
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



"ACTIVIDAD FAGOCITICA DE LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES NEUTROFILOS Y MACROFAGOS
PERITONEALES DE RATONES TRATADOS CON INSECTICIDA
METAMIDOFOS"

ROSA MARIA DAVALOS PULIDO

GUADALAJARA, JALISCO. MAYO 1990.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente

Número ...1515/89.....

SRITA. ROSA MARIA DAVALOS PULIDO
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado -
el tema de Tesis "ACTIVIDAD FAGOCITICA DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES -
NEUTROFILOS Y MACROFAGOS PERITONEALES DE RATONES TRATADOS CON INSECTICIDA
METAMIDOFOS" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptado
como Director de dicha Tesis el M.en C. Genaro Gabriel Ortiz.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., Noviembre 28 de 1989

EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOSA DE LOS MONTEROS CARDENAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. El M.en C. Genaro Gabriel Ortiz, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

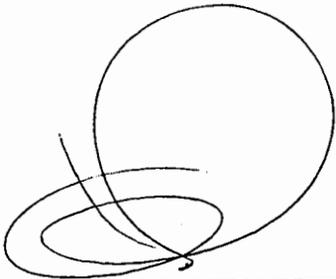
'mjsd

Guadalajara, Jal., Marzo 28 de 1990.

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Por medio de la presente, me permito manifestar a usted que una vez recibida la tesis " ACTIVIDAD FAGOCITICA DE LEUCOCITOS POLI MORFONUCLEARES NEUTROFILOS Y MACROFAGOS PERITONEALES DE RATONES TRATADOS CON INSECTICIDA METAMIDOFOS ", presentada por el pasante de la carrera de Licenciado en Biología ROSA MARIA DAVALOS - PULIDO, número de código 079364932. Y haber realizado las observaciones pertinentes, considero que se puede imprimir y solicito atentamente se realicen los trámites para el examen respectivo.

Sin otro particular, reiterándole un cordial saludo quedo de usted.



A T E N T A M E N T E

M. en C. GENARO GABRIEL ORTIZ ORTIZ.
Director de la tesis.

ESTA TESIS SE REALIZO EN EL LAB. DE MORFOLOGIA
CELULAR DE LA FAC. DE CIENCIAS Y EN EL LAB. DE
INMUNOPATOLOGIA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION
BIOMEDICA DE OCCIDENTE. I.M.S.S. BAJO LA DI
RECCION DEL M. EN C. GENARO GABRIEL ORTIZ OR
TIZ Y EL M. EN C. RODOLFO RAMOS ZEPEDA.

DEDICO ESTA TESIS A MI FAMILIA
POR EL AMOR, CONFIANZA Y APOLLO
SIEMPRE RECIBIDO.

AGRADECIMIENTOS.

A MI DIRECTOR DE TESIS M. EN C. GENARO GABRIEL ORTIZ ORTIZ POR SU ASESORIA Y APOYO BRINDADO.

AL M. EN C. RODOLFO RAMOS ZEPEDA POR SU AMISTAD, APOYO Y ENSEÑANZAS.

A LA M. EN C. BLANCA ROSA NORIEGA ORTEGA POR SU AYUDA INCONDICIONAL PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

A LA Q. F. B. MARIA ELENA RAMOS DAMIAN POR SU AYUDA Y ASESORIA.

AL DR. AMADO GONZALEZ MENDOZA JEFE DE LA DIVISION DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL DE LA U.I.B.O. POR LA OPORTUNIDAD BRINDADA.

A TODO EL PERSONAL DE LA DIVISION DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL DE LA U.I.B.O. POR SU AMISTAD RECIBIDA.

A TODOS MIS MAESTROS.

A LA FACULTAD DE CIENCIAS.

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

ACTIVIDAD FAGOCITICA DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES NEUTROFI
LOS Y MACROFAGOS PERITONEALES DE RATONES TRATADOS CON INSECTI
CIDA METAMIDOFOS.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
HIPOTESIS	11
OBJETIVO	12
MATERIAL Y METODOS	13
RESULTADOS	19
DISCUSIONES	21
CONCLUSIONES	24
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	25

INTRODUCCION.

Ante la urgente necesidad de elevar la producción y conservación de productos agrícolas empleados para la alimentación de la población mundial, se ha tenido que recurrir al uso de plaguicidas cada vez más potentes y por tanto más tóxicos. Esto ha traído como consecuencia una serie de problemas de salud, por la ingestión de productos contaminados con los tóxicos; además de la consabida contaminación ambiental por los residuos no degradados de los plaguicidas¹⁻⁴.

El consumo de productos contaminados, así como el contacto durante el manejo y aplicación de los plaguicidas, ha originado graves problemas de salud en los individuos expuestos de manera obligada o accidental a los tóxicos. Aunadas a la intoxicación por los productos químicos, se han detectado alteraciones en los mecanismos de defensa, tanto a nivel de la respuesta inmune como en la fagocitosis de los individuos expuestos a los plaguicidas. Este trabajo tuvo por objeto estudiar la respuesta de células fagocíticas (leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos peritoneales) de ratones a los que se les aplicaron dosis múltiples subletales del insecticida Metamidofos, que es uno de los plaguicidas organofosforados de mayor uso en la agricultura y en forma doméstica, en la actualidad⁵⁻⁹.

ANTECEDENTES.

La propiedad de ciertos materiales de origen vegetal de proteger al hombre del ataque de insectos y plagas se conoce desde tiempos muy antiguos. Este tipo de sustancias se comenzaron a utilizar en la agricultura a partir de 1865. El empleo de ellos redundó en el incremento de la producción y la conservación de las cosechas. Para lo cual se consideraron diversas características de los plaguicidas como son: biodegradabilidad forma de acción y plaga hacia la que se dirigen¹⁰.

Posteriormente los plaguicidas fueron separados en inorgánicos y orgánicos, de acuerdo con su estructura química. Los plaguicidas inorgánicos son principalmente derivados del arsénico. Su eficiencia es baja, son tóxicos para el hombre y su persistencia es prolongada¹¹.

El uso de plaguicidas orgánicos se incrementó a partir de 1940 tanto en la agricultura como en forma doméstica, por su efecto inmediato y su poder de controlar grandes poblaciones de insectos. Los plaguicidas orgánicos se han clasificado en: carbamatos, organoclorados, organofosforados y de origen vegetal (nicotina y piretroides entre otros)¹²⁻¹⁵.

Al igual que los plaguicidas inorgánicos, los plaguicidas orgánicos tienen efectos tóxicos tanto para el hombre como para otros animales. Asimismo su acción contaminante del medio am

biente es importante¹⁰⁻¹⁵.

La exposición del hombre a plaguicidas puede ser de forma directa e indirecta. La exposición directa sucede en forma accidental, laboral, o por mal uso de ellos. La exposición indirecta ocurre por el consumo de productos agrícolas con residuos de plaguicidas. Cuando el hombre y los animales han estado expuestos a plaguicidas pueden presentar alteraciones a diferentes niveles de su economía, como aplasia medular, trastornos histológicos y depresión de la respuesta inmune¹⁰⁻¹⁶.

La aplasia medular consiste en la destrucción de las células precursoras de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

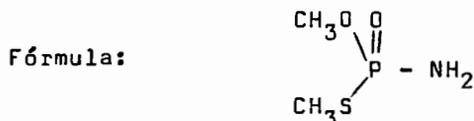
En estudios con Dimetoate (éster fosfórico), se demostró que este compuesto causa linfopenia y depresión de la respuesta inmune en ratones¹⁷. En pollos y conejos el DDT y Mirex (organo clorados) deprimen la respuesta inmune¹⁸. Toxafeno disminuye la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales¹⁹. DDT inhibe la migración de leucocitos²⁰. El Pirimicarb (carbamato) causa anemia hemolítica en perros²¹. El Carbaril en altas dosis ocasiona cambios histológicos en los órganos linfoides²². DDT y Aroclor 1254 causan daños severos en riñón y bazo²².

El Paraquat es un herbicida organoclorado (1,1,-dimetil 4, 4, ión bipyridio) se encuentra en el grupo de los plaguicidas considerados como venenos potentes. Provoca severo daño renal,

insuficiencia respiratoria y daño pulmonar. El efecto tóxico del Paraquat se atribuye a la peroxidación de la membrana de las células lípidicas, transforma el oxígeno molecular en radicales superóxido y peróxido de hidrógeno que causan daño a la membrana celular²³⁻²⁷.

Uno de los insecticidas de mayor uso en la actualidad es el Me tamidofos, que forma parte de los plaguicidas organofosforados. En este grupo se incluyen los derivados del ácido fosfórico, que tienen propiedades insecticidas y principalmente actúan como acaricidas²⁸. De ellos se conocen la mayoría de sus propiedades, pero existen pocos datos en relación con su acción sobre los mecanismos de defensa de los seres vivos¹⁷.

El nombre químico de Metamidofos es O,S-dimetil fosfoamido tioato. Peso molecular. 141.685.



Nombre Común: Metamidofos, Monitor, MTD, Bay 71628, Metamido fos Estrella, Ortho 9006, SRA 5172, Pillarón, Hamidop, Agresor Tramofos.

Propiedades Físico-químicas: Cristalino, punto de fusión 46°C, soluble en agua o etanol; menos del 1% en keroseno, menos del 10% en benceno o xileno a temperatura ambiente. Soluble en

éter.

Vías de absorción: A través de la piel, tracto respiratorio y gastrointestinal. La absorción cutánea tiende a ser lenta, aumenta en temperaturas elevadas y es mayor en presencia de dermatitis.

Aplicaciones: Se utiliza para el control de ciertas larvas de lepidópteros, gorgojos y mosquita blanca²⁹.

Acción Farmacológica: Inhibidor irreversible de acetilcolinesterasa (acumulación de acetilcolina).

Toxicidad: Dosis letal media (DL₅₀) por aplicación dérmica en rata 118 mg/Kg. Dosis letal media (DL₅₀) aplicada por vía oral es de 19-21 mg/Kg de peso en rata. La intoxicación se manifiesta por dolor de cabeza, pérdida del control de esfínteres y coma entre otros síntomas.

Tratamiento: En caso de intoxicación administrar sulfato de atropina, oximas (2-aldoxima-metil-piridio), o el toxogonin, y respiración oral cuando se requiera³⁰.

Asimismo diversos agentes tóxicos entre los que se encuentran los insecticidas afectan los mecanismos de protección de los seres vivos. Cuya integridad es indispensable para la superviuvencia, puesto que aún los seres unicelulares, están expuestos

al ataque de agentes agresores de diversa naturaleza. La con
servación de las especies depende de su capacidad para manten
er una defensa continua y efectiva en contra de las agresion
es³¹.

Los animales vertebrados poseen mecanismos de protección espe
cíficos e inespecíficos contra cualquier agente extraño (bacter
ias, hongos, partículas inertes o materiales de desecho pro
pios)³².

Los mecanismos específicos de defensa incluyen la respuesta in
mune humoral y celular. Las células mediadoras son los linfo
citos B y los T, los cuales tienen origen común, a partir de
una célula estaminal hematopoyética en la médula ósea, sitio
en el que maduran y pasan a la circulación sanguínea y poster
iormente llegan a diferentes órganos linfoides como el timo,
ganglios linfáticos, placas de Peyer y bazo³³⁻³⁴.

Los linfocitos T adquieren su capacitación o diferenciación en
el timo y son los efectores de la inmunidad celular. En cambio
los linfocitos B, que son responsables de la inmunidad humoral
en las aves reciben su capacitación en la Bolsa de Fabricio.
El equivalente de este órgano en los mamíferos, incluyendo al
humano, no se conoce, pero se ha sugerido que la capacitación
de los linfocitos B ocurre en la médula ósea. Los sustratos
químicos mediadores de la respuesta inmune humoral son conoci

dos como inmunoglobulinas G, A, M, D y E. De estas se han ca
racterizado algunas subclases, particularmente de la inmunoglo
bulina G (IgG) de la cual existen cuatro variantes IgG1, IgG2,
IgG3 e IgG4, cuyas diferencias radican en sus características
químicas y biológicas³⁵.

Entre los mecanismos inespecíficos se encuentran las barreras
tegumentarias (piel, mucosas), la fagocitosis, el sistema del
complemento y el interferón³⁵⁻³⁶.

Las células efectoras de la actividad fagocítica son los leuco
citos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y macrófagos, los
cuales ingieren y destruyen bacterias, hongos, células tumora
les y además liberan sustancias con diversas actividades bioló
gicas³⁴⁻³⁶.

La fagocitosis es la ingestión de partículas inertes o microor
ganismos por los PMN y macrófagos. El proceso de fagocitosis
se acompaña de elevación de consumo de O₂, glucosa, producción
de ácido láctico, generación de peróxido de hidrógeno, de com
puestos halogenados y liberación de enzimas lisosomales³⁷.

El material extraño antes de ser fagocitado por los PMN o ma
crófagos, interacciona con sustancias presentes en el suero
sanguíneo, las cuales favorecen la realización de la fagocito
sis. Algunas de estas sustancias tienen acción como estimulan
tes de la movilidad celular, otras actúan como opsoninas. Dado

que la actividad fagocítica se desarrolla en diversas etapas bien definidas, pero que en sistemas in vivo ocurren de manera secuencial; para el estudio del fenómeno fagocítico, estas etapas se pueden estudiar de manera independiente en forma experimental: Quimiotaxis, Opsonización, Reconocimiento y Unión, Muerte y Digestión³⁶⁻³⁷.

Quimiotaxis: Es la capacidad de los leucocitos PMN y macrófagos de migrar hacia determinado sitio de inflamación o de infección en respuesta a un estímulo por sustancias quimiotácticas, que atraen a las células a ese lugar. Las sustancias quimiotácticas incluyen factores derivados del suero, en particular el componente del complemento C5a, el cual es liberado como consecuencia de la activación del complemento por complejos antígeno-anticuerpo, por bacterias, por la vía clásica o alterna, según el caso. Así como también por compuestos liberados por linfocitos B o T estimulados, como son las linfocinas factor de activación de macrófagos y factor inhibidor de macrófagos³⁶⁻³⁸.

Opsonización: La partícula factible de ser fagocitada, tiene contacto con proteínas séricas como componentes del complemento, principalmente C1, C4, C2 y C3 o con IgG1 o IgG3. Las opsoninas recubren la partícula y en base a que los fagocitos poseen receptores para estas sustancias, la ingestión se realiza en forma más eficiente³⁶⁻³⁸.

Después del reconocimiento y unión, la partícula es englobada por la membrana del fagocito, forma un fagosoma, al cual se fusionan las vesículas lisosómicas y forman el fagolisosoma en el que se vierten las enzimas que ayudarán a la destrucción del material ingerido³⁶⁻³⁹.

La muerte y la digestión del microorganismo fagocitado, en su caso, ocurre por mecanismos oxígeno-independientes y oxígeno-dependientes.

Mecanismos oxígeno-independientes. En estos se incluyen el pH bajo, lactoferrina, lisozima, glucosidasa, proteínas catiónicas, proteasas, lipasas⁴⁰⁻⁴².

Los mecanismos oxígeno-dependientes requieren de la presencia de peróxido de hidrógeno intracelular, el cual es generado principalmente por la acción de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NADH) y de NADH oxidasa. Este mecanismo presenta dos variantes, dependiendo de que participe o no la enzima mieloperoxidasa (MPO)⁴⁰⁻⁴².

El sistema dependiente de la MPO involucra la producción de radicales oxigenados altamente reactivos, originados por la oxidación de iones cloro en presencia de exceso de peróxido. En cambio el sistema MPO-independiente consiste en la acción directa del peróxido y la producción de hidroxilo reactivo, radicales de oxígeno libre y aniones superóxido (O_2^-)⁴⁰⁻⁴².

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Entre los plaguicidas de uso más frecuente se encuentra el Me tamidofos (organofosforado). Algunos de sus efectos tóxicos están bien definidos, pero se desconoce su acción sobre las células fagocíticas. Por tanto se considera de interés analizar este aspecto de los mecanismos de defensa susceptibles de ser afectados por los plaguicidas.

HIPOTESIS.

Los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos mu
rinos expuestos in vivo a dosis subletales del insecticida Me
tamidofos disminuyen su actividad fagocítica.

OBJETIVO.

Valorar la actividad fagocítica de los PMN y macrófagos peritoneales de ratones de la cepa Balb/C expuestos in vivo a Metamizol.

MATERIAL Y METODOS.

Ratones. Se trabajaron 11 grupos de 10 ratones machos cada uno, de tres meses de edad de la cepa Balb/C de 22 a 23 g de peso. Los ratones se mantuvieron alojados en jaulas de poli carbonato, en cuartos con temperatura controlada de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con ciclos de 12 hr de luz y se alimentaron con purina y agua esterilizada para consumo voluntario.

Tratamiento. Diez grupos de ratones se trataron con insecticida Metamidofos (Tamarón 600, Bayer). El insecticida se diluyó en agua bidestilada y se administró un volumen de 0.2 ml que contenían 1.83×10^{-2} M por vía subcutánea. Dicha concentración es subletal y corresponde a 2.6 mg/Kg de peso²². A los ratones de cada grupo se les aplicaron de 1 a 10 dosis respectivamente, cada tercer día. El grupo 11 se empleó como testigo y se le inyectaron 0.2 ml de agua bidestilada. Después de 24 hr de la última dosis, se sacrificaron los ratones y se determinó la actividad fagocítica de sus leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos peritoneales (MP).

Obtención de levaduras de *Cándida albicans*: La cepa de *C. albicans* se aisló de un paciente con candidiasis mucocutánea crónica por siembra en medio de cultivo Sabouraud (Bioxón Cat. No. 107-1) e incubado a 37°C durante 72 hr para su crecimiento. Posteriormente se resembró en Caldo Cerebro-Corazón (Bioxón Cat. No. 112-1 y se incubó 24 hr a 37°C . Transcurrido este tiempo,

Las levaduras de C. albicans se lavaron tres veces con solución salina fisiológica estéril al 0.9 % y se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos, las levaduras de C. albicans se contaron en cámara de Neubauer y se llevaron a una concentración de 2×10^7 levaduras de C. albicans por ml de solución salina fisiológica estéril al 0.9 %.

Obtención de PMN y macrófagos peritoneales (MP). A los ratones se les administraron por vía intraperitoneal 0.3 ml de heparina sódica que contenía 1,000 USP/ml, 20 minutos después se sacrificaron por descerebración y se obtuvo la sangre por punción cardíaca. Se elaboraron dos frotis sanguíneos para la determinación de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en los PMN según el método de Kaplow⁴³. Posteriormente la sangre se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos y se separó el plasma y el paquete de leucocitos el cual se resuspendió a una concentración de 2×10^6 PMN/ml en solución salina balanceada de Hanks (SSBH) (Grand Island Biological Co. Cat. 310 - 4060) a 37°C con pH de 7.4.

Los MP se obtuvieron inyectando 3 ml de SSBH a 37°C en la cavidad peritoneal de cada ratón. Se dió un masaje suave en el peritoneo, en seguida se recuperó la SSBH que contenía en suspensión los MP. De esta suspensión se hicieron dos frotis en porta-objetos para la valoración de la enzima MPO. La suspensión de MP se lavó y se llevó a una concentración de 2×10^6 MP/ml de SSBH.

Prueba de Fagocitosis en PMN y MP. Se empleó el método de adherencia al vidrio⁴⁴. El cual consistió básicamente en colocar 0.5 ml de la suspensión de PMN o MP sobre cubre-objetos de 22 X 22 mm, previamente desengrasados y pegados en tapones de hule. A continuación se colocaron en cámara húmeda y se incubaron a 37°C durante 45 minutos para permitir su adherencia al vidrio. Transcurrido este tiempo se lavaron suavemente los cubre-objetos con SSBH a 37°C para la eliminación de las células que no se adhirieron al vidrio. Inmediatamente después y sin dejar secar los cubre-objetos, las células adheridas se cubrieron con 0.5 ml de la suspensión de C. albicans que contenía 2×10^7 levaduras por ml de SSBH adicionada del 20 por ciento de plasma autólogo. Posteriormente se incubaron durante 15 minutos en cámara húmeda a 37°C. Al término de la incubación se lavaron suavemente con SSBH para retirar las levaduras de C. albicans no fagocitadas. Los cubre-objetos se dejaron secar al aire y se tiñeron con colorante de Wright. Luego se montaron invertidos sobre porta-objetos previamente identificados. Las pruebas se hicieron por duplicado en todos los casos.

La valoración de la fagocitosis se hizo observando las preparaciones en microscopio de luz con el objetivo de 100 X. Se contaron 300 PMN o MP en cada cubre-objetos, se incluyeron en este número de células las que estuvieron o no fagocitando. Las levaduras fagocitadas se observaron como cuerpos intracitoplásmicos.

máticos, de color azul intenso (levaduras no digeridas), así como vacuolas ópticamente vacías, este fenómeno Cunningham lo describe como fantasmas⁴⁵; o con escasos residuos, que eran los fagosomas que contenían las levaduras ingeridas y que después fueron destruidos (levaduras muertas o digeridas) por la acción de los productos líticos de las células fagocíticas, se diferenciaron las levaduras digeridas y las no ingeridas. Después se valoró el Índice Fagocítico (IF) y el Índice de Digestión (ID).

El IF se determinó sumando el número de levaduras ingeridas (digeridas o no) por los 300 fagocitos y este valor se dividió entre 300 que fueron los fagocitos contados, el cociente resultante fue el IF. El ID se determinó contando el número de levaduras digeridas por los 300 fagocitos y este valor se dividió entre 300, el ID fue el cociente de la división. Como se hicieron dos valoraciones en cada caso, se obtuvo el promedio de ambas para cada animal.

Determinación del contenido de mieloperoxidasa (MPO). La valoración de MPO en los PMN y MP de los ratones estudiados, se llevó a cabo en base al Método descrito por Kaplow⁴³. Los frotis sanguíneos se fijaron por 15 segundos con formol-etanol al 10% a temperatura ambiente, se lavaron con agua corriente y se eliminó el exceso de agua. Se incubaron 30 segundos con una solución que contenía: 0.30 g de hidrocloreto de bencidina, 100 ml de alcohol etílico al 30 %, 1.5 ml de solución 0.1 N de hi

dróxido de sodio, 0.7 ml de peróxido de hidrógeno al 3 %, 1 g de acetato de sodio, 1 ml de sulfato de zinc al 1 % y 0.20 g de safranina. Después se lavaron con agua corriente y se secaron al aire. El producto de la reacción de oxidación de la bencidina se presentó en forma de gránulos intracitoplasmáticos de color azul, verde o café oscuros, estos se observaron en el microscopio de luz con el objetivo de 100 X.

Para determinar la actividad de MPO en los PMN y MP se tomó el siguiente criterio. Se contaron 100 células fagocíticas. Aquellas que presentaron los gránulos intracitoplasmáticos descriptos anteriormente, se consideraron en actividad y el resultado se expresó en por ciento de PMN o MP que tuvieron actividad de MPO.

Para determinar el contenido (capacidad) de MPO se realizó semicuantitativamente por medio de cruces que indicaron la intensidad del producto de la reacción de MPO. Los PMN y MP que presentaron gran cantidad de granulaciones se les asignaron tres cruces, a los que tuvieron una cantidad intermedia dos cruces y a los que mostraron escasos gránulos una cruz; los que no presentaron granulaciones se les dió el valor de cero. Se sumaron todas las cruces en cada caso, esta cifra se relaciono con el 100 % de capacidad que sería de 900 puntos ya que este valor sería el máximo contenido de MPO que tendrían los los 300 PMN o MP si tuvieran una capacidad de tres cruces. Finalmente el reg

sultado de la capacidad de MPO se informó en por ciento de actividad de MPO.

Los resultados fueron analizados estadísticamente por medio de análisis de varianza y por la prueba "t" de Student. Esta prueba se realizó con los valores obtenidos en los Grupos 1 a 10, tratados con Metamidofos, comparados cada uno con el Grupo 11 (testigo). Como límite de significancia se tomó "p" .05 .

RESULTADOS.

En las Tablas 1 y 2 se muestran los valores obtenidos en la prueba de fagocitosis de Cándida albicans realizada en PMN y macrófagos peritoneales de ratones Balb/C tratados con diferentes dosis de insecticida Metamidofos. Estos resultados se expresan como los promedios del número de levaduras ingeridas (IF) y las digeridas (ID) por cada PMN o MP.

En la Tabla 1 los IF de los PMN en los Grupos 1 a 10 se encontraron disminuidos, en comparación con el IF de los ratones testigo (Grupo 11). Esta disminución fue estadísticamente significativa en los Grupos 1 a 9. Asimismo el ID de los PMN fue significativamente más bajo que el Grupo 11, en todos los Grupos que recibieron Metamidofos.

En la Tabla 2 se muestra el IF de los MP. Sólo se encontró disminuido significativamente en los Grupos 8 y 10 de los ratones tratados con Metamidofos. El ID en los MP de los Grupos 3,4,8,9 y 10 tratados con Metamidofos se encontró discretamente disminuido pero en forma significativa ($p < .05$), en relación con el Grupo 11.

En la Tabla 3 se muestra la actividad de la enzima MPO en PMN de los ratones tratados con diferentes dosis de insecticida Metamidofos (Grupos 1 a 10). Se encontró disminución estadísticamente significativa en el número de PMN que mostraron activi

dad de MPO (% de actividad MPO) de los Grupos 1 a 5 comparados con los ratones del Grupo 11. La cantidad de la enzima MPO - que contenían los PMN (% capacidad MPO) se encontró disminuída en todos los Grupos (1 a 10) tratados con Metamidofos. La diferencia fue estadísticamente significativa, con excepción del Grupo 8.

En relación con el contenido de MPO en los MP, éste resultó negativo, debido a que los MP no se encontraban activados.

TABLA 1. FAGOCITOSIS DE LEVADURAS DE CANDIDA ALBICANS POR PMN DE RATONES TRATADOS CON DIFERENTES DOSIS DE INSECTICIDA METAMIDOFOS. NUMERO DE LEVADURAS INGERIDAS (IF) Y DIGERIDAS (ID) POR PMN.

	GRUPO n=10	IF	"p"	ID	"p"
TRATADOS	1	\bar{X} 1.56 \pm 0.12	.001	\bar{X} 0.39 \pm 0.1	<.001
	2	\bar{X} 1.4 \pm 0.13	.001	\bar{X} 0.36 \pm 0.07	<.001
	3	\bar{X} 1.38 \pm 0.20	.001	\bar{X} 0.32 \pm 0.01	<.001
	4	\bar{X} 1.34 \pm 0.21	.001	\bar{X} 0.34 \pm 0.09	<.001
	5	\bar{X} 2.13 \pm 0.33	.001	\bar{X} 0.67 \pm 0.23	<.005
	6	\bar{X} 2.14 \pm 0.27	.025	\bar{X} 0.6 \pm 0.11	<.005
	7	\bar{X} 1.54 \pm 0.24	.001	\bar{X} 0.5 \pm 0.12	<.001
	8	\bar{X} 1.62 \pm 0.39	.001	\bar{X} 0.44 \pm 0.06	<.001
	9	\bar{X} 2.55 \pm 0.34	.010	\bar{X} 0.31 \pm 0.06	<.001
	10	\bar{X} 2.79 \pm 0.50	NS	\bar{X} 0.39 \pm 0.13	<.001
TESTIGO	11	\bar{X} 3.25 \pm 0.20		\bar{X} 0.83 \pm 0.03	

n = Número de ratones.

"p" = La prueba "t" se aplicó a los Grupos 1-10 vs 11 (TESTIGO)

\bar{X} = Promedio de los IF e ID.

\pm = Desviación estándar.

NS = Diferencia no significativa.

TABLA 2. FAGOCITOSIS DE LEVADURAS DE CANDIDA ALBICANS POR MP DE RATONES TRATADOS CON DIFERENTES DOSIS DE INSECTICIDA METAMIDOFOS. NUMERO DE LEVADURAS INGERIDAS (IF) Y DIGERIDAS (ID) POR MP.

	GRUPO n=10	IF	"p"	ID	"p"
TRATADOS	1	\bar{X} 2.98 \pm 1.2	NS	\bar{X} 0.64 \pm 0.46	NS
	2	\bar{X} 1.57 \pm 1.25	NS	\bar{X} 0.93 \pm 0.31	NS
	3	\bar{X} 1.53 \pm 0.96	NS	\bar{X} 0.48 \pm 0.33	\triangleleft .025
	4	\bar{X} 3.81 \pm 0.36	NS	\bar{X} 0.52 \pm 0.31	\triangleleft .050
	5	\bar{X} 3.65 \pm 1.38	NS	\bar{X} 0.71 \pm 0.38	NS
	6	\bar{X} 3.56 \pm 2.06	NS	\bar{X} 0.74 \pm 0.56	NS
	7	\bar{X} 4.19 \pm 0.84	NS	\bar{X} 0.73 \pm 0.19	NS
	8	\bar{X} 1.71 \pm 0.29	.010	\bar{X} 0.52 \pm 0.16	\triangleleft .050
	9	\bar{X} 2.31 \pm 0.84	NS	\bar{X} 0.66 \pm 0.04	\triangleleft .050
	10	\bar{X} 2.16 \pm 0.31	.050	\bar{X} 0.66 \pm 0.19	\triangleleft .050
TESTIGO	11	\bar{X} 2.90 \pm 0.53		\bar{X} 1.18 \pm 0.46	

n = Número de ratones.

"p" = La prueba "t" se aplicó a los Grupos 1-10 vs 11 (TESTIGO)

\bar{X} = Promedio de los índices fagocíticos (IF) y de digestión (ID)

\pm = Desviación estándar.

NS = Diferencia no significativa.

TABLA 3. PORCIENTO DE PMN DE RATONES TRATADOS CON EL INSECTICIDA METAMIDOFOS, QUE MOSTRARON ACTIVIDAD DE LA ENZIMA MPO (% ACTIVIDAD MPO) ASI COMO LA INTENSIDAD DE LA REACCION (% DE CAPACIDAD).

	GRUPO n=10	% ACTIVIDAD MPO	"p"	% CAPACIDAD MPO	"p"
TRATADOS	1	\bar{X} 94.0 \pm 2.3	.001	\bar{X} 83.0 \pm 7.2	<.005
	2	\bar{X} 96.0 \pm 2.1	.001	\bar{X} 92.0 \pm 1.8	<.001
	3	\bar{X} 97.0 \pm 0.7	.001	\bar{X} 85.0 \pm 2.3	<.001
	4	\bar{X} 95.0 \pm 0.7	.001	\bar{X} 70.0 \pm 3.7	<.001
	5	\bar{X} 95.0 \pm 1.5	.001	\bar{X} 87.0 \pm 2.9	<.001
	6	\bar{X} 99.0 \pm 0.7	NS	\bar{X} 93.0 \pm 3.5	<.010
	7	\bar{X} 99.0 \pm 0.7	NS	\bar{X} 96.0 \pm 1.7	<.005
	8	\bar{X} 99.0 \pm 0.8	NS	\bar{X} 88.0 \pm 12.3	NS
	9	\bar{X} 99.0 \pm 0.4	NS	\bar{X} 79.0 \pm 1.3	<.050
	10	\bar{X} 98.0 \pm 1.0	NS	\bar{X} 80.0 \pm 3.8	<.001
TESTIGO	11	\bar{X} 100.0 \pm 0.0		\bar{X} 98.0 \pm 0.5	

n = Número de ratones.

"p" = La prueba "t" se aplicó a los Grupos 1-10 vs 11 (TESTIGO)

\bar{X} = Promedio de los porcentos de PMN que tuvieron actividad de MPO.

\pm = Desviación estándar.

NS = Diferencia no significativa.

DISCUSION.

Diversos insecticidas ocasionan alteraciones sobre las células efectoras de la respuesta inmune celular, principalmente sobre los linfocitos T⁴⁸⁻⁵¹, en los que se ha encontrado disminución en la síntesis de DNA de los linfocitos cultivados en presencia de mitógenos⁴⁸, y en la formación de rosetas-E⁴⁹. Estas alteraciones dependen de la dosis y tipo de plaguicida que se utilice. En relación con el Metamidofos, se ha informado que además de la disminución de la respuesta inmune celular, induce leucopenia.

Por otra parte, el insecticida toxafeno, que pertenece al grupo de plaguicidas organoclorados, induce disminución de la capacidad fagocítica de los macrófagos de ratones expuestos en forma experimental a este insecticida¹⁹. Esto concuerda con los resultados de este trabajo, que muestran disminución significativa de la actividad fagocítica, tanto de los leucocitos PMN como de los MP. En los PMN la disminución fue a nivel de la ingestión y digestión de levaduras de C. albicans, en los ratones expuestos a varias dosis subletales de Metamidofos. Esta alteración en el IF tiende a la normalidad a partir de la décima aplicación. Al respecto, por seguimiento de algunos Grupos de ratones sometidos a dosis subletales múltiples de Metamidofos, hasta 70 aplicaciones cada tercer día (Datos no mostrados) se encontró normal en los PMN, tanto la ingestión (IF) como la diges

ción (ID) de levaduras de C. albicans. En cambio la enzima MPO permaneció abatida desde la primera aplicación como ocurrió en los ratones de los Grupos 1-10 del presente trabajo. El mecanismo por el cual el insecticida Metamidofos disminuye la actividad fagocítica, hasta el momento no se conoce. Pero es probable que a nivel metabólico se deba a la intoxicación que provoca el insecticida, la cual trae como consecuencia una disminución de factores microbicidas dependientes del oxígeno como \bar{O}_2 , \bar{OH} y H_2O_2 , así como también fallas en el sistema microbicida MPO- H_2O_2 -halógeno. Esto último reflejado por la disminución permanente de la enzima MPO una vez que los ratones inician la exposición a Metamidofos. Tal vez esta disminución en la actividad fagocítica tanto a nivel de IF, ID y MPO no sea específicamente provocada por Metamidofos sino que puede ser inducida por otros insecticidas y también que la deficiencia no sea exclusiva para C. albicans.

La sensibilidad de los PMN a los insecticidas, dada su corta vida en circulación (8 hr) explicaría el que fueran sensibles a las primeras dosis de Metamidofos, pero dado que éste se metaboliza y se elimina rápidamente, el efecto acumulativo tóxico es mínimo, por lo que los ratones tenderían a desencadenar un fenómeno de tolerancia hacia el insecticida, que los llevaría en parte a recuperar su capacidad fagocítica (IF), pero no a nivel de ID. Lo cual podría reflejar un daño a nivel de la maduración de los PMN en la médula ósea.

En cuanto a la actividad fagocítica en los MP de los ratones tratados con Metamidofos el efecto del insecticida fue más significativo en el ID, pues disminuyó en 5 de los 10 Grupos estudiados. En cuanto al contenido de la enzima MPO en los MP esta no se detectó debido a que los MP trabajados eran MP residentes no activados.

Se tenía contemplado determinar la concentración de Metamidofos en el suero de los ratones, de manera indirecta, ya que no existen antecedentes de una prueba directa para medir el contenido en sangre del Metamidofos. Dada la acción de este compuesto organofosforado como inhibidor de la enzima colinesterasa. Los niveles sanguíneos de esta enzima darían indirectamente la concentración del plaguicida, por el método de Michel modificado por Larson^{46,47}. Sin embargo en vista de que se consideró que las dosis subletales de Metamidofos fueron bien toleradas por los ratones y no mostraron signos de intoxicación y además que el Metamidofos se elimina rápidamente por la orina, se juzgó prudente no hacer tal determinación.

CONCLUSIONES.

La aplicación de dosis subletales del insecticida Metamidofos indujeron disminución de la actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos a nivel de índice fagocítico, índice de digestión y contenido de mieloperoxidasa.

La acción de Metamidofos sobre la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales fue poco significativa a nivel de índice fagocítico e índice de digestión.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Namba, T.: Poisoning due to organophosphates insecticides acute and chronic manifestations, Am. J. Med. 30: 475-483, 1971.
2. Arata, A.A.: El uso de plaguicidas en la agricultura y la salud pública. El punto de vista de la ecología humana. 139: 59, 1984.
3. Manual de Inspección de alimentos FAO. Organización de Naciones Unidas para agricultura y alimentación. Roma 4: 43-44, 1984.
4. Frederick, B. Epstein.: Poisoning. En: Emergency Medicine. Edited by Peter Rosen y Frank J. Baker II (EDS). St Louis Missouri, Mosby Company. pp. 321-327, 1988.
5. Karl, D. Noloph: Peritoneal diallysis. En: The Kindney Edited by Brenner and Rector. Philadelphia, W.B. Saunder Company. pp. 1872-1873, 1986.
6. Frank Simon, M.D.: Poisoning in children; Am Pham Phyc. 25 206-211, 1982.
7. Woodwell, G.M., Wurster, C.F. e Isaacson, P.A.: DDT residues in an east coast estuary. Science 156: 821-824, 1967.

8. Tatton, J.O'G. Y Ruzicka, J.H.A.: Organochlorine pesticides in Antarctica. Nature 215: 346-348, 1967.
9. Moore, M.R., Campbell, B.C. Y Golberg, A. Lead. Edited by Lenihan and W.W. Fletcher. En: The chemical environment. VI Environment and Man. Glasgow and London. Blackie. pp. 64-92, 1977.
10. Salmeron De D.J.: Intoxicaciones producidas por pesticidas. 2a. Ed. M.A. pp. 13-80, 1972.
11. Parker, J.S.: Control de plagas de plantas y animales. Manejo y control de plagas de insectos. 1ra. Ed. Limusa 3: 379-454, 1978.
12. Barberá, C.: Pesticidas Agrícolas. Insecticidas Fosforicos. Omega S.A. 4: 146, 1976.
13. Turk, A., Turk, J. Y Wittes, J.T.: Ecología Contaminación Medio Ambiente. Interamericana 27: 3, 1972.
14. Croalyn, T.: Plaguicidas y su acción bioquímica. Limusa 11: 343, 1982.
15. Bueno, S.J.: Estudios en Insectos Acuáticos II. Revisión para México y Centroamérica del Género Hydroptila dalmar 1819 (Trichoptera, Hydroptilidae). Folia Entomol. Méx. 79: 59, 1984.

16. Curry-Lindahl K.: Conservar para sobrevivir. 1ra. Ed. Diana pp. 288-297, 1974.
17. Tiefenbach B., Lange P.: Studies on the acción of dimethoate on the immune system. Arch. Toxicol. J. 4: 167, 1980.
18. Subba Rao, D. S. V. Y Glick, D.: Pesticide effects on the immune response and metabolic activity of chicken lymphocytes. Soc. Exper. Biol. Med. 154: 22-29, 1977.
19. Allen A. L., Koller L. D. Y Pollock G. A.: Effect of toxaphene exposure on immune responses in mice. Vet. Med. J. Toxicol. Envirom Health. 11: 1, 1983.
20. Traczyk, Z., Blaton, O., Arczynska, E., Wit, B., Sawicki, W., Gorski, T. Y Rudowski, W.: Effect of chlorinated pesticides on leukocyte migration in vitro. Acta Med. Polona. 19: 451-459, 1978.
21. Jackson J. A., Chart I. S., Ganderson J. H. Y Garder R.: Pirimicarb induced immune haemolytic anaemia in dogs. Scand. J. Haematol. 19: 360, 1977.
22. Street J. C. Y Sharma R. P. Alteration of induced cellular and humoral immune response by pesticides and chemicals of enviromental concern: Quantitative studies of immunosuppression by DDT, Aroclor 1254, Carbaryl, Carbofuran and Me

- thilparathion. Toxicol. Appl. Pharmacol. J. 32: 587, 1975.
23. ADDO, E. Y Poon-King, T.: Leucocyte suppression in treatment of 72 patients with paraquat poisoning. Lancet. 1: 1117-1120, 1986.
24. Gardiner T. H. Y Shanker L. S.: Effect of paraquat induced lung damage on permeability of rat lung to drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 151: 288-292, 1976.
25. Moody C.S. Y Hassan H.M.: Mutagenicity of oxygen free radicals. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 2855-2859, 1982.
26. Andersen R.A., Ingebrigtsen K., Nafstad I. Y Mikalsen A. : Biochemical characteristics of rat sueroxide dismutase - and the effect caused by paraquat injection on the enzyme activity in various tissues. Gen. Pharmac. 15: 205-209, 1984.
27. Raffin T.A., Simon L.M., Douglas W.H.J., Theodore J. Y Robin E.D.: The effects of variable O₂ tension and exogenous superoxide dismutase on type II pneumocytes exposed to paraquat. Lab. Invest. 42: 205-208, 1980.
28. Abou-Donia M.B.: Organophosphorous ester-induced delayed neurotoxicity. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 21: 511-548,

1981.

29. Willoughby, O.: Fram Chemicals Handbook. Meister public Shing Company, 1983.
30. Velez, L.E.: Primeros auxilios y tratamientos de envenenamientos por plaguicidas. 2da. Ed. Dir. Gral. Sanidad Vegetal, S.A.R.H. pp. 47-101, 1979.
31. Murphy, P.: The Neutrophil. Plenum Medical Book company. New York and London. 1976.
32. Marchalonis, J.J.: Immunity in Evolution. Harvard University Press, Cambridge, Mass. 1977.
33. Rose, R.N., Felix, M. Y Van Os C.J.: Principios De Inmunología. Ed. C.E.C.S.A. pp. 1-30, 1983.
34. Fudenberg, H.H., Stites, P.D., Caldwell, L.J. Y Wells, V.J. Manual De Inmunología Clínica. Ed. El Manual Moderno, pp. 13-373, 1985.
35. Ortiz, O.L.: Inmunología, Ed. Interamericana. pp. 14-52, 1987.
36. Lachman, P.J. Biology of the Complement System. En Progress In Immunology V. Edited by Y. Yamamura y T. Tada. Academic Press, New York, pp 445, 1983.

37. De La Vega, G.: El Neutrófilo en la Defensa del Organismo. *Patología*. 11: 49-56, 1973.
38. Badwey, J.A. Y Karnovsky, M.L.: Active oxygen and the functions of phagocytic leucocytes. *Ann. Rev. Biochem.* 49:695, 1980.
39. Biggar, W.D., Sturgess, J.M.: Peroxidase Activity of Alveolar Macrophages. *Lab. Invest.* 34: 31-42, 1976.
40. Klebanoff, S.J.: Myeloperoxidase-Hyaluridase-Hydrogen Peroxide Antibacterial System. *J. Bacteriol.* 95: 2131-2138, 1968.
41. Gómez, E.H., Morales, D.R., González, M.A., Barba, R.J. Y Ceja, M.S.: Deficiencia de Peroxidasa en los Histiocitos de pacientes con Lepra Lepramatososa Nodular. *Arch. Invest. Med. (Méx)*. 14: 127-137, 1983.
42. Joklik, W.K., Willett, H.P. Y Amos, D.B.: *Zinsser Microbiología*. 17a. Ed. Panamericana. pp. 433-439, 1983.
43. Kaplow, L.S.: Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. *Blodd.* 26: 215-217, 1985.
44. Gómez, E., Ramos, D.M.E. Y Cerda, O.C.: Phagocytic activity of rabbit pulmonary macrophages at different temperatures. *Arch. Inv. Med.* 10: 15, 1979.

45. Cunningham, K.M., Bulmer, G.S. Y Rhoades, E. R.: Phagocytosis an intracellular fate of Sporotrix schinekii; : J. Infect. Dis. 140: 815-817, 1979.
46. Michel, H.O. : Electrometric method for determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. J. Lab. Clin. Med., 34: 1564-1566, 1949.
47. Larson, E.F.: Microelectrometric method for blood cholinesterase determinations. Division of Laboratories, California State Department of Public Health, 1957.
48. Czajuska, A., Walter, Z.: Effect of malathion on nucleic acid synthesis in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. Hum. Genet. 56: 189-194, 1980.
49. Thomas, I.K., Y Imaura, T.: Immunosuppressive effect of an impurity of malathion; Inhibition of murine T and B lymphocyte responses by O.O.S-trimethyl phosphorothioate. Toxicology and A. Pharmacology. 83: 456, 1986.
50. Dulout, F.N., Pastori, M.C., Y Olivero, O.A.: Malathion induced chromosomal aberrations in bone marrow cells of mice dose-response relationships. Mutation research. 122: 163-167, 1983.

51. Walter, Z., Czajkwska, A., Lipecka, K.: Effect of malathion on the genetic material of human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin (PHA). *Hum. Genet.* 53: 375-381, 1980.