE pulmonar. Dicha discrepancia en el efecto inducido por la intoxicación aguda de Pt en dos especies animales podría ser explicada mediante la probable existencia de diferencias de susceptibilidad del órgano blanco afectado. En apoyo a esta teoría podemos mencionar que en experimentos preliminares realizados en conejos evaluados mediante pletismografía de libre movimiento, encontramos que al administrar Pt a dosis capaces de inducir más de un 70% de inhibición de la actividad de la ACE plasmática y marcados signos de neurotoxicidad, no se modifica de manera importante el iRl. una hora después de aplicar el paratión (0.3899 ± 0.016

vs. 0.4606 ± 0.056 , $n= 4$). Esta carencia de efecto broncoobstructivo del Pt en conejos fue previamente observada en otra especie animal por Pauluhn y colaboradores [1987], quienes reportan que la administración de Pt por vía inhalada es incapaz de modificar la resistencia pulmonar basal en ratas.

Papel del Citocromo P450. Es bien conocido que los principales efectos tóxicos desencadenados por el Pt son generados por su metabolito activo, el paraoxón. La biotransformación del Pt requiere de una reacción de desulfuración realizada por el sistema enzimático P450 [Halpert *et al*, 1980; Neal, 1971]. En nuestro estudio encontramos que la inyección de piperonilbutóxido en los conejos fue capaz de inhibir potentemente la actividad del P450 al evaluar la actividad enzimática de dos de sus isoformas, la paratión-oxidasa y la EROD (Tabla 2). Estos resultados concuerdan con un estudio previo en cobayos en el que el piperonilbutóxido fue capaz de bloquear por completo la obstrucción de las vías aéreas inducidas por Pt en cobayos [Chávez, 1996], lo cual sustenta que la biotransformación del Pt en paraoxón es un paso fundamental para la expresión de los efectos tóxicos inducidos por este agente organofosforado.

Diferencias sexuales en la respuesta al Paratión. En la literatura, así como en nuestras investigaciones previas, se ha demostrado claramente que bajo condiciones *in vivo* el género del animal influye sobre la susceptibilidad del mismo a los efectos tóxicos inducidos por el Pt, ya que los cobayos hembras presentan una mayor predisposición a desarrollar broncoobstrucción que los machos [Chávez, 1996]. En este contexto, Knaak y colaboradores [1984] demuestran que en ratas la administración percutánea de Pt resulta más tóxica (induce mayor inhibición de la ACE) para las hembras que para los machos. La misma conclusión es reportada por Agarwal y colaboradores en 1982 quienes administraron el Pt por vía i.p. en ratas hembras y machos demostrando en forma clara que esta menor susceptibilidad está determinada por la presencia de hormonas sexuales masculinas (testosterona). Estos autores explicaron sus resultados sugiriendo que la testosterona favorece la degradación del plaguicida a metabolitos no tóxicos activando una vía alterna de degradación del mismo. Sin embargo, otros posibles mecanismos, como la inhibición de la actividad del P450, podrían estar involucrados. En este sentido, los resultados de esta tesis demuestran que los microsomas pulmonares provenientes de conejos

machos expresan una menor actividad basal del P450 que las hembras, al evaluar dos de sus isoformas, la paratióxi-oxidasa y la EROD. Por lo tanto, puede sugerirse que la testosterona o su metabolito, la dihidrotestosterona, podrían no solo, desviar el metabolismo del Pt a compuestos no tóxicos, como Agarwal y colaboradores lo sugieren 1982, sino que tal vez estén adicionalmente disminuyendo la actividad basal del P450 en machos, lo que en consecuencia genera una menor tasa de biotransformación del Pt en paraoxón y por tanto una menor manifestación de efectos tóxicos. En un estudio reciente se postula que el dimorfismo sexual respecto al metabolismo de drogas en ratas, es resultado de la expresión diferencial de isoformas hepáticas específicas del P450, y dicha expresión esta regulada principalmente por la hormona del crecimiento, más que por los andrógenos [Shapiro *et al.*, 1995]. Finalmente, debe mencionarse que en nuestros experimentos realizados en la preparación de pulmón aislado y perfundido de conejo no se encontraron diferencias en las respuestas funcionales y bioquímicas a la exposición al Pt de acuerdo al sexo del animal, probablemente debido a que nuestra preparación carece de influencia de las hormonas sistémicas.

Participación de la contracción del músculo liso traqueobronquial inducida por paratióxi. La participación de contracción del músculo liso durante la obstrucción de las vías aéreas inducida por Pt fue evaluada *in vivo* mediante pletismografía en cobayos. Se encontró que la administración de dosis terapéuticas de salbutamol, tanto por vía intraperitoneal como nebulizada durante la meseta de obstrucción máxima inducida por Pt, causó una reducción rápida y transitoria del iRL. Sin embargo, dicho efecto relajador fue parcial (revirtió aproximadamente un 50% la broncoobstrucción inducida por el Pt), lo que refleja la existencia de componentes resistentes al efecto del salbutamol, es decir mecanismos adicionales a la contracción del músculo liso que también contribuyen a la obstrucción de las vías aéreas inducida por el Pt. Es importante mencionar que en humanos la relajación inducida por este agonista β -adrenérgico puede prolongarse de 3-6 h, así mismo, Vargas y colaboradores en 1991[b] determinaron que durante la broncoobstrucción alérgica inducida en cobayos el efecto relajador del salbutamol se mantiene al menos 30 min. En este estudio, la naturaleza transitoria del efecto del salbutamol sugiere que algún otro mecanismo obstructivo podría estar siendo desencadenado por la presencia del salbutamol en conjunción con el Pt, lo cual rápidamente contrarresta la acción relajadora del agente broncodilatador. En este sentido, Zhang y

colaboradores [1995] recientemente estudiaron el efecto de agonistas adrenérgicos sobre la liberación de ACh en una preparación de músculo liso traqueal de caballo. Ellos concluyen que mientras la estimulación adrenérgica α_2 inhibe la liberación de ACh, la estimulación de adrenoceptores β_2 presinápticos induce liberación de ACh de las terminaciones nerviosas. Por lo tanto, es posible que la pronta reversión del efecto broncodilatador inducido por el salbutamol sea debida a la liberación de ACh mediante estimulación adrenérgica β_2 . Bajo condiciones normales esta liberación de ACh probablemente es incapaz de modificar de manera importante el efecto relajador de salbutamol; sin embargo, en presencia de un inhibidor de la ACE, como es el caso de nuestro estudio, la acumulación de ACh podría estar amplificando y promover la obstrucción de las vías aéreas. Vale la pena mencionar que este fenómeno podría presentarse en humanos, lo cual representa un serio factor de riesgo en aquellos pacientes que son tratados con drogas β -adrenérgicas, principalmente asmáticos, que estén expuestos a agentes organofosforados.

Participación de la secreción de moco en las vías aéreas. El incremento en la secreción de moco es un efecto predecible durante una intoxicación con Pt, ya que casi todas las estructuras involucradas en la secreción de moco de las vías aéreas son controladas por la inervación colinérgica [Boat y Kleinerman, 1975]. En esta investigación se encontró que el Pt induce un incremento en el contenido de monosacáridos totales presentes en los LBA, lo cual podría ser interpretado como un incremento en la producción de moco. El incremento en la secreción de moco, podría ser otro de los elementos resistentes al efecto relajador inducido por el salbutamol durante la broncoobstrucción generada por el Pt. Sin embargo, deben de realizarse experimentos adicionales a fin de corroborar la participación directa de la secreción de moco en el incremento del iR_L inducido por el Pt.

Participación de Edema. El engrosamiento de las paredes traqueobronquiales por edema podría ser otro de los mecanismos involucrados en el incremento de la obstrucción de las vías aéreas inducido por Pt. Sin embargo, Chávez en 1996 demostró que dicho mecanismo no se encuentra involucrado en la obstrucción de las vías aéreas inducidas por Pt, al menos en las vías aéreas centrales, ya que el Pt fue incapaz de generar edema en el tejido traqueal y bronquial. En

contraste, en fragmentos de pulmón se observó un incremento significativo del contenido de agua después de la administración del Pt. En este estudio por las condiciones experimentales utilizadas es imposible diferenciar si el edema fue generado en las vías aéreas periféricas o en el parénquima pulmonar. Ahora bien, tomando en cuenta que el Pt posee una bien demostrada habilidad para incrementar el coeficiente de filtración capilar pulmonar [Delaunois *et al.*, 1992a], y que en humanos la intoxicación con Pt genera edema pulmonar agudo no-cardiogénico [Kass *et al.*, 1991], es posible sugerir que en nuestro modelo experimental el parénquima pulmonar sea el principal sitio de acumulación de agua después de la intoxicación con Pt en cobayos. Recientemente Barnas y colaboradores demostraron en un modelo de edema pulmonar no cardiogénico inducido por ácido oléico en perros, que la generación de edema en el parénquima pulmonar es capaz de incrementar la resistencia de las vías aéreas [Barnas *et al.*, 1995]. Por lo anterior, el edema del parénquima pulmonar podría constituir un componente resistente a la relajación inducida por el salbutamol durante la broncostricción producida por el Pt. Sin embargo, se deben realizar experimentos posteriores para confirmar el papel del edema en esta relación causa-efecto del Pt.

Hiperreactividad de las vías aéreas. En nuestros experimentos *ex vivo* encontramos que la administración de la IC50 de Pt (10^{-6} M), aunque fue incapaz de modificar la RL basal, provocó hiperreactividad de las vías aéreas a la ACh y a la histamina. Este fenómeno demuestra que incluso dosis de Pt que no manifiestan signos clínicos de intoxicación y que no modifican la RL basal pueden volver a las vías aéreas más sensibles a ciertos autacoides o neurotransmisores. De manera similar *in vivo* se reporta que la administración aguda de 10 mg/Kg. de Pt, una dosis que no modificó el iRL basal en cobayos machos, indujo hiperreactividad de las vías aéreas a la ACh [Chávez, 1996]. Si este efecto también ocurre en los humanos, esta situación podría resultar de suma importancia en sujetos que ya de por sí tienen una mayor excitabilidad de las vías aéreas, como es el caso de los pacientes asmáticos o de pacientes con otras enfermedades como bronquitis crónica o infecciones respiratorias vírales (¡incluyendo al catarro común!) o incluso puede ocurrir en sujetos atópicos asintomáticos [Vargas *et al.*, 1991a]. En todos estos individuos, la exposición a insecticidas organofosforados como el Pt a dosis que no causan sintomatología respiratoria en sujetos sanos, podría empeorar la hiperreactividad ya presente y favorecer la aparición de crisis de broncospasmo o aumentar su gravedad

El desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas a la ACh después de la administración de Pt era un resultado hasta cierto punto previsible, ya que la inhibición de la ACE ocasionada por este insecticida debía incrementar las respuestas a la ACh, como ha sido observado utilizando otros inhibidores de la ACE [Kirkpatrick y Rooney, 1982; Murali *et al*, 1988]. Sin embargo, un resultado muy interesante fue que el Pt también causó hiperreactividad a la histamina, a pesar de que este autacoide no es metabolizado por la ACE. Aunque a primera vista esto podría sugerir que la hiperreactividad causada por el Pt es inespecífica (en el sentido de que la mayor excitabilidad del músculo liso es demostrable con múltiples mediadores, como ocurre en el asma), el hecho de que no hubo modificación de las respuestas a la SP contradice esta conclusión. Más aún, la atropina pudo bloquear completamente la hiperreactividad a la histamina, lo que demuestra que ésta última fue debida a un mecanismo colinérgico. La naturaleza de dicho mecanismo no está definida todavía. Es bien sabido que en condiciones *in vivo* la histamina induce reflejos vagales, pero en nuestro caso los reflejos vagales no podrían ser los responsables de la hiperreactividad, ya que el pulmón aislado y perfundido es una preparación denervada, por lo que debe existir una interacción local entre las vías colinérgicas e histaminérgicas. En experimentos *in vitro* diversos autores han observado participación colinérgica en la contracción del músculo liso de las vías aéreas inducida por histamina, tanto en perros [Shore *et al.*, 1983] como en cobayos [Barak *et al*, 1997]; así como también en íleo de cobayo [Rubinstein y Cohen, 1985]. En este sentido, una posible explicación del fenómeno que observamos es que la inhibición de la ACE inducida por el Pt amplifica directamente el efecto colinérgico involucrado en la respuesta a histamina, aunque esto último requiere estudios adicionales para su comprobación.

Efecto del pretratamiento repetitivo con dosis subtóxicas de paratión.

El hallazgo hecho por Halpert y colaboradores [1980] de que en condiciones *in vitro* el átomo de azufre desprendido durante el metabolismo del Pt puede provocar autoinhibición del P450, generó el interesante concepto de que la exposición crónica a dosis bajas de un insecticida organofosforado como el Pt podría originar un fenómeno “protector” ante una exposición aguda subsecuente a dosis tóxicas de este plaguicida, es decir disminuir las manifestaciones de toxicidad debido a una menor biotransformación del Pt en paraoxón. En

nuestro estudio comprobamos que a nivel bioquímico se genera una importante autoinhibición del P450 en el pulmón después de una semana de exposición a dosis bajas de Pt, y al mismo tiempo descartamos que esto mismo ocurra después de una exposición única. Más aún, esta notable autoinhibición no sólo fue para la enzima encargada del metabolismo del Pt, la paratióxi-oxidasa, sino que también se observó para otra isoenzima diferente, la EROD, lo que sugiere que el fenómeno es más bien inespecífico. Sin embargo, la intensa inhibición del P450 que observamos contrasta con la poca modificación que ocurrió sobre la inhibición de la ACE inducida por la IC50 de Pt, lo que sugiere que incluso la escasa actividad residual del P450 fue suficiente para producir la biotransformación de Pt a paraoxón y provocar una inhibición importante de la ACE. De igual forma, estos cambios bioquímicos, aunque señalan una tendencia a la disminución del daño sobre la actividad enzimática, dicho efecto "protector" no fue lo suficientemente importante para evitar las manifestaciones fisiológicas de toxicidad aguda del Pt, al menos evaluada por la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por este organofosforado.

CONCLUSIONES

En resumen, analizando nuestros resultados junto con los antecedentes observados por Chávez en 1996 podemos concluir que 1) El Pt genera broncoobstrucción *in vivo* reflejada como un incremento en el iRL. Dicho efecto es completamente dependiente de su biotransformación a paraoxón por parte del sistema enzimático P450. 2) Los cobayos hembras son mucho más susceptibles a los efectos tóxicos inducidos por el Pt que los machos, probablemente debido a que su sistema P450 podría tener una mayor actividad basal, como fue bien demostrado en este estudio en conejos hembras. 3) La contracción del músculo liso es uno de los principales mecanismos involucrados en el incremento del iRL inducido por el Pt, mientras que el edema pulmonar y el incremento en la secreción de moco podrían también estar contribuyendo en dicho efecto desencadenado por el Pt. 4) Dosis bajas de Pt inducen hiperreactividad de las vías aéreas a la ACh y la histamina, esta última debido a un mecanismo colinérgico. 5) La administración repetitiva de dosis subtóxicas de Pt durante una semana genera una importante autoinhibición de su biotransformación a paraoxón, que sin embargo es insuficiente para prevenir la manifestación funcional de los efectos tóxicos de las vías aéreas inducidas por el Pt.

REFERENCIAS

- Abbrecht PH, Kyle RR, Bryant HJ (1989) Pulmonary mechanical responses to cholinesterase inhibitor. *Fundam Appl Toxicol* 13(3):593-604
- Agarwal DK, Misra D, Agarwal S, Seth PK, Kohli JD (1982) Influence of sex hormones on parathion toxicity in rats: antiacetylcholinesterase activity of parathion and paraoxon in plasma, erythrocytes and brain. *J Toxicol Environ Health* 9(3):451-459
- Allen DL, Pollard KR, Hughes BL, Dorato MA, and Wolff RK (1995) Use of head dome system to compare i.v. methacholine-induced bronchoconstriction in conscious vs anesthetized rhesus monkeys. *J Appl Toxicol* 15(1):13-17
- Anonymous, North Dakota Pesticide Quarterly 1997; 15(1) Downloadable file at URL address: <http://www.ext.nodak.edu/extnews/pestqtrly>
- Barak N, Rubinstein R, Cohen S (1997) Histamine-evoked acetylcholine release in sensitized tracheal preparation. *Respir Physiol* 108:181-185
- Barnas GM, Sprung J, Kahn R, Delancy PA, Agarwal M (1995) Lung tissue and airway impedance during pulmonary edema in normal range of breathing. *J Appl Physiol* 78:1889-1897
- Benet LZ., Kroetz D.L., y Sheiner LB (1996). Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Hardman JG, Molinoff PB, Ruddon RW and Goodman-Gilman A (eds) 9th ed. MacMillan, New York, pp 3-29
- Boat TF, Kleinerman JL (1975) Human respiratory tract secretions. 2. Effect of cholinergic and adrenergic agents on in vitro release of protein and mucous glycoprotein. *Chest* 67(Suppl):32-34
- Burke MD, Mayer RT (1974) Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation, which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene. *Drug Metab Dispos.* 2(6):583-588
- Chávez Alderete Jaime (1996) Modificación de la función respiratoria inducida por Paratión y su relación con la permeabilidad vascular pulmonar en cobayos. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM

- Chambers HW. (1992). Organophosphorous Compounds: An overview. In: Chambers JE y Levi PE. (Eds.) *Organophosphates: Chemistry, Fate, and Effects*. Academic Press. Inc. Chapter 1, pp 3-17.
- Chand N, Nolan K, Pillar J, Lomask M, Diamantis W, Sofia RD (1993) Aeroallergen-induced dyspnea in freely moving guinea pigs: quantitative measurement by bias flow ventilated whole body plethysmograph. *Allergy* 48:230-235
- Del Valle J (1967) Las intoxicaciones por plaguicidas. Manifestaciones pulmonares, clínicas y radiológicas. *Gac. Med. Mex.* 97(4):493-501
- Delaunoy A, Gustin P, Ansay M (1992a) Altered capillary filtration coefficient in parathion- and paraoxon-induced edema in isolated and perfused rabbit lungs. *Toxicol Appl Pharmacol* 116:161-169
- Delaunoy A, Gustin P, Bloden S, Dasty J, Ansay M (1992b) Intoxication par le parathion dans une exploitation bovine. *Ann Med Vet* 136:137-138
- Delaunoy A, Gustin P, Segura P, Vargas MH, Ansay M (1996) Interactions between acetylcholine and substance P effects on lung mechanics in the rabbit. *Fund Clin Pharmacol* 10:278-288.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95
- Erickson DA, Goodrich MS, Lech JJ (1988) The effect of piperonyl butoxide on hepatic cytochrome P-450-dependent monooxygenase activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol Appl Pharmacol* 94:1-10
- Frank NR, Mead J, Ferris BG (1957) The mechanical behavior of the lung in healthy elderly. *J Clin Invest* 36:1680-1687
- Guengerich FP (1977) Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome: Activities of different forms of cytochrome P-450 towards several compounds of environmental interest. *J Biol Chem* 252(11):3970-3979
- Halpert J, Hammond D, Neal RA (1980) Inactivation of purified rat liver cytochrome P-450 during the metabolism of parathion (diethyl p-nitrophenyl phosphorothionate). *J Biol Chem* 255(3):1080-1089

- Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW (1997) Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156:766-775
- Hatch RC (1982) Poisons causing nervous stimulation or depression. In: Booth NH and McDonald LE (eds). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Ames: Iowa State University Press, Iowa, pp 976-1021
- Henoa S, Corey G (1986) *Plaguicidas Organofosforados y Carbámicos*. Metepec: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud
- Kallós P, Kallós L. Experimental asthma in guinea pigs revisited. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984; 73:77-85.
- Kass R, Kochar G, Lippman M (1991) Adult respiratory distress syndrome from organophosphate poisoning. *Am J Emerg Med* 9:32-33
- Kamatani T, Leelin MCM, Belcher DH, Neal RA (1976) Studies of the metabolism of parathion with an apparent homogeneous preparation of rabbit liver microsomal cytochrome P450. *Drug Metab. Dispos.* 4: 180-189.
- Kirkpatrick CT, Rooney PJ (1982) Contractures produced by carbamate anticholinesterases in bovine tracheal smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 9:603-611
- Knaak JB, Yee K, Ackerman CR, Zweig G, Fry DM, Wilson BW (1984) Percutaneous absorption and dermal dose-cholinesterase response studies with parathion and carbaryl in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 76(2):252-263
- Lekeux P, Kyavu A, Clercx C, Ansay M (1986) Pulmonary function changes induced by experimental dichlorvos toxicosis in calves. *Res Vet Sci* 40:318-321
- Lerman Y, Gutman H (1988) The use of respiratory stimulants in organophosphates intoxication. *Med Hypotheses* 26:267-269
- Lessire F, Gustin P, Delaunois A, Bloden S, Nemmar A, Vargas M, Ansay M (1996) Relationship between parathion and paraoxon toxicokinetics, lung metabolic activity, and cholinesterase inhibition in guinea pig and rabbit lungs. *Toxicol Appl Pharmacol* 138:201-210
- Levine R.S., and J.Doull. 1992. Global estimates of acute pesticide morbidity and mortality. *Rev Environ Contam Toxicol.* 129:29-50.

- Mayer BW, Schlackman N (1975) Organophosphates a pediatric hazard. *Am Fam Physician* 11:121-124
- Murali MP, Huang SH, Yang CM, Dwyer TM, Farley JM (1988) Contractile responses of tracheal smooth muscle in organophosphate-treated swine: 1. Agonist changes. *J Auton Pharmacol* 8:93-106
- Murray M., Buttler AM. (1995). Identification of a reversible component in the *in vitro* inhibition of rat hepatic cytochrome P450 2B1 by parathion. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 272(2): 639-644
- Mutch E., Blain PG and Williams FM (1999) The role of metabolism in determining susceptibility to parathion toxicity in man. *Toxicology Letters* 107: 177-187
- Neal RA (1971) Enzymatic mechanism of metabolism of the phosphorothionate insecticides. *Arch Intern Med* 128(1):118-124
- Neal RA (1972) A comparison of the *in vitro* metabolism of parathion in the lung and liver of the rabbit. *Toxicol Appl Pharmacol* 23:123-130
- Pauluhn J, Machemer L, Kimmerle G (1987) Effects of inhaled cholinesterase inhibitors on bronchial tonus and on plasma and erythrocyte acetylcholine esterase activity in rats. *Toxicol* 46:177-190
- Rimington C (1940) Method of determination of sugars. *J. Biochem* 34:931-933
- Rubinstein R, Cohen S (1985) Histamine-mediated acetylcholine release in the guinea-pig ileum. *Eur J Pharmacol* 111:245-250
- Shore S, Irvin CG, Shenkier T, Martin JG (1983) Mechanism of histamine-induced contraction of canine airway smooth muscle. *J Appl Physiol* 55(1):22-26
- Shapiro, BH, Agrawal AK, Pampori NA (1995) Gender differences in drug metabolism regulated by growth hormone. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27(1):9-20
- Sipes G. and Gandolfi J.: (1990). Biotransformation of Toxicants. In General Principles of Toxicology. Anders, MW (ed). Academic Press. Inc. New York.
- Sommer B, Montaña LM, Chávez J, Gustin P, Vargas MH (1998) Guinea pig lung resistance shows circadian rhythmicity not influenced by ozone. *Respir Physiol* 113:223-229
- Sultatos LG, Minor LD, Murphy SD (1985) Metabolic activation of phosphorothioate pesticides: Role of the liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232:624-628

- Taylor P (1985) Anticholinesterase agents. In: Goodman A, Goodman LS, Rall TW and Murad F (eds). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th ed. MacMillan, New York, pp 100-119
- Tsachalinas D, G. Logaras, and A. Paradelis. 1971. Observations on two hundred forty six cases of acute poisoning with parathion in Greece. *Eur J Toxicol*. 4:46-49.
- United Nations Environment Programme. Press release UNEP/24 17 March 1998. Downloadable file at URL: <http://www.un.org>
- United States Geological Survey (1992) Pesticide National Synthesis Project: 1992 Annual Use. Downloadable file at URL: <http://water.wr.usgs.gov>
- Vargas MH, Montaña LM, Selman M (1991a) Clasificación y patogénesis. In: Pacheco CR and Diaz GS (eds) Asma. UNAM, México, pp 51-108
- Vargas MH, Selman M, Campos G, Montaña LM (1991b) Role of leukotriene C4 and edema in the acute allergic bronchoconstriction in the guinea pig. *Arch Invest Med (Mex)* 22:143-149
- Vargas MH, Segura P, Campos MG, Hong E, Montaña LM (1994) Effect of ozone exposure on antigen-induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *J Toxicol Environ Health* 42:435-442
- Zhang XY, Robinson NE, Wang ZW, Lu MC (1995) Catecholamine affects acetylcholine release in trachea: α_2 -mediated inhibition and β_2 -mediated augmentation. *Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol)* 12:L368-L373