

32
2 of



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EVALUACION DE LOS EFECTOS SOBRE NIVELES ENZIMATICOS DE COLINESTERASA Y TRANSAMINASAS GLUTAMICO OXALOACETICA CUANDO SE ADMINISTRA POR VIA INTRAMUSCULAR EN BOVINOS UN PRODUCTO ORGANOFOSFORADO (coumaphos)

T E S I S

Que para obtener el título de
Médico Veterinario Zootecnista
p r e s e n t a

FRANCISCO RAUL HERNANDEZ GONZALEZ



V N A M

Asesor de tesis: Q.F.B. Ignacio Otero Icaza

FALLA DE ORIGEN

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 1989



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 está 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.

C O N T E N I D O

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2 --- 8
PATOGENIA	9 --- 8
MEDIDA DE COLINESTERASA	12 --- 13
JUSTIFICACION	13 --- 14
OBJETIVO	15
HIPOTESIS	15
MATERIAL Y METODOS	16 --- 25
RESULTADOS	26 --- 31
DISCUSION	32 --- 33
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFIA	35 --- 38

R E S U M E N

El presente trabajo se efectuó en el Laboratorio de Toxicología y Farmacología en la Sección de Clínica y Animales de Experimentación del Centro Nacional de Parasitología Animal, el cual consistió en determinar posibles alteraciones en el nivel de Colinesterasas plasmáticas, al administrar por vía intramuscular un producto organofosforado (Counaphos) y al mismo tiempo determinar el efecto sobre el funcionamiento hepático, midiendo el nivel de Transaminasa Glutámico Oxaloacética.

Se formaron dos lotes de bovinos, designando Lote "A" al grupo de bovinos adultos y Lote "B" al grupo de bovinos jóvenes (novillos) siendo un total de ocho bovinos de raza Aberdeen Angus. El producto utilizado fue el -- Counaphos, el cual se administró a razón de 2 mg/Kg de peso vivo, en dosis única a todos los bovinos.

Para las determinaciones en el laboratorio se utilizó plasma y suero de cada uno de los bovinos de los lotes experimentales, siendo los mismos su -- propio testigo, para lo cual se les tomó muestra sanguínea antes de administrar el producto.

Una vez administrado el producto, se les muestreó cada hora hasta completar doce muestreos.

Clínicamente no se observaron signos de toxicidad al usar el producto por vía intramuscular, lo que fué respaldado por los resultados de laboratorio obtenidos y que fueron analizados, usando los métodos de Espectrofotometría UV visible.

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

Con frecuencia se trabaja con una sustancia y se ignora el efecto que -- puede ser temporal o permanente en los organismos que entran en contacto, o se someten a su exposición.

Un grupo de esas sustancias son los insecticidas, que tan ampliamente se han utilizado durante muchos años por sus propiedades para matar insectos inmediatamente después del contacto.

Con la introducción del DDT, se establece un nuevo concepto de acción, -- donde los hidrocarburos clorados tienen la virtud de poder aplicarse a -- las paredes de un edificio o a la piel de un animal y matar insectos durante varias semanas después del tratamiento o aplicación (19).

La necesidad de contar con sustancias efectivas contra plagas, favorece la investigación de diversos productos químicos, pero aparte, este desarrollo se ve apremiado por otros factores importantes, que van surgiendo con el uso de los plaguicidas (19, 20). Entre los cuales destacan -- actualmente los compuestos organofosforados.

La aceptación de los compuestos organofosforados obedece a que reúnen al -- algunas características de manejo y uso que les da ventaja sobre otros como: baja toxicidad para el ganado y el hombre, fácil degradación, corta vida media y no producen acumulación progresiva (19).

Uno de los mayores daños económicos a la Industria Pecuaria en los países tropicales y sub-tropicales, se debe a la presencia de garrapatas, (7.-

15, 21).

El control de las mismas incluye el uso de productos ixodicidas, siendo los arsenicales los primeros en usarse con buenos resultados durante algunas décadas, dejándose de utilizar debido a que producían severas intoxicaciones en los animales y al desarrollo de cepas de garrapatas arsénico-resistentes (7, 15).

En la evaluación de los productos que se utilizan en la lucha contra la garrapata es de gran importancia y es necesario, encontrar los productos y concentraciones más efectivas, así como las vías de administración que proporcionen los mejores resultados; ya que es importante hacer llegar el producto en tal forma que tenga contacto efectivo contra el parásito y -- que sea en lo posible de baja toxicidad para el hospedero.

Esta lucha se ha venido realizando de dos formas:

- 1.- Fuera del hospedero por medio de: depredadores, alteraciones del medio ambiente, manejo de los pastizales, aplicación de los ixodicidas en los pastizales.
- 2.- Sobre el hospedero: introducción de razas de bovinos resistentes al parásito, repelentes, aplicación de ixodicidas en el hospedero por métodos de inmersión, aspersión, así como la administración de insecticidas sistémicos (2, 12).

Aunque los insecticidas sistémicos se han usado de manera efectiva administrándolos en el alimento, agua, sales minerales, aplicación dérmica y parenteral contra otros ectoparásitos, no se ha prestado el suficiente in

terés en lo que se refiere a la utilización de estos procedimientos para el control de garrapata (3, 20).

Actualmente en México, los compuestos que están permitidos para la lucha contra las garrapatas son los organofosforados, los que hasta ahora han podido mantener un buen control sobre las mismas. Una gran cantidad de estudios han demostrado que, los organofosforados son tóxicos tanto para los parásitos externos como para el hospedero, debido a la habilidad que tienen estos productos para interferir en el mecanismo normal de la --- transmisión del impulso nervioso, por bloqueo de la acción enzimática de la colinesterasa sobre la acetilcolina y de esta forma provocar un impulso nervioso continuo (7).

La química orgánica del fósforo se remonta a 1820, cuando Lascaigne estudió por primera vez las reacciones del alcohol con el ácido fosfórico. En 1854 Clermont prepara pirofosfato de tetraetilo (TEPP) por calentamiento de la sal de plata del ácido pirofosfórico con cloruro de etilo, aunque las poderosas propiedades insecticidas de este compuesto no fueron descubiertas hasta unos ochenta años después.

Las investigaciones formales acerca de la síntesis de compuestos organofosforados, como gases nerviosos potenciales, comenzaron durante la Segunda Guerra Mundial.

En Cambridge, Sanders y Cols. estudiaron los fluorofosfatos de alquilo, como el fluoruro tetrametilfosforodiamídico omefox, mientras que en Alemania, Schrader produjo los gases nerviosos altamente activos, Tabun y Sarin (5).

Se sabe también que, los compuestos organofosforados actúan sobre otras enzimas, tales como: quiotripsina, tripsina, esterases hepáticas, lipasa láctea y tributirinas (13, 15, 17).

La Acetilcolina es un importante neurotransmisor localizado en las terminaciones nerviosas, cuando un impulso cesa, ocurre la hidrólisis del exceso de ésta por la acción de la colinesterasa, transformando el sustrato en dos productos inactivos: colina y acetato (Fig. 1) (13,16).

La colinesterasa es una enzima que se encuentra en las terminaciones --nerviosas, pero también se encuentra dentro de la fibra nerviosa y en -- los eritrocitos (14).

Existen otras esterases en el cuerpo, capaces de hidrolizar a la acetilcolina, éstas se encuentran en el cerebro y plasma y son referidas como pseudocolinesterasas (26).

Cuando existen niveles tóxicos de un componente organofosforado, la enzima es fosforilada y resulta incapáz de llevar al cabo la reacción de transformación de la acetilcolina, causando la acumulación de ésta y -- dando por resultado un desequilibrio del Sistema Nervioso (22).

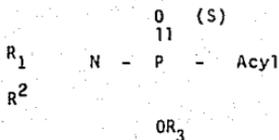
Rusel (1980), explica que la destoxificación metabólica de productos organofosforados se debe principalmente a la división del enlace fosfoéster y que el rompimiento se efectúa por la acción del agua y de diferentes fosforilasas (25).

Asimismo, hace notar que todos los compuestos organofosforados son metabolizados, pero la extensión y naturaleza del metabolismo depende de la química del compuesto y de la biología del organismo (25).

Características Generales de Productos Organofosforados.

Los derivados fosfóricos ocupan un lugar importante entre los pesticidas más conocidos. El desarrollo de esta clase de productos data de hace muchos años y fué el investigador Alemán Shrader en 1968, el primero en trabajar con ellos.

Los primeros organofosforados utilizados como pesticidas, pertenecen al tipo de ésteres sencillos del ácido fosfórico, el cual se encuentra representado de esta forma: (10).



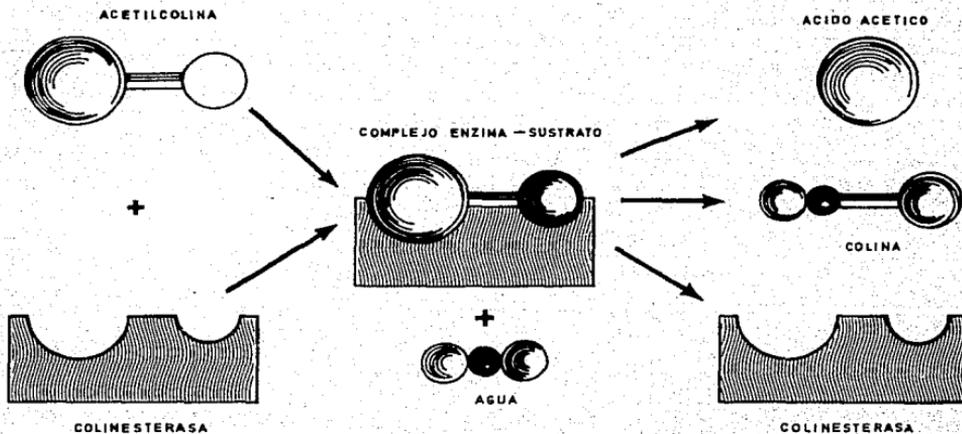
Los pesticidas organofosforados comparten estructuralmente características fundamentales, ya que todos contienen un radical fosforado (10)

En términos generales, la constitución de los derivados fosfóricos guarda relación con su comportamiento tóxico, especialmente frente a los mamíferos (10).

La toxicidad de estos pesticidas, va a depender de que en su fórmula estructural contengan forma "tiono" o la forma "oxo"; la toxicidad de la forma "tiono" (P=S), es inferior a la forma "oxo" (P=O).

Todos los organofosforados presentan una similitud en su modo de acción, ya que actúan como inhibidores de la colinesterasa de insectos y mamíferos, -- provocando un efecto tóxico por la acumulación de acetilcolina y como consecuencia, la muerte (7).

DESDOBLAMIENTO DE LA ACETILCOLINA POR LA COLINESTERASA



A este respecto, se señala que el grado de estas reacciones no dependen de los grupos salientes del organofosforado original, pero sí de los -- grupos sustituyentes que permanecen unidos al átomo de fósforo y al centro de la enzima (7).

Asimismo, Filov y Cols. (1979) indican que la estructura química está relacionada con los cambios en las propiedades físico-químicas y puede producir marcados cambios en la absorción, distribución y eliminación -- del tóxico; también determina que los efectos tóxicos sean cualitativa y cuantitativamente diferentes. Remarcan que su estructura química es la que determina sus propiedades biológicas y las acciones de los tóxicos.

Así en general, el organismo de los mamíferos intenta modificar la estructura química de los compuestos que ingresan, para que aumente su -- eliminación, llamándose a este fenómeno biotransformación, el cual involucra a las enzimas conocidas como Oxidasas de Función Mixta (MFO), las cuales están presentes en los microsomas celulares de los mamíferos. Estas oxidarán una gran variedad de compuestos extraños de origen externo. (28).

Ejemplos de procesos efectuados por las Oxidasas de Función Mixta:

- a) Hidroxilación
- b) Desalquilación
- c) Desulfuración oxidativa
- d) Deseterificación
- e) Epoxidación
- f) Oxidación de Aminas Terciarias

Absorbidos por cualquiera de las vías de administración y por cualquier órgano, mayoría de los compuestos organofosforados se excretan en orina casi por completo en forma de productos de desintegración metabólica. -

Entre el tiempo de absorción y el de excreción, transcurre un lapso de tiempo variable (28).

Los ésteres organofosforados interactúan con dos grandes grupos enzimáticos: El sistema microsomal oxidativo y las enzimas no oxidativas como son las esterasas.

La degradación de casi todos los compuestos organofosforados, ocurre primeramente por la hidrólisis y la acción de las fosfatasas. La detoxificación metabólica de estos compuestos es principalmente debida a la ---ruptura del enlace éster fosfórico que resulta en la formación de una --carga negativa en la molécula. La carga negativa, provoca que el compuesto organofosforado sea inactivo como agente fosforilante o anticolinesté---rásico, además lo hace hidrosoluble y puede ser rápidamente excretado --- (Brown W.A. 1972).

Filov y Cols. (1979) señalan que la toxicidad de un compuesto puede --calcularse a partir de su fórmula estructural, pero que esto no es sufi---ciente para asegurar el tipo de acción y la potencia de un tóxico.

R. D. Radeleff y Cols. (1953), reportan el uso de un organofosforado - el Coumaphos (21/199) en diferentes especies animales, utilizando concen---trados emulsificables, polvos humectables y formulaciones inyectables en la lucha contra las garrapatas. Estos estudios fueron iniciados en la---laboratorios de Kerville, Texas, y comprendían experimentos de toxicidad. -

usando otras vías de administración que no son de uso común para este tipo de producto químico, tales vías son: dérmica, oral, intravenosa e intramuscular (21).

El objetivo de dicho estudio fué el de conocer efectos que produce el producto a diferentes dosificaciones, el curso de la intoxicación con el mismo y el tiempo que dura ésta.

P A T O G E N I A .

Como se ha descrito, los insecticidas organofosforados inhiben la enzima que hidrolizan la acetilcolina, lo que origina una acción constante de ella sobre la fibra nerviosa, con el fin de poder explicar la signología, es conveniente hacer algunas consideraciones fisiológicas del sistema nervioso autónomo o visceral, el cual está formado por ganglios y neuronas que inervan los órganos internos, los vasos sanguíneos, músculos involuntarios y glándulas de todo el cuerpo, los impulsos van desde las vísceras por vías aferentes al sistema nervioso central, en donde son integrados y regresan por vía eferente a la víscera. La porción motora de este sistema eferente, está integrado por neuronas pre-ganglionares, las cuales hacen sinápsis en los ganglios autónomos (28).

Este sistema ha sido dividido en sistemas Simpático y Parasimpático. En el primero, los axones de las neuronas preganglionares se extienden por la médula espinal a los nervios raquídeos torácicos y lumbares, hasta la tercera o cuarta vértebra lumbar y entran en la cadena de ganglios paravertebrales y en los ganglios colaterales junto a las vísceras. La división parasimpática consta de dos porciones: la craneana y la sacra, en -

la primera los axones de las neuronas preganglionares tienen su origen en el sistema nervioso central, formando los pares craneales y hacen sinápsis con las neuronas posganglionares en ganglios específicos y llegan al órgano efector, lo mismo sucede con la porción pélvica, la cual inerva vísceras encontradas en esa zona.

La sinápsis es el espacio microscópico entre el axón de una neurona y las dendritas de otras neuronas o el órgano terminal efector, lugar en donde se libera la acetilcolina (28).

La acetilcolina actúa en todas las sinápsis de las neuronas preganglionares del sistema autónomo, en todas las terminaciones posganglionares parasimpáticas, en uniones mioneurales y en algunas terminaciones posganglionares simpáticas (28).

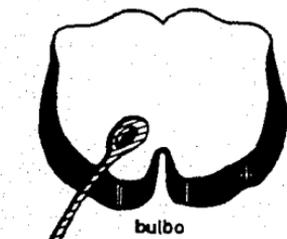
La signología de las intoxicaciones por fosforados, es entonces debida a la hiperestimulación de los órganos inervados en las condiciones anteriores, destacando de entre ellas la acción sobre el parasimpático a nivel de mucosa bronquial en la cual se produce abundante secreción y contracción de los músculos de los bronquios, efecto que conduce al colapso respiratorio (28).

SIGNOS CLINICOS DE ENVENAMIENTO POR ORGANOFOSFORADOS.

Se puede agrupar dentro de tres categorías:

- Efectos Muscarínicos
- Efectos Nicotínicos
- Efectos a nivel Sistema Nervioso Central

PARASIMPATICO



bulbo

fibra preganglionar



ganglio
parasimpático

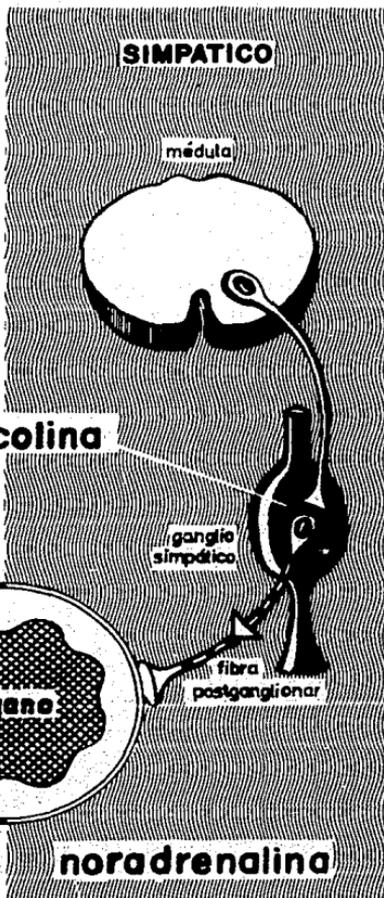
fibra
postganglionar

acetilcolina



órgano

SIMPATICO



médula

ganglio
simpático

fibra
postganglionar

noradrenalina

Efectos Muscarínicos:

Comprenden salivación profusa, hipermotilidad gastrointestinal con dolor, - calambres abdominales, vómito, diarrea, lagrimación excesiva, sudoración, - disnea, miosis, palidez, cianosis e incontinencia urinaria y anal (28).

La constricción de las pupilas o miosis es un signo característico del efecto muscarínico (28).

Efectos Nicotínicos:

Estimulación excesiva del sistema musculoesquelético, manifestado por contracciones de los músculos de la cara, frecuentemente se observa al animal - en una posición característica como caballete y al caminar lo hace en una - forma rígida (28).

La hiperactividad es seguida en ocasiones de agotamiento y parálisis del -- sistema musculoesquelético (28).

Efectos a Nivel Sistema Nervioso Central:

Varían de acuerdo a la especie animal; en perros y gatos se produce una hiperestimulación del Sistema Nervioso Central, la cual progresa hasta ataques convulsivos (28).

Usualmente la muerte ocurre por hipoxia provocada por broncoconstricción, - secreciones excesivas en el árbol bronquial (28).

Los signos clínicos del envenenamiento por insecticidas organofosforados, reflejan la complejidad de su estructura química.

Existen muchas diferencias entre el envenenamiento por Coumaphos y otros organofosforados.

El envenenamiento por Coumaphos puede presentarse inicialmente con signos -

de excesiva salivación disnea, rigidez en los movimientos y diarrea (28).

FISIOPATOLOGIA

Los cambios patológicos asociados al envenenamiento por insecticidas organo fosforados, son usualmente mínimos y no específicos (28).

Los efectos de la constante estimulación del Sistema Nervioso, son muy aparentes.

La continua secreción de las glándulas salivales, conducen a la acumulación de flujos salivales en la boca y las secreciones bronquiales en el tracto respiratorio. Puede presentarse un edema pulmonar muy extenso.

Las secreciones del tracto digestivo pueden incrementarse, resultando una - acumulación de flujos; también pueden encontrarse hemorragias difusas en - el Endocardio y Ectocardio (28).

MEDIDA DE LA COLINESTERASA

Todos los métodos comunmente usados para la determinación de la actividad - de la colinesterasa, están basados en la hidrólisis de la Acetilcolina por un éster sintético adecuado (Wills, 1972) (29).

La mayoría de los métodos utiliza el cambio que ocurre en el color cuando - la Acetilcolina o un sustrato parecido es hidrolizado.

Los métodos viejos se basan en los cambios de color colorimétricos y poten-
ciométricos.

Durante mucho tiempo el método de Michel (1949) ha sido usado, registran-
do el cambio en el pH de la muestra, siguiendo un período fijo de incuba---
ción usando pruebas estandarizadas de concentración y volumen. Por varios
años la clínica veterinaria toxicológica ha usado el método de Michel modi-
ficado para determinaciones de colinesterasa en sangre completa o suero.

El método de Michel fué desarrollado originalmente para analizar sangre - completa humana en donde aproximadamente 50% del total de la actividad de la colinesterasa se localiza en los eritrocitos y fracciones de plasma -- (18).

Trabajando con sangre de animales ha sido demostrado que la mayoría de las especies tienen la mayor actividad de colinesterasa en los glóbulos rojos, por lo tanto sangre completa debe ser analizada con el método de Michel - modificado (Radeleff and Woodward, 1956), pero para facilitar la medida, se utilizó el método que presenta la comercial Merck (27).

JUSTIFICACION DEL TRABAJO

El combate de las infestaciones por garrapatas, a través de insecticidas - sistémicos, se considera que tienen un valor práctico usando calendarios - generacionales anuales que nos permitan limitar la dinámica poblacional de la garrapata por medio del producto organofosforado que se esté utilizando.

Así el presente estudio trata de encontrar ventajas o desventajas de utilizar un método sistémico de administración para poder introducirlo en zonas semiáridas con problemas de infestación del ganado por garrapatas y en don de por consiguiente, el aprovisionamiento de agua es difícil o en aquellas zonas en donde la construcción de baños sea de costo elevado.

De igual forma pudieran eliminarse algunos factores que son desventajosos para llevar a cabo una Campaña contra la garrapata en forma eficaz, entre- los cuales se puede mencionar:

- 1.- Factor económico
- 2.- Factor cultural

Dichos factores implican:

- Costos de transporte de ganado al lugar en que se localiza el baño garrapaticida.
- Mermas en el peso y salud del ganado.

Lo que por consiguiente se traduce en que el ganadero no lleve a cabo la práctica adecuada del baño garrapaticida de su ganado.

O B J E T I V O:

Demostrar si existe daño hepático por medio de la determinación de la concentración de Transaminasa Flutámico Oxaloacética y su correlación con la concentración de colinesterasa en un lapso de 12 horas.

H I P O T E S I S:

La administración sistémica de organofosforados puede provocar un desequilibrio en los sistemas enzimáticos del organismo, como consecuencia de daño hepático.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización del presente trabajo se utilizaron 8 bovinos machos de la raza Aberdeen Angus, con los cuales se formaron 2 lotes por edades, denominándolos "A" y "B", el "A" formado por bovinos adultos y el "B", por bovinos jóvenes (novillos).

Los dos lotes fueron pesados en una báscula AMPESA, para determinar su peso y de acuerdo a éste, obtener la dosis de Coumaphos que se administraría por vía intramuscular a cada uno de los lotes formados.

Se hace notar que la administración del Coumaphos se realizó en los 8 bovinos siendo los mismos su testigo, debido a que se formó un cuadro de toma de muestra de sangre a determinados intervalos de tiempo, dentro del cual el primer muestreo corresponde al tiempo cero, que indica que no se ha administrado el Coumaphos, siendo de esta forma su propio testigo, cada bovino.

La obtención de sangre se realizó por medio de una venopunción de yugular.

La dosis calculada para los bovinos fué de 2 Mg./Kg., tomando en cuenta que la dosis tóxica por vía intramuscular, es de 5 Mg./Kg. peso vivo (21).

Esta dosis fue administrada por vía intramuscular profunda, una vez que fue tomada la muestra correspondiente al tiempo 0.

La preparación del producto fue a base de una solución que contenía Etanol, Tween 80 y agua, la cual fue preparada en el laboratorio de Toxicología del Centro Nacional de Parasitología Animal.

A S U M T O

OBSERVACIONES	BOVINOS	OVINOS	CAPRINOS	EQUINOS
Concentraciones máximas inocuas por aspersión mayores de tres meses.	0.5 %		0.25 %	0.5 %
Signos de intoxicación por vía oral.	50 mg/kg		8 mg/kg	25 mg/kg
Signos de intoxicación por vía intramuscular	5 mg/kg			
Síntomas	Salivación, disnea dejan de comer y beber. Algunos casos evidente deshidratación.	Suelen padecer diarrea.		Puede haber diarrea, signos de dolor intenso abdominal, inquietos.
Necropsia	Variables y no definitivas, hemorragias petequiales subpericárdicas congestión y edema de los pulmones.			
Antídoto	Es útil el sulfato de atropina.			
Química	No deja residuos apreciables en los tejidos.			
Presentación	Polvo humectante concentración en la presentación 50 % concentración en el baño 0.050 P.P.M.			
Dosificación	Carga inicial 1 lt./ 1000 lts. Recarga 1 kg./ 1000 lts.			
Presentación	Líquido concentración en la presentación 20 % concentración en el baño 200 P.P.M.			
Dosificación	Carga inicial 1 lt./ 1000 lts. Recarga 1 lt./ 1500 lts.			

La siguiente tabla nos muestra los lotes que se formaron, de acuerdo al peso de los bovinos utilizados en este trabajo.

<u>LOTE "A"</u>	<u>Identificación</u>	<u>Peso Kg.</u>	<u>Sexo</u>
	96 A	399	M
	6 A	407	M
	42 N	510	M
	1 R	509	M
<u>LOTE "B"</u>	88 A	124	M
	94 A	114	M
	93 A	96	M
	95 A	134	M

El muestreo de los bovinos para obtención de sangre, se realizó de acuerdo a los siguientes intervalos de tiempo.

MUESTREO Y CONTROL DE TIEMPO

<u>No. de Muestra</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Hrs.</u>	
I	t ₀	(0.0)	Toma de muestra y - aplicación intramus- cular del producto.
II	t ₁	(30')	
III	t ₂	(1)	
IV	t ₃	(2)	
V	t ₄	(3)	
VI	t ₅	(4)	
VII	t ₆	(5)	
VIII	t ₇	(6)	
IX	t ₈	(7)	
X	t ₉	(8)	
XI	t ₁₀	(12)	

A las 0 (CERO) horas, se tomó la primera muestra, que representa el control de la prueba, posterior a ésto se procedió a la administración del producto organofosforado por vía intramuscular profunda, en la región del anca. Una vez administrado el producto, los muestreos se obtuvieron de acuerdo al siguiente orden: 30 min. (post-inyección), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 horas respectivamente.

Las muestras de sangre se recolectaron en tubos de ensaye, sin anticoagulante y con anticoagulante (heparina).

Estas muestras se manejaron en el laboratorio para obtener suero y plasma respectivamente, utilizando para esto el método de Centrifugación que permite obtener las muestras de suero y plasma libres de glóbulos sanguíneos, para lo cual se utilizó una Centrifuga Beckman Mod. TJ-6, programando su trabajo a 2,500 rpm., durante 15 minutos.

Las muestras se congelaron a -4°C.

Posteriormente se procedió a efectuar las determinaciones de las concentraciones de colinesterasas, transaminasa Glutámico Oxaloacético y de Coumaphos por medio de las técnicas y equipos que a continuación se describen:

- 1.- Pruebas Cinéticas para determinación de Transaminasa Glutámico Oxaloacética Merck.
- 2.- Prueba Cinética para determinación de Colinesterasa. Merck.
- 3.- Espectrofotómetro Ultravioleta visible Beckman Modelo 34.

TRANSAMINASA GLUTAMICO OXALOACETICA

Se ha demostrado la presencia de la enzima Transaminasa Glutámico Oxaloacética en el suero, tanto en estado de salud como de enfermedad. En ciertas enfermedades como el infarto al miocardio y la necrosis hepática, el nivel de la enzima aumenta de modo significativo por lo que su determinación --- cuantitativa es un auxiliar valioso en el diagnóstico y pronóstico del estado patológico (4).

En el método de valoración de la TGO utilizado, es el propuesto por la casa Merck, en donde se descompone el Acido Pirúvico que reacciona con la -- dinitro fenil hidrazina formando el piruvato de dinitrofenilhidrazina. Con la adición de Hidróxido de Sodio, se produce un color café rojizo proporcional a la escición de la enzima.

REACTIVOS.

- 1.- Sustrato buffer (Acido aspártico y Alfacetoglutámico en solución buffer pH 7.4).
- 2.- Desarrollador de color (DPNH sol. de 2.4 Dinitrofenilhidrazina).
- 3.- Patrón de Calibración (Hidróxido de Sodio 0.4 N.).

METODO.

- 1.- Pipetear 1 ml. de sustrato buffer en un tubo de ensaye ó cubeta de - 15 ml. o más capacidad, poner en baño de agua a 37°C x 5'.
- 2.- Añadir 0.2 ml. de suero, se mezcla bien y se incuba a 37°C x 1 hora.

- 3.- Se sacan los tubos del baño y se añade 1 ml. de desarrollador de color, se mezcla bien y se deja reposar por 20 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Se añade a los tubos 10 ml. de hidróxido de sodio 0.4 N., se mezcla bien y se deja reposar 5 minutos.
- 5.- Se hace la lectura en el aparato, ajustándolo a 100 % de transmisión con un blanco de agua.

DETERMINACION DE COLINESTERASA

La Colinesterasa cataliza la hidrólisis de ésteres de colina. Como sustrato se emplea en el presente método, el yoduro de S-butirilcolina, - que es escindido muy fácilmente por la acción de la colinesterasa del plasma.

APARATOS: Espectrofotómetro Ultravioleta visible Beckman Modelo 34.

REACTIVOS: 1.- Disolvente (agua con estabilizador)

2.- Mezcla de sustrato y amortiguador

- Como indicador sirve el 5.5'ditiabis 2,Nitrobenzoato, que la Tiocolina liberada reduce a 5-mercapto 2 Nitrobenzoato de color amarillo.

T E C N I C A

- 1.- Se incuba el disolvente a 25°C.
- 2.- Se adiciona con pipeta la mezcla de sustrato y amortiguador y se agita + 0.01 ml. suero o plasma.
- 3.- Se pasa a la cubeta del fotómetro, esperar 30 a 60 segundos y medir - el tiempo en que la absorción aumenta en 0.100 unidades.

PROCESO DE EXTRACCION DE COUMAPHOS

OBJETIVO:

El objetivo de proceder a extraer el Coumaphos del plasma, obedece a que el plasma contiene elementos en suspensión que al momento de proceder a la lectura en el espectrofotómetro, observaríamos una lectura que nos daría por resultado una interpretación errónea. De tal manera, efectuando esta operación obtenemos una solución transparente, evitando así interferencias que afecten el resultado final.

PROCESO DE EXTRACCION DE COUMAPHOS
DEL PLASMA

1 ml. de plasma

5 ml. de Acetato de Etilo

Agitar 1 minuto

3 ml. alicuota

Evaporación

Redisolución en 2 ml. de Etanol

Lectura en el Espectrofotómetro UV

CURVA DE CALIBRACION (COUMAPHOS)

Para determinar la concentración del organofosforado, es necesario tener una referencia que nos permita medir dicha concentración en un fluido, que en este caso es el plasma de los bovinos expuestos a la administración del organofosforado. Así es necesario realizar una curva estándar para el -- Coumaphos de donde se parte de una cantidad conocida del mismo, que será disuelta en el plasma que servirá de apoyo para conocer la concentración de las muestras problema.

De manera que se prepara una solución que contenga 10 mcg./ml. de Coumaphos como máximo valor que se observe en la curva estándar y a partir de esta -- solución se preparan las diluciones que nos muestra la siguiente tabla:

(TABLA 1)

CURVA DE CALIBRACION DE COUMAPHOS

Pesar 1 mg. de Coumaphos

Aforar a
10 ml. con Etanol
(100 ng/ml.)

Tomar 1 ml.

Aforar a 10 ml.
con Etanol (10 ng/ml.)

Tomar 3 ml.

Añadir 3 ml. de Etanol
(5 ng/ml.)

Así sucesivamente hasta llegar a
las concentraciones deseadas.

Max. Emisión =383 nm.

Max. Excitación=325 nm.

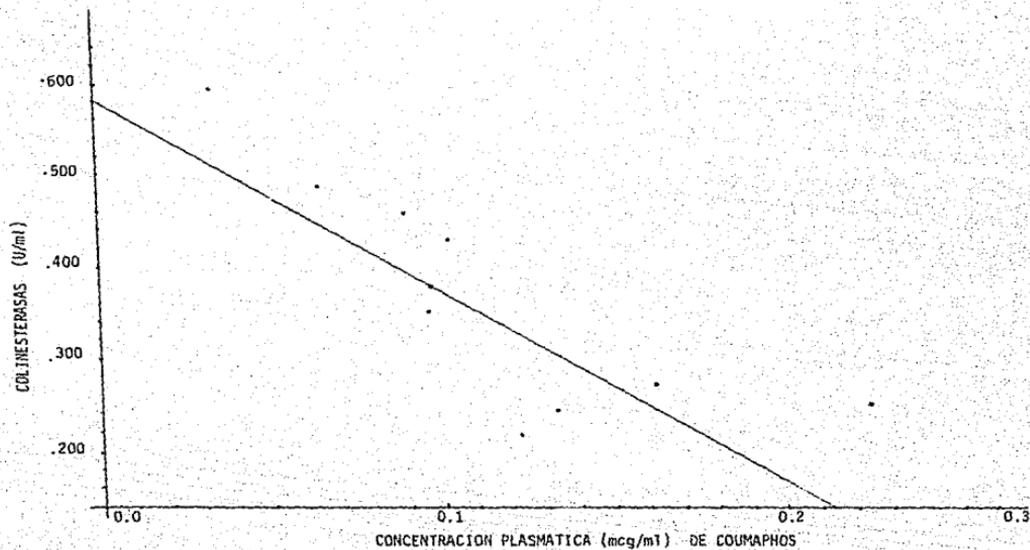
MUESTRA (ng/ml.)	UNID. DE FLUORESCENCIA
1 (10)	126
2 (5)	100
3 (2.5)	57.7
4 (1.25)	32.1
5 (0.625)	17.7
6 (0.312)	10.1
7 (0.1562)	5.9
8 (0.0781)	4.1
9 (0.0390)	3.1
10 (0.0195)	2.6

RESULTADOS

DATOS DE CONCENTRACION PLASMATICA PROMEDIO DE COUMAPHOS -
(ng/ml.) Y CONCENTRACION PLASMATICA PROMEDIO DE COLINES--
TERASAS (U/ml.) EN BOVINOS JOVENES (NOVILLOS).

Tiempo (hrs.)	Colinesterasa (U/ml.)	Coumaphos (mcg/ml.)
0.0	.525	0.0
0.5	.373	0.097
1	.277	0.228
2	.294	0.164
3	.265	0.136
4	.240	0.124
5	.451	0.102
6	.401	0.091
7	.482	0.080
8	.511	0.067
10	.575	0.057
12	.614	0.042

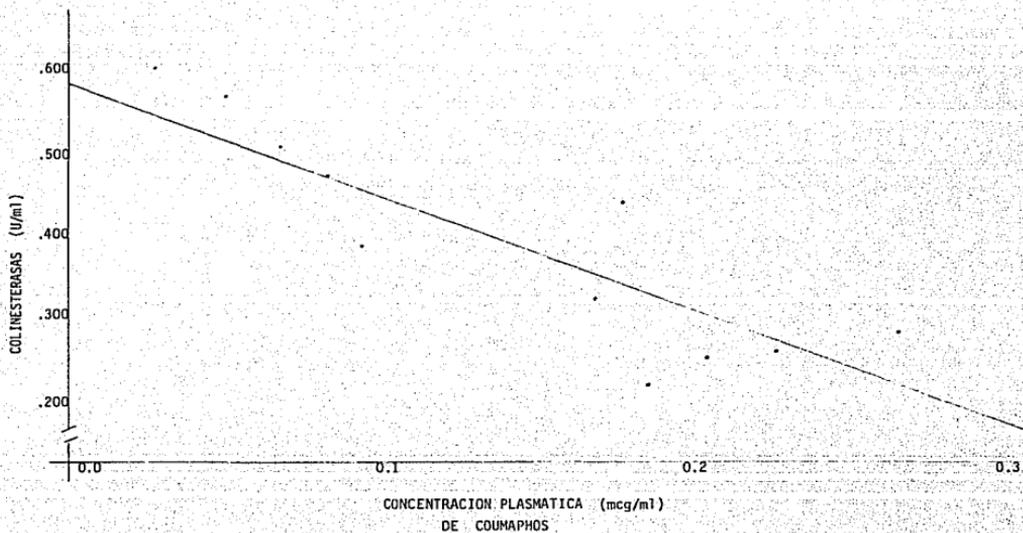
GRAFICA DE CONCENTRACION PLASMATICA PROMEDIO DE COUMAPHOS (mcg/ml) Y-
CONCENTRACION PROMEDIO DE COLINESTERASAS SANGUINEAS (U/ml) EN BOVINOS
JOVENES. (NOVILLOS).



DATOS DE CONCENTRACION PLASMATICA PROMEDIO DE COUMAPHOS
(mcg/ml) Y CONCENTRACION PLASMATICA PROMEDIO DE COLINES-
TERASAS (U/ml). (BOVINOS ADULTOS).

TIEMPO (hrs.)	COLINESTERASAS (U/ml)	COUMAPHOS (mcg/ml.)
0.0	.526	0.0
0.5	.333	0.166
1	.277	0.223
2	.292	0.264
3	.265	0.201
4	.236	0.185
5	.443	0.174
6	.397	0.092
7	.474	0.080
8	.511	0.063
10	.571	0.048
12	.606	0.024

GRAFICA DE CONCENTRACION PLASMATICA PROMEDIO DE COUMAPHOS, CONTRA CONCENTRACION PROMEDIO DE COLINESTERASAS, DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAMUSCULAR DE UNA SOLUCION DE COUMAPHOS A BOVINOS ADULTOS.

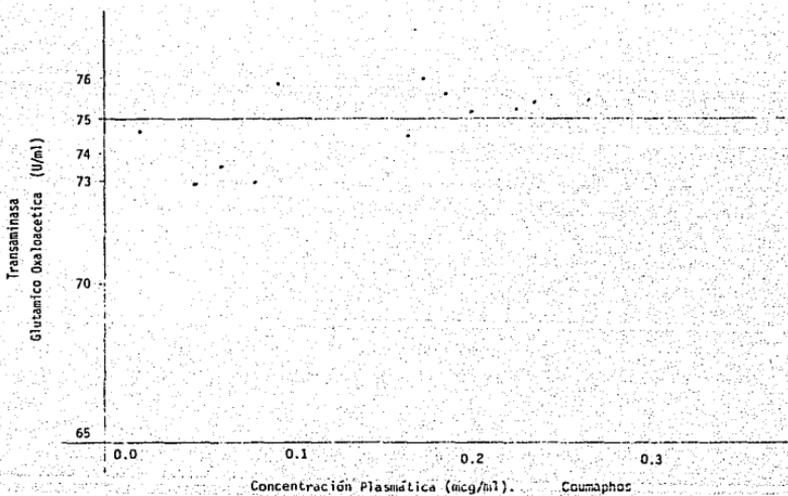


ESTA TESIS NO FUE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

DATOS DE CONCENTRACION PLASMATICA PROMEDIO DE COUMAPHOS
(mcg/ml.) Y CONCENTRACION PLASMATICA PROMEDIO DE TGO. -
(TRANSAMINASA GLUTAMICO,OXALOACETICA) (U/ml.).

TIEMPO (hrs.)	T G O (U/ml.)	COUMAPHOS (mcg/ml.)
0.0	76.27	0.0
0.5	74.54	0.166
1	75.41	0.223
2	75.57	0.264
3	75.24	0.201
4	75.82	0.185
5	76.21	0.174
6	76.11	0.092
7	73.03	0.080
8	73.56	0.063
10	73.07	0.048
12	74.58	0.024

GRAFICA DE CONCENTRACION PLASMATICA PROMEDIO DE COUMAPHOS CONTRA CONCENTRACION PROMEDIO-
DE TGO DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAMUSCULAR DE UNA SOLUCION DE COUMAPHOS A BOVINOS
ADULTOS.



DISCUSION

El análisis de los resultados que muestran las tablas de medida de concentración plasmática de Coumaphos, se observa una velocidad de absorción mayor en el lote de bovinos jóvenes en relación a los bovinos adultos, lo que probablemente se deba a un metabolismo más rápido en animales jóvenes. Se observó también que las concentraciones de Colinesterasa, fueron afectadas ligeramente, sin que se observaran signos clínicos de toxicidad a la dosis de Coumaphos empleada.

De acuerdo a lo señalado, se asume que la dosis empleada (2 mg/Kg) resultó tolerable y permitió la medida de parámetros fisiológicos que resultan de interés cuando se usa un producto organofosforado para aplicar en los animales domésticos con fines terapéuticos, y que en este caso se administró en forma experimental el Coumaphos, utilizando la vía parenteral.

Asímismo se observó que las concentraciones de Transaminasa Glutámico -- Oxaloacética, no fueron afectadas en su nivel plasmático en forma significativa, lo cual fue apoyado por los resultados obtenidos.

Cabe hacer la observación que el tiempo empleado en la prueba efectuada -- no es determinante para provocar una lesión a nivel hepático, que fuera -- demostrada por una alteración a las Transaminasa Glutámico Oxaloacético, -- sin embargo se consideró determinar su nivel plasmático para saber si -- existía correlación dosis-efecto, lo cual es negativo para efectos de experimento.

Se hace la aclaración que este trabajo es de carácter preliminar, procediéndose únicamente a registrar los efectos en las concentraciones plasmáticas de algunas enzimas de importancia para el funcionamiento nervioso y hepático, sabiendo de antemano que existen mas indicadores enzimáticos del funcionamiento de los sistemas señalados, pero que económicamente no fué posible efectuar más pruebas con otras enzimas de importancia dentro del metabolismo. En esta fase del trabajo no se encontró un efecto adverso, por lo que se puede intentar la medida de otros parámetros de importancia clínica.

La importancia de este experimento radica en que abre la posibilidad de investigar más sobre nuevas terapéuticas para el combate de garrapatas en fase parásita.

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

- 1.- De acuerdo a los resultados que se obtuvieron, se puede establecer que no existe daño hepático a la dosis empleada en este trabajo, debido a que no se reflejó en la concentración de transaminasa glutámico oxaloacética sérica, asimismo no existe correlación entre las concentraciones séricas de TGO y de colinesterasas.

- 2.- Se observó un descenso en la concentración de colinesterasas sanguíneas, debido a la administración de Coumaphos, pero no se reflejó en el comportamiento de los bovinos, que como se sabe, la acción de los organofosforados, es bloquear a la acetilcolinesterasa, así es lógico observar que al ingresar al organismo una sustancia de este tipo cause una alteración en la concentración de Colinesterasa, ya que estas enzimas son los elementos que se bloquean en sus funciones dentro del organismo.

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

- 1.- Brown, W. A. 1972: Resistencia de los artrópodos a los insecticidas 2da. Ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
- 2.- Barnet, S.F. 1961: Lucha contra las garrapatas del ganado, Estudios Agropecuarios de la FAO pp 3, 61.
- 3.- Byford, R. L. : Application of sustained release mechanism for tick and disease control Oklahoma State University --- Stillwater Ok. 74074 USDA
- 4.- Cuestiones básicas del Diagnóstico Enzimático 2da Ed. 1977 Boehringer Mannheim GmbH Diagnóstica. Rep. Federal de Alemania.
- 5.- Cremlyn.- Plaguicidas Modernos y su acción Bioquímica pp.99, 134 Ed. Limusa México.
- 6.- De la Vega 1976: Contribución al estudio de la biología de Boophilus microplus (Canestrini 1887) en Cuba. Serie Biológica 64. La Habana.
- 7.- De la Jara 1968: Efectos fisiológicos y toxicológicos de plaguicidas organofosforados en mamíferos. II Congreso Nacional de Médicos Veterinarios Zootecnistas. Guadalajara, Jal. México.

- 8.- De la Jara, F. 1980: Manual de Toxicología y tratamiento de las intoxicaciones con plaguicidas. México.
- 9.- Drummond, R., 1973 : Boophilus microplus Laboratory Test of insecticides Journal Econom Entomologic. pp. 66,130,-133.
- 10.- Eto Morifusa 1974 : Organophosphorus Pesticides Organic and Biological Chem. C R C Press Inc U.S.A.
- 11.- Filov, V.A., 1979 : Quantitative Toxicology (selected topics) -- John Wiley and sons. U.S.A. pp. 1, 48.
- 12.- González, J.C. 1974: O Controle de garrapata dos bovinos Livraria -- Sulina Editora Porto Alegre Brasil pp. 21,54.
- 13.- Goth, A., 1969 : Farmacología Médica Ed. Interamericana. México, D. F. pp. 61.
- 14.- Harper, H. A. 1975: Química Fisiológica "El Manual Moderno" pp.565 México, D. F.
- 15.- Jimeno Delso 1967 : Farmacodinámica General Ed. Paz Montalvo. Madrid España pp. 54, 56.
- 16.- Manual sobre garrapatas de la ganadería 1965. Depto. de Agricultura - de los Estados Unidos Servicios de Investigación Agrícola.
- 17.- Meyers, F. H. 1975 : Farmacología Clínica "El Manual Moderno" pp.62, 68. México.

- 18.- Michel, O. H. 1949 : An Electronic Method for the determination of reed blood and plasma cholinesterase activity Journal Lab. Clin. Med. pp. 1564, 1568.
- 19.- Oppencorth, F., 1974: Development of resistance to insecticides, in the future for insecticides; need and prospects John Wiley and Sons U.S.A.
- 20.- Radeleff, R. D. 1967: Toxicología Veterinaria. Ed. Academia pp. 147, 220.
- 21.- Radeleff, R. D. 1963: Toxicity studies of Bayer 21 199 (Coumaphos) - in livestock J A V M A 142. pp. 624, 631.
- 22.- Reitman, S., 1957 : A M J Clin Path 28 pp. 56, 63.
- 23.- Rubial de la Vega 1975: Estudio de la Biología de Boophilus microplus Informe Técnico. Investigaciones Agropecuarias La Habana.
- 24.- Roulston, W.A. 1967: Acaricide resistance in the cattle tick Boophilus from Southern Queensland Australian Vet. -- Jour 43. pp. 129, 134.
- 25.- Rusell Main, 1980 : Cholinesterase Inhibitors Introduction to Biochemical Toxicology. New Yor, U.S.A.
- 26.- Subcomité Sobre Plagas e Insectos 1968: Comité sobre plagas de plantas y animales. Consejo Nacional de Investigación Academy of Sciencies. Manejo y control de plagas. Vol. 3 Edit. Limusa.

- 27.- Weber, H. 1966 : Deutschland Med. Wschr. pp. 91, 1927
- 28.- William B. Buck 1982: Clinical and diagnostic veterinary toxicology. 2nd. ed. pp. 205, 224. Edit. Kendall Hunt Publishing Co.