

Estudio in vitro del poder inhibitor de diferentes plaguicidas organofosforados sobre la actividad acetilcolinesterasa de eritrocitos de ganado porcino y vacuno

M.C. LOPEZ, L. THOMAS, R. HERMOSO y M. MONTEOLIVA

Se analiza el poder inhibitor de una serie de plaguicidas organofosforados sobre la actividad acetilcolinesterasa de eritrocitos de ganado porcino y ganado vacuno, utilizando como técnica de medida de actividad enzimática el sistema pH-stat. Se detecta diferente poder de inhibición, dependiendo del plaguicida organofosforado ensayado o fuente enzimática utilizada, obteniéndose unos valores de I_{50} mM alrededor de 10^{-3} mM con plaguicidas tales como paration, metilparation, diazinon, azinfos, etion y malation todos ellos en estado de máxima oxidación. En términos generales se aprecia una mayor sensibilidad a los plaguicidas organofosforados ensayados del enzima de eritrocitos de ganado vacuno.

M.C. LOPEZ, L. THOMAS, R. HERMOSO y M. MONTEOLIVA. Dpto. Bioquímica. Instituto de Parasitología "López Neira". CSIC. Granada.

INTRODUCCION

Los plaguicidas organofosforados han sustituido en las últimas décadas tanto en tratamientos agrícolas como en la industria alimentaria a los organoclorados (tipo DDT), dado la alta persistencia en el medio de estos últimos. En la actualidad sin embargo han surgido numerosas intoxicaciones debidas a compuestos de estructura fosforada, hecho que ha puesto de manifiesto el efecto tóxico que poseen los plaguicidas de naturaleza organofosforada. El mecanismo de acción de los mismos, similar para insectos y mamíferos, consiste en el bloqueo e inactivación del enzima acetilcolinesterasa (O' Brian, 1960; Koelle, 1965; O' Brian, 1967), enzima que regula el paso del impulso nervioso a nivel de sinapsis, por hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (Nachmansohn, 1939; Augustinsson, 1971). El grado de inhibición necesario para bloquear la transmisión

del impulso nervioso, con un efecto letal es difícil de evaluar (Casida, 1973; Derache, 1978).

En el presente trabajo hemos examinado el efecto inhibitor de un grupo de organofosforados sobre la actividad acetilcolinesterasa de eritrocitos de ganado vacuno y porcino, usando como técnica de medida de la actividad enzimática el sistema pH-stat.

MATERIALES Y METODOS

Tras la recogida de las muestras problema, la sangre total de ambos ganados es tratada con anticoagulante heparina (10 ug/ml), previamente al recuento de los eritrocitos mediante determinación del valor hematocrito. Posteriormente se centrifuga a 200 g, 10 min, a 4° C, el plasma decantado y los eritrocitos lavados tres veces con solución salina fisiológica. Tras la última centrifugación (200 g, 10

min, 4° C) el sobrenadante es despreciado y las células hemáticas resuspendidas en el volumen de solución salina fisiológica necesario para obtener 5×10^6 eritrocitos por milímetro cúbico. Seguidamente se hemolizan por sonicación (López y col., 1983a). Un pool de lisado de eritrocitos de cincuenta animales, se utiliza como fuente enzimática para los ensayos "in vitro" de inhibición de la actividad acetilcolinesterasa.

Los plaguicidas ensayados son: metilparation, diazinon, malation, metiltrition, paration, fenclorfos, demeton-s-metil, azinfos, etiön, disyston, mevinfos, diclorvos (Polyscienc Corp.), a concentraciones que oscilan entre $10^{-2}M$ - $10^{-9}M$. Se ensayan en estado natural y tras oxidación con agua de bromo (Ramakrishna y Ramachandra, 1976), como disolvente se utiliza acetona pura. Los plaguicidas a las diferentes concentraciones en las que se ensayan se incuban a 37° C con la fuente enzimática (pool de lisado de eritrocitos, diluido 1/8 en solución salina al 0,9%), durante 45 minutos con agitación continua. Las medidas de la actividad enzimática se realizan por triplicado con control en blanco, mediante el sistema pH-stat (Nabb y Whitfield, 1967) en las condiciones descritas por López y col. 1981.

RESULTADOS

El análisis de los datos obtenidos de inhibición "in vitro" del enzima acetilcolinesterasa de eritrocitos de ganado vacuno y porcino (Tablas I, II, III y IV), evidencia un diferente comportamiento de los plaguicidas ensayados, sin una estricta correlación directa estructura-acción. Al igual se observa una distinta sensibilidad del enzima acetilcolinesterasa eritrocítica a dichos compuestos dependiendo del ganado de procedencia (vacuno o porcino). La actividad enzimática de eritrocitos de ganado porcino se muestra en términos generales menos inhibida por dichos compuestos, que la procedente de eritrocitos de ganado vacuno.

Tabla I.—Porcentaje medio de inhibición de la actividad AcChE de eritrocitos de ganado porcino por diferentes concentraciones de plaguicidas organofosforados. I_{50} mM para cada plaguicida

Plaguicida	% de Inhibición \pm SD*							I_{50} mM
	$10^{-2}M$	$10^{-3}M$	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$	$10^{-6}M$	$10^{-7}M$		
Metilparation	74 \pm 6	62 \pm 6	44 \pm 2	13 \pm 1	0	0	0	0,42
Diazinon	30 \pm 3	17 \pm 2	7 \pm 0,7	0	0	0	0	77
Malation	72 \pm 4	54 \pm 4	34 \pm 1	13 \pm 2	6 \pm 0,6	0	0	0,71
Metiltrition	70 \pm 6	54 \pm 3	37 \pm 3	23 \pm 1	9 \pm 0,3	0	0	0,67
Paration	87 \pm 2	52 \pm 3	12 \pm 1	2 \pm 0,3	0	0	0	0,92
Fenclorfos	19 \pm 2	3 \pm 0,6	0	0	0	0	0	75
Dementon-s-metil	62 \pm 4	24 \pm 2	7 \pm 0,6	0	0	0	0	7,5
Azinfos	70 \pm 4	43 \pm 3	19 \pm 1	6 \pm 0,5	0	0	0	3,2
Etiön	80 \pm 3	47 \pm 1	16 \pm 1	3 \pm 0,3	0	0	0	1,6
Di-syxtön	53 \pm 3	32 \pm 1	4 \pm 0,4	0	0	0	0	8,1

* Representa la media de 10 ensayos.

Tabla II.—Porcentaje medio de inhibición de la actividad AcChE de eritrocitos de ganado porcino por diferentes concentraciones de plaguicidas organofosforados, en estado de máxima oxidación. I_{50} mM para cada plaguicida

Plaguicida	% de Inhibición \pm SD*							I_{50} mM
	$10^{-3}M$	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$	$10^{-6}M$	$10^{-7}M$	$10^{-8}M$		
Metilparation	100	70 \pm 4	57 \pm 3	18 \pm 1	6 \pm 0,6	0	0	0,007
Diazinon	82 \pm 3	73 \pm 3	49 \pm 1	15 \pm 0,8	2 \pm 0,2	0	0	0,012
Malation	100	79 \pm 5	69 \pm 4	24 \pm 2	5 \pm 0,4	0	0	0,007
Metiltrition	53 \pm 3	36 \pm 1	17 \pm 1	5 \pm 0,6	0	0	0	0,68
Paration	100	74 \pm 4	65 \pm 3	52 \pm 3	29 \pm 1	2 \pm 0,2	0	0,0009
Fenclorfos	100	57 \pm 4	35 \pm 3	12 \pm 1	4 \pm 0,6	0	0	0,072
Dementon-s-metil	52 \pm 2	17 \pm 3	2 \pm 0,2	0	0	0	0	0,890
Azinfos	73 \pm 4	52 \pm 5	34 \pm 3	8 \pm 1	0	0	0	0,086
Etiön	71 \pm 4	66 \pm 3	42 \pm 3	13 \pm 1	0	0	0	0,036
Di-syxtön	88 \pm 3	73 \pm 5	44 \pm 5	24 \pm 2	8 \pm 1	0	0	0,036
Mevinfos**	73 \pm 2	57 \pm 2	44 \pm 1	14 \pm 1	0	0	0	0,035
Diclorvos**	87 \pm 4	62 \pm 1	42 \pm 1	20 \pm 1	13 \pm 1	0	0	0,036

* Representa la media de 10 ensayos.

** Ambos plaguicidas monofosforados se utilizan en estado natural, dado que es el de máxima oxidación.

Por otra parte se detecta, un incremento del poder de inhibición de los plaguicidas sobre la actividad acetilcolinesterasa, al ensayarlos en estado de máxima oxidación. Se obtienen porcentajes de inhibición del 6 y 3% respecto de la actividad enzimática control (ganado vacu-

Tabla III.—Porcentaje medio de inhibición de la actividad AcChE de eritrocitos de ganado vacuno por diferentes concentraciones de plaguicidas organofosforados. I₅₀mM para cada plaguicida

Plaguicida	% de Inhibición ± SD*						
	10 ⁻² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	I ₅₀ mM
Metilparation	100	70±4	59±4	33±2	12±1	0	0,067
Diazinon	21±1	17±2	3±0,3	0	0	0	90
Malation	64±2	50±2	12±1	0	0	0	1
Metiltrition	86±3	54±3	22±1	4±0,4	0	0	0,79
Paration	70±3	53±2	30±1	13±1	3±0,2	0	0,72
Fenclorfos	22±2	10±1	0	0	0	0	62
Dementon-s-metil	57±3	21±4	6±0,5	0	0	0	7,3
Azinfos	62±4	46±3	13±1	0	0	0	2,90
Etion	76±3	60±2	42±1	17±1	8±0,8	0	0,21
Di-syxtion	54±4	36±3	18±2	5±0,4	0	0	6,20

* Representa la media de 10 ensayos.

Tabla IV.—Porcentaje medio de inhibición de la actividad AcChE de eritrocitos de ganado vacuno por diferentes concentraciones de plaguicidas organofosforados, en estado de máxima oxidación. I₅₀mM para cada plaguicida

Plaguicida	% de Inhibición ± SD*						
	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M	I ₅₀ mM
Metilparation	100	87±3	79±4	42±3	13±1	3±1	0,002
Diazinon	100	75±2	60±3	25±1	3±0,2	0	0,007
Malation	100	67±5	46±4	19±2	4±0,5	0	0,031
Metiltrition	80±5	65±4	33±3	13±0,8	1±0,2	0	0,058
Paration	100	70±4	69±1	58±2	31±2	6±0,4	0,0008
Fenclorfos	100	71±5	33±3	13±1	1±0,4	0	0,053
Dementon-s-metil	60±4	36±2	14±1	4±0,4	0	0	0,610
Azinfos	100	82±6	64±1	36±2	15±1	0	0,006
Etion	85±6	67±4	60±5	44±2	13±1	0	0,004
Di-syxtion	100	74±6	41±2	14±1	6±0,7	0	0,032
Mevinfos**	70±2	67±4	46±2	19±1	10±0,5	0	0,023
Diclorvos**	74±3	68±4	47±1	22±1	10±1	0	0,021

* Representa la media de 10 ensayos.

** Ambos plaguicidas monofosforados se utilizan en estado natural, dado que es el de máxima oxidación.

no), a concentraciones de 10⁻⁵ mM de los derivados ditiofosforados, paration y metilparation respectivamente, y del 2% de inhibición de la actividad enzimática control (ganado porcino) a concentraciones 10⁻⁵ mM de paration (tablas II y IV).

Las I₅₀ mM (tablas I, II, III y IV) obtenidas para cada plaguicida por extrapolación en las gráficas constuidas para cada uno de ellos, al representar porcentajes de inhibición frente a concentración de plaguicida (gráficas no mostradas), muestran valores del orden de 10⁻³ mM para plaguicidas en estado oxidado, tales como: paration, metilparation, diazinon, azinfos y etión, frente al enzima de eritrocitos de ganado vacuno, y con los plaguicidas paration, metilparation, diazinon y malation, frente al enzima de eritrocitos de ganado porcino.

DISCUSION

El análisis de los porcentajes de inhibición “in vitro” de la actividad acetilcolinesterasa obtenidos con los diferentes plaguicidas con estructura fosforotioato, evidencian (ver resultados) una considerable mayor capacidad de inhibición enzimática de dichos compuestos al ensayarlos en su forma oxidada. Resultados similares han sido descritos para diversos organofosforados, existiendo evidencia por estudios “in vitro” e “in vivo” con algunos de estos compuestos, que los mismos sufren esta oxidación dentro del organismo humano (Koelle, 1963; Zweig, 1978), hecho que nos mostraría un proceso de “metabolización tóxico”. Por otra parte se detecta en líneas generales, que el enzima acetilcolinesterasa de eritrocitos de ganado porcino presenta una menor sensibilidad a los diferentes plaguicidas, que el enzima de ganado vacuno (ver resultados) o el enzima humano (Zweig, 1968; Carter y Maddux, 1974; Simal y col., 1976; López y col., 1983b). Una explicación para este diferente comportamiento podría estar determinada por las características específicas de la estructura terciaria de la proteína enzimática, dependiendo de su procedencia, lo cual en algún caso podría dificultar la accesibilidad o unión del plaguicida al sitio activo de la misma, y por tanto, quedar favorecida la posterior interacción del enzima con el sustrato natural acetilcolina. Al igual podría estar

motivada por la existencia de una posible acción hidrolítica del enzima (diferente según su procedencia) sobre determinados plaguicidas, como se ha descrito para algunas colinesterasas de vertebrados respecto a algunos plaguicidas fosforados (Wright y col, 1979; Reiner y col, 1980).

Es posible establecer una proporcionalidad directa entre las I_{50} mM obtenidas (ver resultados) y la DL_{50} referidas por diversos autores para estos compuestos organofosforados (Frear, 1969; Derache, 1978; Fairchild, 1978). Estos resultados implican una relación directa, inhibición enzimática-toxicidad, lo que refuerza la idea de que la determinación "in vitro"

de los niveles del enzima acetilcolinesterasa puede ser un método válido para detectar intoxicaciones por estos plaguicidas (Fernández, 1978; Widman, 1981). Está descrito que este tipo de intoxicaciones presentan una sintomatología poco específica, difícil de diagnosticar (Fernández, 1978).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Fondo de Investigaciones Sanitarias la subvención recibida para la realización del presente trabajo.

ABSTRACT

LOPEZ, M.C.; THOMAS, L.; HERMOSO, R. and MONTEOLIVA, M.: Estudio in vitro del poder inhibidor de diferentes plaguicidas organofosforados sobre la actividad acetilcolinesterasa de nitrocitos de ganado porcino y vacuno. *Bol. San. Veg. Plagas*. 13 (2): 119-123.

The degree of inhibition of acetylcholinesterase activity of cattle and pig erythrocytes by different organophosphorus pesticides was quantitatively determined by pH-stat techniques. A different percentage of inhibition was detected in relation to the pesticide assayed or to the type of enzyme assayed. It was value of I^{50} mM were obtained when 10^{-3} mM of parathion, methylparathion, diazinon, ethion and malathion were used. The acetylcholinesterase enzyme of cattle showed a more sensitivity to the pesticides assayed.

REFERENCIAS

- AUGUSTINSSON, K.B., 1971: Comparative aspect of the purification and properties of cholinesterase. *Bull. Org. Mon. Santé*, 44, 81-99.
- CARTER, M.K. and MADDAUX, D. (1974) Interaction of dichlorous and anticholinesterases on the in vitro inhibition of human blood cholinesterases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 27, 456-363.
- CASIDA, J.E., 1973: *Insecticide Biochemistry*. Toxicology information, National Institutes of Health, United States, 259-278.
- DERACHE, R., 1978: General Metabolism of Organophosphates: Organophosphorus Pesticides, 1.ª ed. Pergamon Press, Luxembourg, 19-25.
- FAIRCHILD, E.S. 1978: Agricultural chemical and pesticides: A handbook of the toxic effects. Castle House Publ., Londres.
- FERNANDEZ, J.J., 1978: Fundamentos toxicológicos de los plaguicidas. *Rev. Inst. I. Med.*, 7, 336-365.
- FREAR, D.E.H., 1969: pesticide Index, 4.ª ed. College Science Pennsylvania.
- KOELLE, G.B., 1963: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Erg'Anzungswerk XV, cholinesterases and Anticholinesterase Agents, Springer-Verlag, Berlin and New York, 498-499.
- KOELLE, G.B., 1965: The roles of acetylcholine and anticholinesterase in functional transmission: Pharmacology of Cholinergic and Adrenergic Transmission: The MacMillan Co. New York, 29-40.
- LOPEZ, M.C.; HERMOSO, R.; MONTEOLIVA, M., 1981: Acetilcolina hidrolasa (EC 3.1.1.7) y Butirilcolina hidrolasa (EC 3.1.1.8) en *Moniezia expansa* (Cestode) y *Fasciola hepatica* (Trematode). *Rev. Iber. Parasitol.*, 41(2), 251-257.
- LOPEZ, M.C.; HERMOSO, R.; MONTEOLIVA, M., 1983a: Efecto de diferentes técnicas de hemólisis sobre la actividad acetilcolinesterasa. *Ars Pharmaceutica*, 24(4), 317-322.
- LOPEZ, M.C.; HERMOSO, R.; MONTEOLIVA, M., 1983b: Estudio de las colinesterasas y su inhibición por plaguicidas fosforados mediante la técnica pH-stat. *Análisis Clínicos*, 8(31), 114-118.
- NABB, D.F. and F. WHITFIELD, 1967: Determination of cholinesterase by an automated pH-stat method. *Arch. Environmental Health*, 15, 147-154.
- NACHMANSOHN, D., 1939: Cholinesterase dans le système nerveux central. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 21, 753-761.

- O'BRIAN, R.D., 1960: Toxic phosphorus esters: Chemistry Metabolism and Biological Effects: Academic Press, New York, 434-450.
- O'BRIAN, R.D., 1967: Organophosphorus Insecticide: Action and Metabolism: Academic Press, New York, 62-79.
- RAMAKRISHNA, N. and B.V. RAMACHANDRAN, 1976: Preparation and monitoring the extent of conversion of parathion to paraoxon by bromine water. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 13, 190-191.
- REINER, E.; SIMEON, J.; SKRINJARIC-SPOLJAR, M., 1980: Hydrolysis of 0,0-dimethyl-2,2-dichlorovinylphosphate (DDVP) by esterases in parasitic helminths, and in vertebrate plasma and erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 66C, 149-152.
- SIMAL, I.; DIAZ-GONZALEZ, R.; CREUS, I.; ARIAS, A., 1976: Determinación de pesticidas anticolinesterásicos. *Medicamenta*, 47, 201-204.
- WIDMAN, F.K., 1981: Interpretación Clínica de las pruebas de laboratorio, 2.ª ed. Jims. Barcelona, 325-339.
- WRIGHT, A.S.; HUTSON, D.M.; WOODER, M.F., 1979: The chemical and biochemical reactivity of dichloroos. *Archs. Toxic.*, 42, 1-18.
- ZWEIG, G., 1968: Analytical Methods for pesticides, plant growth regulators, and food additives, Academic Press, USA, 2, 2.