

## Acción del Etanol y del Parathión sobre Sistemas Enzimáticos de la Rata *albinus Wistar*

E.C. VILLAAMIL \*, J.O. CARRADORI, A. RAVENNA, A.S. RIDOLFI, J.C. GARCIA FERNANDEZ y O.E. ROSES

*Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, (1113) Buenos Aires, Argentina.*

---

**RESUMEN.** A cuatro grupos de ratas *albinus Wistar* macho se les suplementó una dieta comercial estándar con sacarosa (C), etanol (E), parathión (P) y etanol más parathión (EP) durante 60 días. Se usó como control el grupo C. Al fin de la experiencia se observó una disminución en la actividad de la acetilcolinesterasa en los grupos P y EP con respecto a C ( $p < 0,05$ ) y disminución en la actividad de la colinesterasa plasmática en los grupos E, P y EP con respecto a C ( $p < 0,05$ ). La actividad de la fosfatasa alcalina estuvo aumentada en el grupo P ( $p < 0,05$ ). La vida media del etanol disminuyó en los grupos E y EP ( $p < 0,05$ ), con el correspondiente aumento de la constante de eliminación. Las concentraciones de paraoxón en sangre e hígado estuvieron disminuidas en EP respecto a P ( $p < 0,05$ ). La alanin-oxoglutarato aminotransferasa no mostró diferencias significativas entre los distintos grupos. Se presume una interacción en las vías metabólicas del parathión y del etanol.

**SUMMARY.** "Action of Ethanol and Parathion on the Enzymatic Systems of the *albinus Wistar Rat*". Four groups of male *albinus Wistar* rats were supplied with an ordinary commercial diet supplemented with sucrose (C), ethanol (E), parathion (P) and ethanol more parathion (EP) for 60 days. Group C was taken as control group. At the end of the experiment a decrease in the activity of acetylcholinesterase was observed in groups P and EP compared to C, a decreased of activity of pseudocholinesterase in groups E, P and EP respect to C ( $p < 0,05$ ). The activity of alkaline phosphatase increased in P ( $p < 0,05$ ). The half lifetime of ethanol decreased in groups E and EP ( $p < 0,05$ ), with the corresponding increase in the elimination constant. The concentrations of paraoxon in blood and in liver were lower in EP with respect to P ( $p < 0,05$ ). The difference in alanine-oxoglutarate aminotransferase activity was not significative amongst the different groups. An interaction between the metabolic pathways of parathion and ethanol is supposed.

---

### INTRODUCCION

La humanidad ha obtenido y obtiene tantos beneficios con el uso de los plaguicidas, que sería en vano enumerarlos.

Entre los plaguicidas organofosforados el parathión presenta características especiales ya que es bien conocida su acción tóxica. Este compuesto se activa en

**PALABRAS CLAVE:** Etanol; Parathión; Enzimas.

**KEY WORDS:** Ethanol; Parathion; Enzymes.

\* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

los organismos vivos a paraoxón, metabolito que resulta ser el verdadero responsable de su acción tóxica. <sup>1</sup>

Por otra parte, es ampliamente conocida la difusión y uso social de las bebidas alcohólicas tanto en nuestro país como en otros de cultura de tipo occidental. El hecho de que el etanol ingerido en forma diaria y reiterada provoque, además de otras alteraciones, fenómenos de inducción enzimática <sup>1,2</sup>, nos llevó a estudiar la interacción de éste con el parathión cuando son suministrados en forma reiterada por tiempos prolongados. A tal efecto se estudió la actividad de enzimas indicadoras de daño hepático y de otras que son inhibidas por los plaguicidas organofosforados, como son la ALAT, la FAL, la Che y la AcChe \*, en ratas sometidas durante 60 días al pesticida y al etanol, suministrados por separado y en conjunto. Con el propósito de sortear las diferencias por variaciones de calorías entre las distintas dietas, aquellas que carecían de etanol se suplementaron con sacarosa de manera de obtener un balance isocalórico en todas ellas.

Con el fin de observar probables interacciones metabólicas se midió la concentración de paraoxón y la vida media del etanol en los distintos grupos de animales al terminar la experiencia.

## **MATERIALES, DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOS**

### ***Materiales***

#### ***Animales***

Ratas *albinus Wistar* macho, de 200 a 300 g de peso mantenidas al ritmo día-noche de 12 horas y alimentadas con las dietas que se describen en "Diseño Experimental".

#### ***Instrumental***

Cromatógrafo de gases marca Varian modelo 3700 provisto de detector de captura electrónica y de ionización de llama. Columnas de vidrio de 2 m de largo y 2 mm de diámetro interno, con relleno de dos tipos: columna A para etanol (Carbowax 20M al 10% sobre Chromosorb WHP 60-80 mesh.) y columna B para plaguicidas (OV17 al 3% sobre Chromosorb WHP 80-100 mesh.)

Espectrofotómetro UV-visible marca Shimadzu modelo 210 provisto de celdas termostatazadas, caras planas, sección cuadrada de 1 cm de paso de luz.

#### ***Reactivos***

Equipo de reactivos para determinar la actividad de la AcChe, (Wiener). Método cinético color basado en la técnica de Ellman. <sup>3</sup>

Equipo de reactivos para determinar la actividad de la Che (Wiener). Método cinético color que utiliza como sustrato la butiriltiocolina. <sup>4</sup>

Equipo de reactivos para determinar la actividad de la ALAT (Wiener). Método cinético ultravioleta, basado en la técnica de Wroblewski. <sup>5</sup>

\* ALAT: alanina oxoglutarato aminotransferasa (EC.2.6.1.2.)  
FAL : ortofosfórico mono ester fosfohidratasa (EC.3.1.3.1.)  
Che : colinesterasa S o pseudocolinesterasa (EC.3.1.1.8.)  
AcChe: acetilcolinesterasa, colinesterasa E (EC.3.1.1.7.)

Equipo de reactivos para determinar la actividad de la FAL (Wiener). Método cinético color que utiliza como sustrato el *p*-nitrofenilfosfato, basado en la técnica de Bessey-Lowry. <sup>6</sup>

Elementos para determinar por cromatografía en fase gaseosa etanol y paraoxón, según una técnica empleada por nosotros en trabajos anteriores <sup>7</sup> y otra oficial de la Environmental Protection Agency de los Estados Unidos de Norte América (EPA) <sup>8</sup>, respectivamente. Se describen en métodos.

Estandares de parathión y paraoxón provistos por la EPA.

### **Diseño experimental**

El total de las ratas se dividió aleatoriamente en cuatro grupos de siete animales. A cada grupo se les suministro *ad-libitum*, durante 60 días, una de las dietas que se detallan más adelante.

La dieta sólida (comercializa en "pellets") fue pulverizada con el objetivo de permitir las mezclas con las sustancias que se mencionan al detallar los distintos grupos de animales, así como en aquellos casos en que no se efectuaron adiciones (grupo C y E) para darle presentación similar. En cada grupo se dispusieron los sólidos en recipientes de latón de 30 x 7 cm y de 3 cm de profundidad, dentro de la jaula a nivel del piso.

*Grupo control* (en adelante C): dieta de laboratorio en "pellets" (comercialmente "Dieta 3 Nutrimientos Cabeza") con un mínimo de 20% p/p de proteínas; como bebida, solución de sacarosa 41,5% (isocalórica respecto de los grupos tratados con etanol: E y EP).

*Grupo etanol* (en adelante E): dieta sólida igual a la del grupo C y como bebida sacarosa al 10% p/v en una solución de etanol en agua al 18% p/v.

*Grupo parathión* (en adelante P): dieta sólida igual a la de los grupos precedentes, pero adicionada con una solución de parathión en aceite vegetal, de tal manera que la concentración final en el alimento fuera de 15 mg/kg de peso; bebida igual a la del grupo C.

*Grupo etanol-parathión* (en adelante grupo EP): dieta sólida igual a la del grupo P; bebida igual a la del grupo E.

Con el fin de que se adaptaran a la bebida, a los animales cuya dieta incluía etanol se les suministraron soluciones crecientes de etanol durante los 10 días previos a la iniciación del tratamiento. La concentración de etanol en el agua fue del 18% en el día 10.

Se registró semanalmente el peso corporal de todos los animales hasta el fin del tratamiento.

En el día 60 de iniciado el experimento, a todos los animales se les inyectó por vía intraperitoneal etanol al 50% en solución fisiológica, a razón de 1,5 g de etanol por kg de peso. Por punción caudal se tomaron muestras de sangre a los 180, 240, 300 y 360 minutos de la inyección de etanol y se les determinó la alcoholemia. Con los datos obtenidos se calculó la vida media (en adelante  $V_m$ ) y la constante de eliminación del etanol para los distintos grupos (en adelante K). El mismo día los animales fueron sacrificados por decapitación. Se recogieron muestras de sangre e hígado para efectuar las determinaciones de las actividades enzimáticas y cuantificación de parathión y paraoxón.

### **Metodología**

#### *Determinación de Parathión y paraoxón en hígado y sangre por cromatografía en fase gaseosa*

Se usó el método de extracción descrito por la EPA <sup>8</sup>. La resolución cromatográfica se efectuó con la columna indicada en "Instrumental" como B, con detector de captura de electrones, usando nitrógeno como gas vector a un flujo de 30 ml/min y en las siguientes condiciones térmicas: inyector 240 °C, horno 190 °C y detector 250 °C.

#### *Determinación de parathión y paraoxón en hígado y sangre por cromatografía en capa fina*

Se empleó la técnica de inhibición de la colinesterasa en placa según Mc Kinley y Read. <sup>9</sup>

#### *Determinación de etanol en sangre por cromatografía en fase gaseosa*

Se efectuó por la técnica utilizada en trabajos anteriores <sup>7</sup>, que es una modificación de la técnica de Le Blanc <sup>10</sup>: se agregaron 20 µl de sangre a una mezcla desproteinizante de 0,20 ml de hidróxido de bario 3N, 0,20 ml de sulfato de zinc al 5%, 0,20 ml de una solución acuosa de n-butanol de 250 µg/l (estándar interno) y 0,38 ml de agua destilada; se agitó y se centrifugó a 5000 rpm; se separó el sobrenadante y se inyectaron en el cromatógrafo 2 µl. La resolución cromatográfica se efectuó con la columna indicada en "Instrumental" como A, con detector de ionización de llama, gas vector nitrógeno a una velocidad de flujo de 30 ml/min y en las siguientes condiciones térmicas: inyector: 170 °C, horno 105 °C y detector 220 °C.

#### *Determinaciones enzimáticas*

Se efectuaron según lo indicado en cada equipo de reactivos.

#### *Metodología estadística*

En las curvas de calibración para la valoración de etanol, parathión, paraoxón y para establecer  $V_m$  y  $K$ , se utilizó el ajuste por cuadrados mínimos. En las estimaciones de las diferencias de peso de los animales, de las actividades enzimáticas y de las concentraciones de parathión y paraoxón en sangre e hígado, se aplicó el test de Student y se consideró significativa toda diferencia con  $p < 0,05$ .

### **RESULTADOS**

El consumo medio de alimento por grupo y por día para cada uno de los grupos fue de  $135 \pm 25$  g (C);  $132 \pm 37$  g (E);  $124 \pm 33$  g (P) y  $123 \pm 38$  g (EP); mientras que el de bebida fue de  $216 \pm 25$ ,  $195 \pm 55$ ,  $209 \pm 42$ ,  $191 \pm 51$  para los mismos grupos y en el mismo orden.

La estimación del consumo de sólidos no resultó plenamente satisfactoria, ya que se vio afectada por la dispersión que de ellos producían los animales en el acto prandial.

Los resultados de la variación de peso, metabolismo del etanol, actividades enzimáticas de la AcChe, de la Che, de la ALAT, de la FAL y concentración de paraoxón en sangre e hígado se detallan en las tablas 1 a 7. La expresión "x ± s" indica el valor medio ± la desviación estandar de la población.

Grupo	Suplemento	x ± s	n
C	sacarosa	97,9 + 15,2	7
E	etanol	68,5 + 13,0	7
P	parathión	80,7 + 10,8	7
EP	etanol + parathión	63,4 + 19,4	7

**Tabla 1.** Variación de peso. Porcentaje de incremento de peso sobre el peso inicial. E, P o EP respecto de C, y P respecto de E: p < 0,05. E respecto de EP, y P respecto de EP: p > 0,05

Grupo	Suplemento	x ± s(UI/I)	% de inhibición	n
C	sacarosa	177 ± 12	0	7
E	etanol	148 ± 8	16	7
P	parathión	104 ± 7	41	7
EP	etanol + parathión	109 ± 6	38	7

**Tabla 2 .** Actividad de la colinesterasa plasmática (Che). C respecto de E , P o EP, y E respecto de P o EP: p < 0,05. EP respecto de P: p > 0,05.

Grupo	Suplemento	x ± s (UI/I)	% de inhibición	n
C	sacarosa	116 ± 4	0	7
E	etanol	101 ± 4	13	7
P	parathión	63 ± 8	46	7
EP	etanol + parathión	85 ± 13	27	7

**Tabla 3.** Actividad de la acetilcolinesterasa (AcChe). E, P o EP respecto de C , y P respecto de E: p < 0,05. EP o P respecto de E, y P respecto de EP: p > 0,05.

Grupo	Suplemento	x ± s (UI/I)	n
C	sacarosa	97 ± 19	7
E	etanol	72 ± 27	7
P	parathión	196 ± 33	7
EP	etanol + parathión	80 ± 12	7

**Tabla 4.** Actividad de la fosfatasa alcalina (FAL). P respecto de EP, C o E: p < 0,05. C respecto de EP o E y EP respecto de E: p > 0,05.

Grupo	Suplemento	x ± s (UI/I)	n
C	sacarosa	31 ± 11	7
E	etanol	34 ± 7	7
P	parathión	38 ± 11	7
EP	etanol + parathión	28 ± 6	7

**Tabla 5.** Actividad de la alanina oxoglutarato aminotransferasa (ALAT). Las relaciones entre todos los grupos indican p > 0,05

Grupo	Suplemento	Vm ± s(hs)	K ± s(1/hs)	n
C	sacarosa	4.3 ± 0.8	0.16 ± 0.02	7
E	etanol	2,2 ± 0.3	0.32 ± 0.04	7
P	parathión	4.5 ± 1.0	0.16 ± 0.03	7
EP	etanol+parathión	2.6 ± 0.4	0.27 ± 0.04	7

**Tabla 6.** Vida media y constante de eliminación del etanol. C respecto de E o EP, y P respecto de E o EP:  $p < 0,05$ . C respecto de P, y E respecto de EP:  $p > 0,05$ .

Grupo	Suplemento	Sangre (µg/kg) x ± s	Hígado (µg/kg) x ± s	n
P	parathión	1416 ± 308	1544 ± 384	7
EP	etanol + parathión	456 ± 225	584 ± 155	7

**Tabla 7.** Concentración de paraoxón en sangre e hígado. P respecto a EP en sangre e hígado :  $p < 0,05$ .

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los animales de los grupos E, P y EP tuvieron un menor incremento de peso con respecto a los animales del grupo C, utilizados como control (Tabla 1).

La actividad de la Che (Tabla 2) apareció disminuida en los grupos P, E y EP con respecto a los controles. En los grupos P y EP el resultado es el esperado, dado el aceptado mecanismo de acción tóxica del parathión<sup>1, 11-13</sup>. En el caso del grupo tratado con etanol (E) coincide con lo descrito por otros autores<sup>14</sup>. La disminución observada en el grupo EP (38% de inhibición) no es aditiva con respecto al grupo E (16% de inhibición) y al grupo P (41%).

En el caso de la AcChe (Tabla 3) se observó también inhibición de la enzima, que fue menor en el grupo EP (27%) que en el P (46%) (en ambos casos de significación estadística respecto a C). Estos datos indican una probable interacción entre el metabolismo del etanol y el del parathión, que luego discutiremos.

La actividad de la FAL (Tabla 4) se halló significativamente aumentada en el grupo P con respecto al C, al E y al EP. El aumento de la actividad de la enzima en el caso de los animales tratados con parathión está de acuerdo con lo indicado por Kim *et al.*<sup>15</sup> y por Nishimura *et al.*<sup>16</sup>. Sin embargo, cuando el plaguicida estuvo asociado con etanol (grupo EP) mantuvo una actividad cercana a la del grupo control.

Si bien la actividad de la ALAT (Tabla 5) no mostró diferencias intergrupales significativas ( $p > 0,05$ ), repitió el hecho notado en el caso de la FAL: mayor actividad en el grupo P y menor (dentro de un 10% de diferencia entre las medias) para los grupos EP, E y C.

Cabe señalar que los procesos que afectan el hepatocito disminuyen los niveles de actividad de la Che, y la AcChe e incrementan los de la FAL y la ALAT. Sus determinaciones ya se incluyen de rutina en el denominado "hepatograma", por lo que es obvio todo comentario.

La vida media del etanol (Tabla 6) disminuyó y su constante de eliminación aumentó en los grupos E y EP comparándolos con los controles y con el grupo P. En cambio no se apreciaron diferencias significativas entre los grupos cuyas dietas contenían etanol (E y EP). De aquí se desprende que el parathión no modifica la velocidad metabólica del etanol <sup>2, 7</sup>.

Los niveles de paraoxón (Tabla 7), tanto en sangre como en hígado, mostraron diferencias significativas entre los grupo P y EP y se observaron menores concentraciones en el grupo tratado con ambos tóxicos (EP).

La presencia de parathión y paraoxón fue confirmada tanto en sangre como en hígado, por cromatografía en capa fina; se confirmó la presencia de ambas sustancias en los dos tejidos y se visualizó una menor concentración en el grupo EP.

Evidentemente en este caso el paraoxón (metabolito activo del parathión) se halla en menores cantidades cuando se lo administra asociado al etanol.

La menor formación de paraoxón, ya sea debido a una inducción de esterasas <sup>18-20</sup> o a la inducción del sistema microsomal de oxidasas de función mixta <sup>17</sup> por el alcohol en forma crónica <sup>2,13,21-23</sup> explica los resultados hallados: menor efecto inhibitorio de la AcChe, recuperación de la actividad de la FAL y menores concentraciones de paraoxón en sangre e hígado en el grupo tratado simultánea y crónicamente con etanol y parathión.

**Agradecimientos.** A Virginia Cinquetti por la esmerada transcripción de los textos. A Laboratorios Wiener por la provisión de los reactivos para las determinaciones enzimáticas.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Murphy, S.D. (1986) "Toxic effects of pesticides" en "*Casarett and Doull's. Toxicology. The basic science of poisons*". (D. Klaassen, M.O. Amdur y J. Doull, eds.) 3a. ed. Mac Millan, New York, pags. 527-8
2. Cederbaum, A., S. Lieber y E. Rubin (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.* **161**: 26-39
3. Ellman, G.L., D. Courtney, V. Andres y R.M. Featherston (1961) *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88-95
4. Kutty, K.M. (1980) *Clin. Biochem.* **13/6**: 239-41
5. Wroblewski, F. y J.S. La'Due (1956) *Ann. Intern. Med.* **43**: 345-7
6. Beesey, O.A. y O.H. Lowry (1946) *J. Biol. Chem.* **164**: 321-3
7. García Fernández, J.C., A. Marchezotti, M. Gamboni y R. Aragón, R. (1978) "Aumento de la oxidación del etanol en alcohólicos crónicos con relación entre el clearance del etanol y ultraestructura hepática". Cuaderno del CENARESO, N° **32**: 1-19
8. Environmental Protection Agency (1980) "*Manual of Analytical Methods for the Analysis of Pesticides in Human and Environmental Samples*" EPA, Washington ; Sec. 6A (1) pág. 2
9. Mac Kinley, W.P. y S.I. Read (1962) *J. Ass. Off. Agr. Chem.* **45**: 467-70
10. Le Blanc, A.E. (1968) *Canad. J. Pharmacol.* **46**: 665-7
11. Du Bois, K.P. y G.H. Mangun (1947) *Proc. Soc. Med.* **64**: 137-9
12. O'Brien, R.D. (1967) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2**: 163-6
13. Cohen, S.D. y S.D. Murphy (1974) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **27**: 537-50

14. Dawson, R. y H. Crone (1975) *J. Neurochem.* **24** (2): 411-4
15. Kim, I.; K. Koo y J. Lew (1985) *Hanyang Vidal Haksulchi* **5**: 65-85
16. Nishimura, M. y E. Teschke (1982) *Biochem. Pharmacol.* **31**: (3) 377-81
17. Nakatsugawa, T. y P.A. Dham (1967) *Biochem. Pharmacol.* **16**: 25-38
18. Conney, A. (1967) *Pharmacol. Rev.* **19**: 317-66
19. Su, M., F. Kinoshma, J. Frawly y U. Dubois (1971) *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* **20**: 241-9
20. Troilo, A., E. Mata y J. Coon (1970) *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* **17**: 174-80
21. Lieber, C.S. (1980) *Pharmacol. Ther.* **46**: 1-41
22. Ptashene, K, A. Volcott y R. Neal (1971) *J. Pharmacol. and Exp. Ther.* **179**: 380-5
23. Cederbaum, A., S. Lieber y E. Rubin (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.* **165**: 560-9