

Actividad acetilcolinesterasa en plasma sanguíneo y diversas regiones del SNC de ratas intoxicadas con lindano. Efecto del pentobarbital sódico

J. Muñoz-Blanco *, B. Yusta **, M. Martínez-Luque y J. M.º González **

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de Córdoba
14005-Córdoba

(Recibido el 2 de mayo de 1984)

J. MUÑOZ-BLANCO, B. YUSTA, M. MARTINEZ-LUQUE and J. M.º GONZALEZ. *Acetylcholinesterase Activity in Blood Plasma and Several CNS Areas from Rats Intoxicated by Lindane. Effect of Sodium Pentobarbiturate*. Rev. esp. Fisiol., 41, 89-94. 1985.

The effect of acute intoxication by lindane on the AChE activity in blood plasma and in crude synaptosomal fractions from six CNS areas of rats has been studied. The effect of sodium pentobarbiturate on the convulsive syndrome caused by the above organochlorinate, is also presented. The joint administration of sodium pentobarbiturate together with lindane prevented the convulsive reaction which had been produced by lindane alone. In the animals intoxicated by lindane a general increase in the AChE activity both in plasma and in the CNS areas studied has been observed. The combination of sodium pentobarbiturate and lindane produced a decrease in the AChE activity in all the studied areas with the single exception of the spinal cord. These results are discussed bearing in mind the possible interaction between the GABAergic and cholinergic neurotransmission systems in the CNS.

Key words: Acetylcholinesterase, Blood plasma, Lindane, Pentobarbiturate, Synaptosomal fractions.

Los insecticidas organoclorados, dieldrina y, probablemente también otros insecticidas biciclodienos, así como el lindano, producen un cuadro convulsivo

caracterizado por una hiperactividad de las funciones colinérgicas centrales y periféricas, causada por un aumento de la liberación de acetilcolina desde los terminales sinápticos (18, 20). Los barbituratos han sido utilizados con frecuencia en el tratamiento de dichas convulsiones (9).

La intoxicación aguda de animales por lindano (γ -Hexaclorociclohexano) produce trastornos del comportamiento (ansie-

* A quien debe dirigirse toda la correspondencia.

** Departamento de Farmacología y Toxicología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. 14005-Córdoba.

dad, agresividad, adopción de posturas anormales) y nerviosos (hiperactividad, fasciculación, crispación), así como convulsiones tónico-clónicas, responsables directas de la muerte del animal (5, 16, 17). La neurotoxicidad de este plaguicida se ha relacionado con una liberación masiva de acetilcolina en los terminales sinápticos de las sinapsis colinérgicas (20) y, más recientemente, con los niveles encefálicos de triptófano (1) y con una disminución de los niveles centrales de ácido γ -aminobutírico (GABA) (14).

En el presente trabajo se estudian los efectos de la intoxicación aguda por lindano sobre la actividad acetilcolinesterasa (AChE) en plasma y fracciones sinápticas crudas de diferentes regiones del sistema nervioso central (SNC) de rata. Además, se estudia el efecto del pentobarbital sódico sobre las alteraciones producidas por la administración de lindano. Con ello se pretende contribuir al conocimiento de la toxicodinamia de este plaguicida y de la farmacodinamia de los barbituratos cuando se emplean como agentes terapéuticos anticonvulsivos.

Material y métodos

Se utilizaron ratas adultas Wistar, machos, de 275-300 g de peso, en grupos de seis animales.

A los animales de un primer grupo se inyectó, i.p., 1 ml de solución oleosa de lindano, de una pureza del 97 %, a dosis de 225 mg/kg de peso vivo. A los de un segundo grupo se inyectó, i.p., 1 ml de solución de pentobarbital sódico en agua bidestilada a una dosis de 30 mg/kg y, seguidamente, una dosis de lindano igual a la del primer grupo. Al grupo control se le inyectó, i.p., 1 ml de aceite de oliva.

A los 37 min de iniciado el tratamiento se les tomó una muestra de sangre y, seguidamente, fueron decapitados para extraerles el encéfalo y la porción cervical de la médula espinal. Todas estas opera-

ciones se efectuaron entre las 12 y las 13 horas.

El material obtenido se transfirió inmediatamente a una solución de sacarosa 0,32 M/Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4, a 0-4 °C, en la que se mantuvo con agitación suave. El encéfalo se disecó en telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, cerebelo y bulbo-puente.

Las muestras de tejido se utilizaron para obtener las fracciones sinápticas crudas (9) las cuales se resuspendieron en tampón fosfato 0,1 M, pH 8, usándose una alícuota para la determinación de la actividad AChE y otra para la determinación de proteína por el método de LOWRY *et al.* (12), previo tratamiento con ácido tricloroacético al 5 % a 0-4 °C.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 g durante 10 min a 0-4 °C, determinándose en el sobrenadante la actividad AChE.

La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente a 540 nm siguiendo la hidrólisis del yoduro de acetiltiocolina por el método de LAI y CLARK (11). Se define la unidad de actividad enzimática como aquella cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 μ mol de sustrato por minuto. La actividad específica se expresa en unidades por mg de proteína; en plasma los resultados se expresan en unidades por ml.

La significación estadística de las diferencias de medias fue determinada por el test de la t de Student (ensayo de dos colas).

Resultados

Los animales intoxicados con lindano presentaron, tras un periodo de latencia de 10-12 min, síntomas de hiperactividad con crisis convulsivas, presentándose la muerte en un tiempo medio de 37 ± 3 min por parálisis espástica generalizada. Los animales tratados con la asociación pentobarbital sódico-lindano no mostraron

Tabla I. Actividad AChE en fracciones sinaptosomales crudas de diferentes zonas del SNC y plasma de ratas.

1 = control; 2 = lindano; 3 = lindano y pentobarbital. La actividad AChE se expresa en mU/mg proteína. En plasma se expresa en mU/ml. Los datos se expresan como $\bar{X} \pm S$.

Zona	Tratamiento		
	1 (n = 6)	2 (n = 6)	3 (n = 6)
Médula espinal	199 ± 11	340 ± 12 ***	342 ± 11 ***
Bulbo-puente	279 ± 13	382 ± 15 ***	326 ± 16 *** **
Mesencéfalo	393 ± 23	883 ± 58 ***	498 ± 43 *** **
Cerebelo	86 ± 7	153 ± 4 ***	137 ± 5 *** **
Diencefalo	237 ± 15	655 ± 54 ***	486 ± 53 *** **
Telencéfalo	299 ± 22	594 ± 53 ***	342 ± 39 ***
Plasma sanguíneo	419 ± 18	631 ± 33 ***	484 ± 23 *** **

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, diferencias significativas de los tratamientos respecto al grupo control. ** $p < 0,001$ diferencias significativas del grupo 3 respecto al grupo 2.

los síntomas y desenlace mortal antes descritos. El porcentaje de supervivencia a los 37 min en los animales tratados con lindano fue de un 14 %. En el presente trabajo únicamente se utilizaron aquellos animales cuya supervivencia fue superior a 34 min.

En la tabla I se presentan los valores de actividad AChE observados en plasma y en fracciones sinaptosomales crudas, de los tres grupos estudiados. La administración de lindano provocó en plasma un aumento significativo del 50 % en la actividad AChE. La aplicación concurrente de pentobarbital y lindano redujo significativamente dicho incremento a valores sólo un 15 % superiores a los del grupo control.

En las fracciones sinaptosomales crudas de los animales intoxicados con lindano se observó un incremento de la actividad AChE, que osciló entre un 36,7 % en bulbo-puente y un 176,5 % en diencefalo, y que fue significativo en todos los casos respecto al grupo control. Con la única excepción de la médula

espinal, la administración de pentobarbital y lindano produjo disminuciones significativas en la actividad AChE en relación con los valores observados en el grupo tratado sólo con lindano. Estas disminuciones oscilaron entre un 10 % en cerebelo y un 43 % en mesencéfalo. Sin embargo, la actividad AChE de los animales inyectados con la asociación pentobarbital-lindano fue significativamente superior respecto a los valores observados en el grupo control.

Discusión

La intoxicación aguda de ratas por lindano produce un aumento significativo de la actividad AChE en plasma y en fracciones sinaptosomales crudas de distintas zonas del SNC. Este aumento puede deberse a una activación directa o indirecta de los sistemas de transmisión colinérgica centrales y periféricos que desencadenaría las convulsiones tónico-clónicas típicas de los animales intoxicados.

Estos aumentos apoyan el incremento observado de la liberación de acetilcolina desde los terminales sinápticos (18, 20) y el descenso de los niveles de acetilcolina (21) en animales durante las crisis convulsivas. Las variaciones de la actividad AChE en las regiones estudiadas podrían deberse a la diferente inervación colinérgica de cada área o al distinto grado de penetración del plaguicida en cada una de ellas.

Se ha indicado recientemente, en ratas intoxicadas con lindano, una disminución de los niveles encefálicos del ácido γ -aminobutírico en fracciones sinaptosomales crudas (14). El aumento de la actividad AChE podría explicarse por una falta de inhibición de sistemas colinérgicos que pudieran necesitar el concurso del sistema GABAérgico para su regulación (3, 7, 10). Esto podría manifestarse en una activación de los sistemas colinérgicos que explicaría los incrementos observados de la actividad AChE.

La intoxicación con lindano produce variaciones en los niveles encefálicos de triptófano (1) y la aplicación de otros plaguicidas organoclorados disminuye los niveles de los neurotransmisores dopamina y noradrenalina (8), lo que sugiere la posibilidad de una acción inespecífica y generalizada del lindano sobre los diferentes sistemas neurotransmisores centrales.

Los barbituratos potencian la inhibición sináptica mediada por el GABA al sensibilizar los receptores GABAérgicos (9). Por ello, la acción protectora del pentobarbital podría explicarse por un aumento de la inhibición de los sistemas colinérgicos regulados por el GABA.

Se ha encontrado sin embargo, en ratas, que la habituación a los barbituratos aumenta los niveles de acetilcolina y disminuye el número de receptores muscarínicos y nicotínicos, produciéndose el efecto inverso al desencadenar crisis convulsivas tras la suspensión del tratamiento con dichos fármacos (15). Por ello no

se descarta que los resultados obtenidos puedan interpretarse como una acción directa del pentobarbital sobre los sistemas colinérgicos. No obstante, los resultados de NORDBERG y WAHLSTROM (15) podrían explicarse en función de alteraciones del sistema GABAérgico por efecto de los barbituratos.

La acción del lindano y del pentobarbital sobre la actividad AChE en plasma puede interpretarse como reflejo de las alteraciones observadas en el SNC.

Agradecimientos

Agradecemos al Prof. J. Cárdenas-Torres la ayuda prestada en la discusión y corrección de este manuscrito.

Resumen

Se estudia el efecto de la intoxicación aguda por lindano sobre la actividad AChE en plasma sanguíneo y en fracciones sinaptosomales crudas de seis regiones del SNC de rata, así como la acción del pentobarbital sódico sobre el síndrome convulsivo provocado por el organoclorado. La administración concurrente de pentobarbital sódico y lindano evita el cuadro convulsivo provocado por éste. Se observa un aumento generalizado de la actividad AChE en las regiones estudiadas del SNC y en plasma en los animales intoxicados con lindano. La asociación pentobarbital sódico y lindano produce una disminución de dichos incrementos en todas las zonas estudiadas, con la única excepción de la médula espinal. Los resultados se discuten en base a la posible interacción entre los sistemas de transmisión GABAérgicos y colinérgicos.

Bibliografía

1. ALDEGUNDE, M., PARAPITA, M. y FERNÁNDEZ-OTERO, P.: *Rev. esp. Fisiol.*, **36**, 307-310, 1980.
2. BROWN, D. A. y CONSTANTIN, A.: *Br. J. Pharmacol.*, **63**, 217-224, 1978.
3. CHENEY, D. L. y COSTA, E.: *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **17**, 369-386, 1977.
4. CZEDLEDI-JANKO, G. y AVAR, P.: *Br. J. Ind. Med.*, **27**, 283-286, 1970.

5. DUGGAN, A. W.: En «International Review of Physiology. Neurophysiology III» (Porter, R., ed.). University Park Press. Baltimore, 1978. 17, 119-148.
6. ENNA, S. J. y MAGGI, A.: *Life Sciences*, 24, 1727-1738, 1979.
7. HASSLER, R. HANG, P. y NITSCH, C.: Problems in GABA Research. Int. Congress Series n.º 565. Hakone, Japan, 1981.
8. HEINZ, G. H., HILL, E. F. y CONTRERA, J. F.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 53, 75-82, 1980.
9. JOHNSTON, G. A. R. y WILLOW, M.: En «Advances in Biochemical Psychopharmacology» (Costa, E., Di Chiara, G. y Gesen, G. L., eds.). Raven Press, Nueva York, 1981. Vol. 16, pp. 191-198.
10. JONES, D. L., MORGENSEN, D. L. y WIS, M.: *Neuropharmacology*, 20, 1341-1345, 1981.
11. LAI, J. C. K. y CLARK, J. B.: *Biochem. J.*, 154, 423-432, 1976.
12. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
13. MATSUMODO, K. y FUKUDA, H.: *Neurosci. Lett.*, 32, 175-179, 1982.
14. MUÑOZ-BLANCO, J., CÓRDOBA, F. y GONZÁLEZ, J. M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 38, 355-358.
15. NORDBERG, A. y WAHLSTRÖM, G.: *Brain Res.*, 246, 105-112, 1982.
16. RAY, A. C., MORRIS, J. D. y RAEGOR, J. C.: *J. Am. Vet. Assoc.*, 106, 1180-1182, 1976.
17. STARR Jr., H. G. y CLIFFORD, N. J.: *Arch. Environ. Health*, 25, 374-375, 1982.
18. SHAKLAND, D. L.: *J. Ass. Offic. Agric. Chem.*, 180, 139-152, 1978.
19. SUPAVILAI, P., MANNONEN, A. y KAROBATH, M.: *Neurochem. Int.*, 4, 259-268, 1982.
20. UCHIDA, M., IRIE, I., FUJITA, T. y NAKAJIMA, M.: *Pestic. Biochem. Physiol.*, 5, 258-261, 1975.
21. WAHLSTRÖM, G. y NORDBERG, A.: *Eur. J. Pharmacol.*, 43, 237-242, 1977.

