

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Cátedra de Farmacología
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Litoral

**INFLUENCIA DE LOS ESTADOS FISIOLÓGICOS EN LA
DISPOSICIÓN CINÉTICA DE CLORPIRIFÓS EN BOVINOS**

AUTOR: Vet., M.Sc. Eduardo Jesús Picco

DIRECTOR: Dr. Juan Carlos Boggio

CODIRECTORA: Dra. Casilda Rodríguez Fernández

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INFLUENCIA DE LOS ESTADOS FISIOLÓGICOS EN LA
DISPOSICIÓN CINÉTICA DE CLORPIRIFÓS EN BOVINOS**

AUTOR: Vet., M.Sc. Eduardo Jesús Picco

DIRECTOR: Dr. Juan Carlos Boggio

CODIRECTORA: Dra. Casilda Rodríguez Fernández

MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE TESIS:

Dra. Marcela Rebuelto
Dr. Sergio Sánchez Bruni
Dr. Alberto Guglielmone

Santa Fe, 24 de Junio de 2009.

AGRADECIMIENTOS

Muchos han sido los que de manera directa o indirecta colaboraron en la realización de esta tesis. Quiero dejar constancia de todos ellos y agradecerles su participación.

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Juan Carlos Boggio, por su excelente trabajo de dirección, por haberme iniciado en el mundo de la investigación, y por sobre todas las cosas, por haber demostrado a lo largo de todos estos años, ser un gran amigo.

Quiero agradecer muy especialmente a la Dra. Casilda Rodríguez Fernández, por su trabajo de dirección, por su infinita colaboración, por todo su tiempo invertido en la ejecución y la corrección de esta tesis, por sus palabras de ánimo y fundamentalmente por su amistad.

A la Universidad Nacional del Litoral, por la beca otorgada y por el subsidio al proyecto en el marco de el Curso de Acción para la Investigación el Desarrollo (CAI+D 2002), a través de lo cual hizo posible concretar la presente tesis doctoral.

Mi más hondo agradecimiento y reconocimiento, a las autoridades y personal de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por brindarme la oportunidad de desarrollar mi doctorado en la misma.

A mis compañeros de la Cátedra de Farmacología, Marcelo Rubio, Eduardo Baroni, Diego Díaz, Héctor Fernández, Enrique Formentini, y Manuel San Andrés quienes de una manera u otra han prestado su ayuda en las diversas actividades de este trabajo.

Al Dr. Roberto Rodríguez y a los alumnos del Grupo Funcional Guachera de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por todo el apoyo brindado durante la ejecución de la fase experimental, y la nada fácil tarea de la crianza de los terneros.

A los pasantes, becarios y amigos, Román, Ariel, Martín, Ezequiel, Enrique, Jimena y Pablo, por su incondicional apoyo en la fase experimental.

Extiendo mis agradecimientos a mi familia quienes siempre han estado apoyándome y alentándome en la ejecución de este emprendimiento.

Quisiera expresar finalmente mi infinito agradecimiento a May, por haberme apoyado incondicionalmente durante todo este tiempo y por haber soportado todas las horas de ausencia. Muchas gracias por toda tu comprensión y por la llegada a nuestras vidas de Bautista.

A todos los que han estado a mi lado y que de una u otra forma han puesto su granito de arena, contribuyendo a la realización de este trabajo, reitero mi más sincero agradecimiento.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1.- Clorpirifós.....	2
I.1.1.- Generalidades	2
I.1.2.- Características químicas	3
I.1.3.- Farmacocinética.....	3
I.1.4.- Mecanismo de acción	8
I.1.5.- Efectos tóxicos del clorpirifós	10
I.1.5.1.- Neurotoxicidad aguda	10
I.1.5.2.- Síndrome intermedio.....	12
I.1.5.3.- Neurotoxicidad retardada.....	13
I.1.5.4.- Efectos sobre la reproducción.....	14
I.1.5.5.- Mutagenicidad	16
I.1.5.6.- Carcinogenicidad	16
I.1.5.7.- Efectos sobre el sistema inmune	16
I.1.6.- Efectos ecológicos	17
I.1.6.1.- Efectos sobre insectos benéficos.....	17
I.1.6.2.- Efectos sobre los peces	17
I.1.6.3.- Efectos sobre las aves	18
I.1.6.4.- Efectos sobre los organismos del suelo	19
I.1.7.- Interacciones farmacológicas del clorpirifós.....	19
I.1.8.- Diagnóstico de la intoxicación por clorpirifós	20
I.1.8.1.- Historia clínica.....	20
I.1.8.2.- Examen físico	20
I.1.8.3.- Pruebas de laboratorio	20
I.1.8.4.- Hallazgos de necropsia	22
I.1.9.- Tratamiento.....	22
I.1.10.- Pronóstico y seguimiento.....	24
I.2.- Colinesterasas	26
I.2.1.- Introducción.....	26
I.2.2.- Estructura molecular de la colinesterasa	30
I.2.3.- Sitio activo de la enzima colinesterasa	33

I.2.4.- Factores que afectan la actividad de las colinesterasas	35
I.2.4.1.- Especie	35
I.2.4.2.- Variaciones individuales	38
I.2.4.3.- Edad	39
I.2.4.4.- Sexo	40
I.2.4.5.- Variaciones temporales	42
I.2.4.6.- Salud y estado nutricional	43
I.2.5.- Inhibición de las colinesterasas: Complejidad en su interpretación	44
I.3.- Farmacocinética	47
I.3.1.- Introducción	47
I.3.1.1.- El lenguaje de la farmacocinética	48
I.3.1.2.- Procesos de orden uno	49
I.3.1.3.- Procesos de orden cero	49
I.3.1.4.- Frecuencia de los procesos de orden uno y de orden cero	50
I.3.1.5.- Análisis farmacocinético compartimental	50
I.3.1.6.- Análisis farmacocinético no compartimental	52
I.3.1.6.1.- Definición	52
I.3.1.6.2.- Cálculo del área bajo la curva (AUC)	53
I.3.1.6.3.- Cálculo del área bajo un momento de la curva (AUMC)	55
I.3.1.6.4.- Cálculo del Tiempo Medio de Residencia (<i>MRT</i>) y de la semivida terminal ($t_{1/2}$)	56
I.3.1.6.5.- Concepto de clearance o aclaramiento	60
I.3.1.6.6.- Volumen de distribución	61
I.3.1.6.7.- C_{max} y t_{max}	63
I.3.2.- Influencia de la edad en la farmacocinética	63
I.3.2.1.- Introducción	63
I.3.2.2.- Absorción	64
I.3.2.2.1.- Absorción dérmica	64
I.3.2.2.2.- Influencia de la especie	66
I.3.2.2.3.- Influencia de la edad	67
I.3.2.2.4.- Influencia de la estación del año	67
I.3.2.3.- Distribución	68
I.3.2.4.- Metabolismo	71

I.3.2.5.- Excreción	72
I.3.3. Influencia del sexo en farmacocinética.....	73
I.3.3.1.- Absorción.....	73
I.3.3.2.- Distribución	75
I.3.3.3.- Metabolismo	76
I.3.3.4.- Excreción	79
II. OBJETIVOS	81
III. MATERIALES Y MÉTODOS	85
III.1.- Materiales.....	86
III.1.1.- Material biológico	86
III.1.2.- Fármacos	86
III.2.- Métodos	86
III.2.1.- Conformación de los grupos experimentales.....	86
III.2.2.- Acondicionamiento de los animales	87
III.2.3.- Condiciones de mantenimiento de los animales	88
III.2.4.- Aplicación del fármaco	89
III.2.5.- Toma de muestras biológicas.....	89
III.2.6.- Determinación de concentraciones plasmáticas de clorpirifós	90
III.2.6.1.- Extracción físico-química de los analitos	90
III.2.6.2.- Análisis cromatográfico	91
III.2.6.3.- Validación de la técnica cromatográfica	91
III.2.6.3.1.- Especificidad del método	91
III.2.6.3.2.- Linealidad.....	91
III.2.6.3.2.1.- Linealidad del sistema cromatográfico.....	92
III.2.6.3.2.2.- Linealidad del método	92
III.2.6.3.3.- Exactitud del método.....	92
III.2.6.3.4.- Precisión del método	93
III.2.6.3.5.- Sensibilidad del método	93
III.2.6.3.6.- Recuperación	93
III.2.7.- Determinación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa.....	94

III.2.7.1.- Procedimiento de análisis.....	94
III.2.7.2.- Validación del método	95
III.2.7.2.1.- Linealidad.....	95
III.2.7.2.2.- Precisión del método	95
III.2.8.- Determinación de la actividad de la enzima butirilcolinesterasa.....	95
III.2.8.1.- Procedimiento de análisis.....	95
III.2.8.2.- Validación del método	96
III.2.8.2.1.- Linealidad.....	96
III.2.8.2.2.- Precisión	96
III.2.9.- Tratamiento Farmacocinética.....	96
III.2.10.- Tratamiento Estadístico	97
IV. RESULTADOS	99
IV.1.- Validación del método cromatográfico	100
IV.1.1.- Especificidad	100
IV.1.2.- Linealidad	100
IV.1.2.1.- Linealidad del sistema cromatográfico	100
IV.1.2.2.- Linealidad del método.....	101
IV.1.3.- Exactitud	102
IV.1.4.- Precisión	103
IV.1.5.- Sensibilidad.....	104
IV.1.6.- Recuperación	105
IV.2.- Validación de la determinación de la actividad de acetilcolinesterasa.....	106
IV.2.1- Linealidad	106
IV.2.2- Precisión	106
IV.3.- Validación de la determinación de la actividad de butirilcolinesterasa.....	108
IV.3.1- Linealidad	108
IV.3.2- Precisión	108
IV.4.- Actividad enzimática basal.....	110

IV.4.1.- Participación de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en la actividad colinesterásica total en sangre	110
IV.4.2.- Variabilidad interindividual en la actividad colinesterásica.....	111
IV.4.3.- Variabilidad intraindividual temporal en la actividad colinesterásica ...	111
IV.5.- Influencia de la edad en la actividad de colinesterasa.....	113
IV.6.- Influencia del sexo en la actividad colinesterásica.....	115
IV.7.- Influencia de la orquiectomía en la actividad colinesterásica	116
IV.8.- Influencia de la época del año en la actividad colinesterásica	117
IV.9.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en bovinos machos enteros de diferentes edades	118
IV.10.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en vaquillonas.	123
IV.11.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en novillos	124
IV.12.- Comparación en el porcentaje de inhibición de las enzimas colinesterasas luego de la aplicación de clorpirifós a bovinos de diferentes edades	127
IV.13.- Comparación en el porcentaje de inhibición de las enzimas colinesterasas luego de la aplicación de clorpirifós a bovinos machos enteros y hembras.....	130
IV.14.- Comparación en el porcentaje de inhibición de las enzimas colinesterasas luego de la aplicación de clorpirifós a bovinos machos enteros y castrados	131
IV.15.- Comparación en el porcentaje de inhibición de las enzimas colinesterasas luego de la aplicación de clorpirifós a novillos en invierno o en verano.....	132
IV.16.- Farmacocinética del clorpirifós en bovinos de diferentes edades y sexo	133
IV.17.- Relación Farmacocinética-Farmacodinámica en bovinos de diferentes edades y sexo	143
IV.18.- Signos clínicos y hallazgos de necropsia en terneros que manifestaron un cuadro de toxicidad tras la exposición al clorpirifós.....	145

V. DISCUSIÓN	147
V.1.- Actividad enzimática basal	148
V.1.1.- Participación de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en la actividad colinesterásica total	148
V.1.2.- Variabilidad interindividual en la actividad colinesterásica	149
V.1.3.- Variabilidad intraindividual temporal en la actividad colinesterásica	151
V.1.4.- Influencia de la edad en la actividad de colinesterasa	152
V.1.5.- Influencia del sexo en la actividad de colinesterasa	154
V.1.6.- Influencia de la orquiectomía en la actividad de colinesterásica	156
V.1.7.- Influencia de la época del año en la actividad de colinesterásica	157
V.2.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en bovinos	158
V.2.1.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en bovinos de diferentes edades	165
V.2.2.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en bovinos machos enteros y vaquillonas	177
V.2.3.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en bovinos machos enteros y orquiectomizados	181
V.2.4.- Comparación en el porcentaje de inhibición de las enzimas colinesterasas en novillos tratados con clorpirifós en invierno o verano ..	184
V.3.- Evaluación global del comportamiento farmacocinético del clorpirifós tras administración <i>pour-on</i>	187
VI. CONCLUSIONES	193
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	196

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABC	Área bajo la curva en cromatogramas
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AEE	Actividad enzimática esperada
AEO	Actividad enzimática obtenida
<i>AUC</i>	Área bajo la curva en gráficas de concentración plasmática frente al tiempo
<i>AUMC</i>	Área bajo un momento de la curva en gráficas de concentración plasmática frente al tiempo
BChE	Butirilcolinesterasa
CbE	Carboxilesterasas
<i>Cl</i>	Aclaramiento o clearance
C_{max}	Concentración plasmática máxima
CPF	Clorpirifós
CV	Coefficiente de variación
CYP	Citocromo P450
ChE	Colinesterasas
DE	Desvío estándar
I_{max}	Inhibición máxima
<i>MRT</i>	Tiempo medio de residencia
NTE	Esterasa neurotóxica
OF	Organofosforado
OPIDP	Neuropatía periférica retardada
SNC	Sistema Nervioso Central
$t_{1/2el}$	Semivida de eliminación en la fase terminal
TCP	3,5,6-tricloropiridinol
t_{max}	Tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima
V_d	Volumen de distribución.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

Picco, E.J.; Fernández, H.R.; Díaz David, D.C.; San Andrés, M.I.; Boggio, J.C.; Rodríguez, C. (2008). *Use of cholinesterase activity in monitoring chlorpyrifos exposure of steer cattle after topical administration*. J. Environ. Sci. Health B 43(5): 405-409.

Picco, E.J.; Rubio, M.R.; Díaz David, D.C.; Rodríguez, C. y Boggio, J.C. (2008). *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorpyrifos in male and female cattle after topical administration*. Vet. Res. Commun. 32(5):401-410.

RESUMEN

El Clorpirifós es un compuesto organofosforado ampliamente utilizado en agricultura y ganadería para el control de diversos artrópodos, sin embargo, no se conocen completamente ni sus características cinético-dinámicas ni la influencia de factores fisiológicos y ambientales sobre las mismas en rumiantes. El objetivo general de este trabajo fue definir el comportamiento cinético descriptivo del clorpirifós tras su administración *pour-on* en ganado bovino y el efecto que origina sobre las enzimas bioindicadoras de exposición; abordando la influencia del desarrollo, el sexo del animal y la orquiectomía. También se determinó cómo la época del año en la que se realiza el tratamiento, verano o invierno, modifica la actividad colinesterásica. Se conformaron 9 grupos experimentales, cada uno de los cuales estuvo integrado por 6 individuos, a excepción del grupo de adultos testigos conformado por 8 individuos. Se emplearon terneros de 1, 7 y 28 días de vida, toros, novillos y vaquillonas. Los animales fueron tratados con clorpirifós por vía tópica (10 mg/kg) empleando un preparado comercial formulado al 10%. Se tomaron muestras sanguíneas a tiempos prefijados a fin de determinar la concentración plasmática del fármaco y la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE). La cuantificación de clorpirifós se realizó por cromatografía gaseosa y la determinación de la actividad colinesterásica en plasma y eritrocitos se efectuó por el método de Ellman modificado. La actividad colinesterásica basal media para AChE y BChE fue de 8077 ± 1009 y 390 ± 71 UI/L en terneros de 1 día de vida, de 10498 ± 843 y 426 ± 61 UI/L en terneros 7 días de vida, de 9916 ± 1386 y 463 ± 32 UI/L en terneros 28 días de vida, de 13220 ± 2274 y 641 ± 88 UI/L en toros, de 9338 ± 1331 y 624 ± 39 UI/L en vaquillonas y de 9597 ± 845 y 505 ± 49 UI/L en novillos. La AChE fue la colinesterasa predominante en sangre y su actividad basal fue significativamente superior en los toros respecto a los otros grupos estudiados. La administración de clorpirifós *pour-on* originó en todos los grupos estudiados una importante inhibición colinesterásica. En función de la edad se evidenció que el grupo que presentó el mayor porcentaje de inhibición ($I_{m\acute{a}x}$) en las dos enzimas fue el de los toros ($77,96 \pm 8,74$ y $46,69 \pm 3,81\%$ para AChE y BChE, respectivamente), frente a las muestras obtenidas para los terneros, a pesar de ser los terneros los únicos que presentaron cuadros de intoxicación. Si bien la disminución en la actividad colinesterásica fue sumamente prolongada en todos los grupos, fue en los

toros donde se extendió por más tiempo (120 d). Los machos enteros también presentaron una mayor inhibición de las enzimas colinesterásicas que las vaquillonas ($I_{\max} = 54,90 \pm 3,89$ y $35,70 \pm 5,62\%$, para AChE y BChE, respectivamente) y que los novillos ($I_{\max} = 50,88 \pm 11,57$ y $42,66 \pm 12,01\%$, para AChE y BChE, respectivamente; tratamiento invernal), constatándose además que los novillos tratados en verano presentaron una menor inhibición en la actividad de estas dos enzimas ($I_{\max} = 37,66 \pm 6,28$ y $37,57 \pm 6,53\%$, para AChE y BChE) que los que fueron tratados en invierno. Las concentraciones plasmáticas de clorpirifós fueron sumamente bajas en todos los individuos ($< 18 \mu\text{g/L}$) y variables, hecho que influyó en la gran variación individual que presentó el área bajo la curva. El tiempo medio de residencia del fármaco fue superior en los terneros de 1 y 7 días ($25,60 \pm 7,30$ y $31,87 \pm 7,37$ h, respectivamente) respecto al resto de los individuos evaluados en el estudio (terneros de 28 días = $18,10 \pm 3,47$ h; toros = $11,96 \pm 6,43$ h; vaquillonas = $14,60 \pm 9,37$ h; novillos = $11,74 \pm 8,47$ h). A pesar de que no se encontraron otras diferencias significativas en el comportamiento farmacocinético del clorpirifós, si se presentaron diferencias en la inhibición de las enzimas colinesterásicas en función de la edad, el sexo y la época del año en el que se efectuó el tratamiento, lo cual podría estar influenciado por factores cinéticos enmascarados por la rápida metabolización y transformación en el metabolito activo oxón o por factores farmacodinámicos. El presente estudio representa un aporte para comprender la necesidad de ajustar adecuadamente el régimen posológico a la categoría animal a tratar, a fin de evitar episodios de intoxicación así como la generación de residuos que afecten al consumidor como al ambiente.

SUMMARY

Chlorpyrifos is an organophosphate compound widely used in agriculture and in livestock for the control of various arthropods. However, little information is available related to the kinetic and dynamic characteristics of chlorpyrifos in ruminant species and about the possible affect of physiological and environmental factors on the kinetic and dynamic of this organophosphate compound. The aim of this work was to determine the pharmacokinetic behaviour and the inhibitory effect on acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) activities of the exposure to chlorpyrifos in cattle after *pour-on* administration, studying the influence of development, the sex, the orchietomy. Also, the seasonal influence, summer *vs* winter, in cholinesterases activities after chlorpyrifos treatment was assessed. The study was carried out on 9 experimental groups, composed of six animals for group with the exception of control group (n=8). One, seven and twenty eight days old calves, bulls, steer cattle and heifers were used for this study. Chlorpyrifos formulation 10% solution was applied on the skin surface at the recommended dose of 10 mg/kg. Jugular venous blood samples were collected at predetermined times to determine plasma drug concentrations and the activity of the acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes. The quantification of chlorpyrifos was performed by gas chromatography according to a previously described method and the determination of cholinesterase activity in plasma and erythrocytes were carried out according to Ellman method. The mean baseline activities for AChE and BChE were 8077 ± 1009 y 390 ± 71 UI/L in 1 day old calves, 10498 ± 843 y 426 ± 61 UI/L in 7 days old calves, 9916 ± 1386 y 463 ± 32 UI/L in 28 days old calves, 13220 ± 2274 y 641 ± 88 UI/L in bulls, 9338 ± 1331 y 624 ± 39 UI/L in cows and 9597 ± 845 y 505 ± 49 UI/L in steer cattle. Acetylcholinesterase was the blood predominant form of cholinesterase analyzed and its basal activity was significantly higher in bulls than in the other groups studied. A single *pour-on* dose of chlorpyrifos produced significant inhibitory effect on AChE and BChE in all treated groups. Age-related changes in cholinesterases activities were observed; thus, the highest values of maximum percentage of inhibition (I_{max}) was found in bulls ($77,96 \pm 8,74$ and $46,69 \pm 3,81\%$ for AChE and BChE inhibitions, respectively) compared to samples collected for calves, in spite of the fact that only calves showed clinical signs of toxicity. The cholinesterase

activity inhibition was prolonged in all the groups and the longest values were found in bulls (120 d). Bulls also showed a greater inhibition of cholinesterase enzymes than heifers ($I_{\max} = 54,90 \pm 3,89$ and $35,70 \pm 5,62\%$, for AChE and BChE, respectively) and steers ($I_{\max} = 50,88 \pm 11,57$ and $42,66 \pm 12,01\%$, for AChE and BChE, respectively; winter treatment), being also verified that the steers treated in the summer presented a lower inhibition in the activity of both enzymes ($I_{\max} = 37,66 \pm 6,28$ and $37,57 \pm 6,53\%$, for AChE and BChE) than winter treated steers. Chlorpyrifos plasma concentrations were extremely low ($<18 \mu\text{g/L}$) and variables in all individuals, a fact that influenced in the great individual variation presented by the area under curve. The mean residence time (MRT) of this drug was higher in 1 and 7 days old calves ($25,60 \pm 7,30$ and $31,87 \pm 7,37$ h, respectively) than the others treated groups (28 days old calves = $18,10 \pm 3,47$ h; bulls = $11,96 \pm 6,43$ h; heifers = $14,60 \pm 9,37$ h; steers = $11,74 \pm 8,47$ h). Although not other pharmacokinetic differences were observed, the chlorpyrifos treatment caused differences in AChE and BChE inhibition in function of development, the sex, the castration and the treatment season, which could be influenced by kinetics factors occulted by the rapid metabolization and great bioactivation to chlorpyrifos-oxon, or by pharmacodynamic factors. The present study represents a contribution to understand the necessity to establish a dosage regimen according to physiological and environmental conditions in order to prevent intoxication episodes as well as the residue generation that could affect humans or the environment.

Introducción

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- CLORPIRIFÓS

I.1.1.- Generalidades

El clorpirifós es un compuesto organofosforado que a pesar de haber sido introducido en el mercado de los plaguicidas en el año 1965 continúa ocupando un importante volumen de venta, tal como lo muestra el informe del Ministerio de Salud de la República Argentina, donde indica que en el año 2002 de los 13,6 millones de litros de plaguicidas producidos, los tres más comercializados fueron clorpirifós, cipermetrina y endosulfan (García y col., 2003).

Se estima que en la actualidad aproximadamente el 85% de los plaguicidas empleados en el mundo se destinan al sector agropecuario. La existencia de numerosas especies de ectoparásitos de gran impacto sanitario y económico, ha determinado el uso del clorpirifós en el sector pecuario para el control de garrapatas, ácaros, piojos, pulgas, moscas, y tábanos. En el área agrícola se utiliza en el control de aquellos artrópodos que afectan los cultivos de cereales y oleaginosas, plantaciones frutales, explotaciones forestales, producciones de verduras y hortalizas, así como en las pasturas destinadas a la alimentación del ganado (United States Environmental Protection Agency, 2002).

El clorpirifós también es empleado en los programas sanitarios de control de artrópodos, ya que muchos de éstos se comportan como vectores u hospedadores intermediarios de agentes patógenos responsables de enfermedades tales como malaria, chagas, dengue, oncocercosis, filariasis, esquistosomiasis, leishmaniasis y fiebre amarilla, representando todas ellas un serio problema de salud pública en los países de América Latina (Cox, 1994a).

A esto se debe sumar el uso domiciliario, ya que es empleado para el control de diversos insectos presentes en los hogares, tal el caso de cucarachas, hormigas y moscas, además del control de ectoparásitos que afectan a animales de compañía y que por ende están en íntimo contacto con el ser humano (United States Environmental Protection Agency, 2002).

I.1.2- Características químicas

El clorpirifós, cuyo nombre químico es *O,O*-dietil *O*-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotionato se presenta como cristales sólidos incoloros a blanco amarillento. En la Figura I.1 se puede observar su estructura química y en la Tabla I.1, sus principales características fisico-químicas.

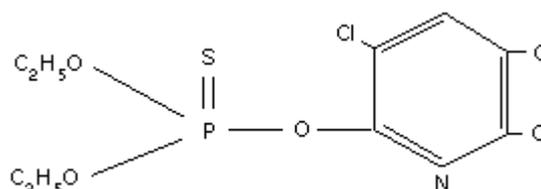


Figura I.1: Estructura química del clorpirifós

Tabla I.1. Principales características fisico-químicas del clorpirifós.

Características físico-químicas	
Nombre genérico:	Clorpirifós
Nombre químico:	<i>O,O</i> -dietil <i>O</i> -3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotionato
Fórmula empírica	C ₉ H ₁₁ O ₃ NSPCl ₃
Peso molecular:	350,5
Punto de fusión	41,5 - 43,0 °C
Forma física	Cristales sólidos
Color	Cristales incoloros a blancos amarillento
Coefficiente partición octanol:agua	4,82
Solubilidad en agua a 20 °C	0,7 mg/L
Solubilidad en agua a 25 °C	2,0 mg/L
Solubilidad en isooctano	79% p/p
Solubilidad en metanol	43% p/p

I.1.3.- Farmacocinética.

Son relativamente escasos los trabajos que describen el comportamiento farmacocinético del clorpirifós, habiéndose desarrollado la mayoría de ellos en humanos y roedores.

El clorpirifós se absorbe prácticamente por cualquier vía, aunque es preciso señalar que la forma farmacéutica y los excipientes empleados influyen

considerablemente en la velocidad de absorción (Costa, 2006), más aún si se tiene en cuenta la diversidad de preparados comerciales que existen en el mercado. En humanos, la absorción dérmica de clorpirifós aplicado a la dosis de $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ fue estimada en un 9,6% (Thongsinthusak y col., 1999). Menores porcentajes de absorción fueron reportados por otros autores, así Nolan y colaboradores (1984) indicaron que el porcentaje de absorción era del 1,3% y que las concentraciones plasmáticas de clorpirifós luego de ser aplicado a una dosis de 5 mg/kg de peso vivo no superaban los 30 $\mu\text{g}/\text{L}$. Este porcentaje de absorción fue corroborado posteriormente por Griffin y colaboradores (2000) reportando que la absorción de clorpirifós por vía tópica en dosis de 28,59 mg por individuo era del 1%.

En ratones, la absorción oral es escasa, ya que tras la administración de 3, 9 o 30 mg/kg de fármaco, sólo con la dosis más alta se lograron concentraciones plasmáticas cuantificables, obteniéndose la máxima concentración (359 ng/mL) a los 40 min post administración, siendo la biodisponibilidad del 13% (Yuan, 1994). También fue baja la absorción observada en ratas tratadas con dosis de 5 o 10 mg/kg de clorpirifós por vía oral, tal como lo indica el parámetro cinético área bajo la curva (*AUC*), el cual fue de 153 y 375 ng·h/mL, respectivamente. En este caso la máxima concentración plasmática ($C_{\text{máx}}$) se alcanzó a las 3 h post administración (Mattsson y col., 2000). Las peculiaridades digestivas que presentan los rumiantes hacen que la absorción sea aún menor, así se ha descrito que tras la administración a cabras de una dosis de 150 mg/kg de clorpirifós, sólo se alcanzó una C_{max} de 3,70 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo muy lento el proceso, ya que el tiempo de latencia y el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima (t_{max}) fueron de 3 h y 12 h, respectivamente (Koley y col., 1997).

El análisis farmacocinético del clorpirifós efectuado en diferentes especies se ajusta a un modelo bicompartimental (Yuan, 1994; Koley y col., 1997). Al ser un compuesto muy liposoluble, es ampliamente distribuido por todo el organismo (Smith y col., 1967). Así, este compuesto presentó en roedores tras su administración intravenosa, un amplio volumen de distribución en estado de estacionario ($V_{d_{ss}}$ 1,8 L/kg) y una rápida distribución ($t_{1/2\alpha}$: 6 min) (Yuan, 1994). Este mismo comportamiento también ha sido observado en cabras ($V_{d_{\text{área}}}$: 3,10 L/kg) (Koley y col., 1997).

El clorpirifós es biotransformado mediante distintas reacciones metabólicas (Figura 1.2). En una de ellas, el compuesto es bioactivado por medio del sistema microsomal citocromo P450 (CYP) mediante una reacción de desulfuración oxidativa, siendo estas enzimas quienes transforman los organofosforados en el metabolito activo, ester fosfato u oxón (Smith y col., 1967; Tang y col., 2001). En el caso del clorpirifós, este metabolito, clorpirifós-oxón, es aproximadamente mil veces más potente que la droga madre en su capacidad para inhibir la enzima acetilcolinesterasa (Tang y col.; 2006). Esta bioactivación se desarrolla tanto en los vertebrados como en los invertebrados, siendo el oxón posteriormente desactivado por hidrólisis, mediante esterasas tipo A, originando dietilfosfato y 3,5,6-tricloropiridinol (TCP).

Las esterasas tipo A, también conocidas con la denominación de arilesterasas o paraoxonasas constituyen un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la sangre y los tejidos de prácticamente todos los seres vivos, siendo capaces de hidrolizar una gran variedad de ésteres, incluyendo a los organofosforados. De todos modos es importante consignar que los organofosforotionatos no sirven como sustrato de la enzima, por lo que sólo los organofosfatos que poseen un grupo P=O o los oxones pueden ser metabolizados por las esterasas tipo A (Tang y col., 2006).

Esta enzima presenta mucha más afinidad por el clorpirifós-oxón y el diazinón-oxón que por otros organofosforados. Posiblemente este accionar explica la moderada toxicidad que presentan estos compuestos cuando se los compara con otros fosforotionatos (Omenn, 1987). Esta hipótesis se ha corroborado en un estudio *in vivo* realizado con roedores, en el que se demostró que la administración previa de paraoxonasa reducía 2,5 veces el grado de inhibición de la AChE originada por la administración de clorpirifós-oxon (Costa y col., 1990).

Mediante una segunda vía metabólica, también dependiente de las enzimas CYP, el clorpirifós es directamente inactivado por una reacción de desarilación, transformándose en dietiltiofosfato y 3,5,6-tricloropiridinol (Smith y col., 1967).

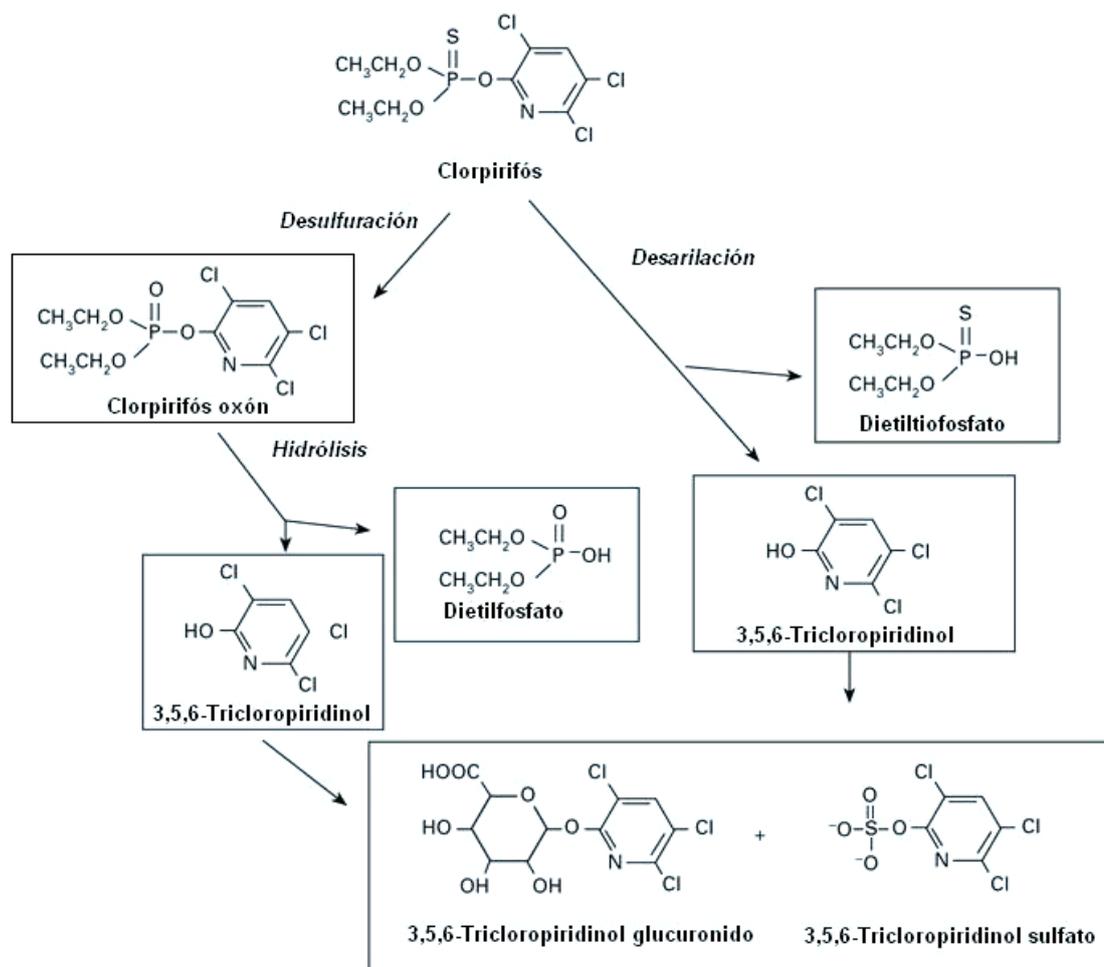


Figura I.2. Vías metabólicas del clorpirifós. Tomado de Smith y colaboradores, 1967.

Dado que las reacciones de desulfuración oxidativa y de desarilación compiten por el sustrato, existe una relación CYP dependiente entre la bioactivación y desactivación a las cuales son expuestos los fosforotiónatos. Esta relación varía para cada CYP en particular (Tang y col., 2001).

Dentro de las enzimas CYP de los microsomas hepáticos humanos, las isoformas CYP1A2, 2B6, 2C19 y 3A4 están implicadas en el metabolismo del clorpirifós. CYP2B6 es la isoforma que presenta mayor actividad de desulfuración oxidativa, en tanto que la desarilación se manifiesta mayoritariamente en CYP2C19. La CYP3A4 presenta tanto actividad de desulfuración como de desarilación. Es por eso que los individuos que poseen una alta expresión de CYP2C19, pero baja actividad de 3A4 y 2B6 son más activos en la desarilación que en la desulfuración. Del mismo modo, los

individuos que tienen una alta actividad de CYP2B6 y 3A4, presentan un mayor potencial para la activación del clorpirifós (Tang y col., 2001).

Las carboxiesterasas constituyen otro de los contribuyentes a la detoxificación de los oxones, incluyendo a aquellos de baja afinidad por las esterasas tipo A. Representa un mecanismo defensivo contra los oxones generados a nivel hepático, ya que se combina estequiometricamente con los mismos antes que alcancen el sistema nervioso central, lo cual conduce a la fosforilación de la carboxiesterasa y a la anulación del organofosforado. Es importante consignar que éste es un proceso saturable, por lo que afecta sólo a bajas concentraciones del oxón, y por lo tanto, su eficacia en la detoxificación es sumamente baja en los casos de exposiciones a altas dosis de organofosforados (Tang y col., 2006).

Los metabolitos surgidos de las reacciones de fase I son luego conjugados con glucurónidos o con sulfatos, transformándose en sustancias hidrosolubles fácilmente excretables por orina (Tang y col., 2006).

Todos estos procesos de eliminación determinan que la permanencia del clorpirifos en el organismo sea relativamente corta, comparada con la de sus metabolitos, y teniendo en cuenta que algunos de ellos mantienen la actividad farmacológica, se les debe prestar una atención especial. En ratones la semivida de eliminación es aproximadamente de una hora cuando se administra por vía intravenosa; esta permanencia se incrementa cuando es administrado por vías extravasales debido a que la absorción limita la eliminación (Yuan 1994). En cabras el tiempo medio de eliminación es de 4,16 h cuando es administrado por vía oral (Koley y col., 1997).

Resulta muy complejo caracterizar el perfil cinético del clorpirifós-oxon, ya que al ser rápidamente metabolizado, es muy difícil de cuantificar en plasma, tal como lo demuestra el estudio de Mattsson y colaboradores (2000), quienes a las 4 horas post tratamiento de ratas con clorpirifós en dosis de hasta 5 mg/kg no detectaron clorpirifós-oxón en plasma, pero si TCP (2,048 µg/g), descendiendo la concentración de este metabolito hasta 0,071 µg/g a las 26 horas posteriores a la dosificación.

También en ratones, la permanencia del metabolito TCP fue más prolongada que la del clorpirifós, así cuando se administró por vía intravenosa la semivida de eliminación fue de 48 min para el clorpirifós y de 179 min para su metabolito. En tanto, tras la administración oral de 30 mg/kg, la máxima concentración plasmática del metabolito ocurrió entre 10 a 40 minutos post administración, en tanto que la semivida de eliminación del metabolito varió entre 110 a 229 minutos. Esto demuestra la rapidez con que el clorpirifós es metabolizado, ya que prácticamente se alcanzó al mismo tiempo la C_{max} para el metabolito que para la droga madre (Yuan, 1994).

Los resultados obtenidos a la hora de evaluar la depleción tisular del clorpirifós y sus metabolitos indican que su mayor permanencia se encuentra en la grasa. En roedores, la semivida terminal del clorpirifós en hígado y riñón fue superior a 20 h, aunque el valor más elevado fue el que se registró en el tejido adiposo, con una semivida de 62 h (Smith y col., 1967). En cabras, a las cuales se les administró durante 10 días clorpirifós radiomarcado incorporándolo al alimento a una concentración de entre 15 a 19 ppm, se encontró que aproximadamente el 80% del compuesto marcado se recuperaba en orina, mientras que sólo se hallaba el 2,6% en heces, el 0,9% en intestino, el 0,8% en tejidos y el 0,1% en leche (IPCS INCHEM, 1999). Sin embargo, cuando a estos rumiantes se les administró una dosis única de 150 mg/kg por vía oral, el clorpirifós fue excretado en una mayor cantidad y durante más tiempo por heces que por orina (heces: 168 h; orina: 96 h) (Koley y col., 1997). El principal metabolito identificado en orina fue el glucurónido de TCP, aunque se hallaron pequeñas cantidades de TCP no conjugado. En grasa el principal residuo fue el clorpirifós mientras que en hígado y riñón fue el TCP (IPCS INCHEM, 1999), lo cual es coincidente a lo reportado por Dishburger y colaboradores (1977), quienes indicaron que también en los bovinos es en la grasa donde se encuentran los mayores residuos titulares de clorpirifós, y donde permanecen por mayor tiempo.

I.1.4.- Mecanismo de acción

La enzima acetilcolinesterasa, responsable de hidrolizar a la acetilcolina, es el sitio principal de actuación del clorpirifós (Casida y Quistad, 2004). El grupo fosfato (P=O) del clorpirifós fosforila al hidroxilo de la serina de la AChE, impidiendo que la

misma actúe sobre su sustrato fisiológico. La unión entre el fósforo y la enzima es mucho mas fuerte y estable que lo que se establece entre el carbono del acetato de la acetilcolina y la enzima, lo cual determina que la defosforilación, o sea la recuperación de la enzima, se realice a una velocidad sumamente lenta, lo que prácticamente equivale a una inhibición de carácter irreversible (Costa, 2006).

Una vez que la enzima ha envejecido, es decir, que ha perdido uno de los grupos alquilo (Figura I.3) la inhibición es de carácter irreversible, por lo que la actividad se recupera únicamente por síntesis de nueva enzima.

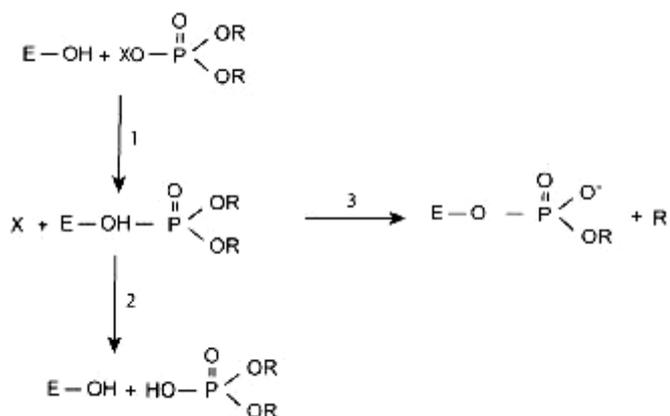


Figura I.3. Interacciones bioquímicas entre los organofosforados y la enzima acetilcolinesterasa. 1: fosforilación de la enzima. 2: reactivación espontánea de la acetilcolinesterasa. 3: enzima fosforilada envejecida y estable. (E-OH, sitio activo de la enzima)

La inhibición enzimática trae aparejado que la acetilcolina se acumule en los sitios en los que ésta se libera fisiológicamente, tanto en el SNC como en las terminaciones nerviosas periféricas, pudiendo por lo tanto producir, la estimulación de los receptores muscarínicos en los órganos efectores vegetativos; la estimulación, seguida de depresión o parálisis, de todos los ganglios vegetativos y de la musculatura esquelética por activación nicotínica, y la estimulación con ocasional depresión posterior de receptores colinérgicos centrales (Meerdink, 1989).

Es también precisamente la inhibición de esta enzima la responsable del efecto farmacológico del clorpirifós en el control de artrópodos, sumado al hecho que éstos individuos presentan una muy baja capacidad para eliminar a los OF (Fukuto, 1990).

El clorpirifós también inhibe la butirilcolinesterasa (BChE), lo cuál a pesar de que no genera signos clínicos de relevancia, es sumamente importante ya que los valores de actividad de esta enzima son de utilidad para valorar la exposición a compuestos organofosforados y carbamatos (Costa, 2006).

Una tercer esterasa que también puede resultar inhibida por algunos organofosforados es la esterasa neurotóxica (NTE). Muchos compuestos, incluyendo a los carbamatos, pueden inhibir esta enzima, pero sólo son los OF quienes ocasionan el envejecimiento de la misma y originan un cuadro de neuropatía periférica retardada (OPIDP) que se presenta entre 2 a 3 semanas posteriores a la exposición a un OF (Lotti y Moretto, 2005). Tanto la fosforilación como el proceso de envejecimiento que originan los OF sobre la NTE son semejantes a los que sufre la AChE (Costa, 2006). La inhibición de esta enzima constituye el segundo mecanismo en importancia para explicar la toxicidad de los organofosforados (Casida y Quistad, 2004).

Debido a la gran trascendencia que tienen las enzimas AChE y BChE en el desarrollo de este trabajo, se abordará este tema con mayor profundidad en el apartado correspondiente a Colinesterasas.

1.1.5.- Efectos tóxicos del clorpirifós

1.1.5.1.- Neurotoxicidad aguda

En general, los síntomas de intoxicación por insecticidas organofosforados corresponden a la hiperactividad colinérgica y pueden agruparse en tres categorías diferentes: periférica muscarínica, periférica nicotínica y sobre el sistema nervioso central. Es importante tener presente que no todos los animales desarrollan la totalidad de signos clínicos al intoxicarse con un compuesto organofosforado (Aardema y col., 2008).

A nivel periférico, los principales signos muscarínicos son sialorrea, hipersecreción y espasmo bronquial, bradicardia, miosis, cólico abdominal, vómitos y diarrea. Los efectos nicotínicos radican en fibrilaciones y contracciones musculares irregulares. En algunas circunstancias se produce tetania generalizada determinando que

el animal camine como si estuviese entablillado, con las extremidades rígidas. Esta hiperactividad suele ir seguida por debilidad y parálisis de los músculos esqueléticos por agotamiento, cuando la acetilcolina se ha acumulado en grandes proporciones en las uniones mioneurales (Buck y col., 1981).

Sobre el sistema nervioso central se pueden presentar efectos de ansiedad, inquietud e hiperexcitabilidad, que en el caso de caninos y felinos puede progresar hasta provocar contracciones convulsivas. Una gran proporción de animales presenta depresión grave del sistema nervioso en las etapas avanzadas de la intoxicación (Buck y col., 1981).

Existen varios reportes que describen casos de intoxicación en toros luego de la aplicación *pour-on* de clorpirifós a dosis terapéuticas, (Lein y col., 1982; Haas y col., 1983; Scarrat y Blodgett, 1986). Un episodio de especial relevancia fue el observado en toros en un centro de inseminación artificial de Estados Unidos. En esa ocasión se trataron 185 toros de raza holstein con el producto Dursban 44[®] (clorpirifós 43,2%), de los cuales aproximadamente un cuarto comenzó a manifestar un cuadro de intoxicación entre 4 y 7 días después del tratamiento. Los signos que presentaron incluían letargia, depresión, debilidad, diarrea y deshidratación, mínima salivación, ocasionales temores musculares y ataxia. En ninguno de los animales se evidenciaron episodios convulsivos. Un total de 7 toros murieron entre 5 y 61 días posteriores al tratamiento. Los que murieron en forma tardía presentaron una prolongada deshidratación, extrema pérdida de peso, atonía ruminal e intestinal seguida por peritonitis (Lein y col., 1982).

La respuesta tóxica al clorpirifós puede presentar diferencias ligadas al sexo. En roedores, Gaines (1969) observó en estudios de toxicidad aguda que las ratas hembras eran casi dos veces más sensibles al clorpirifós, sin embargo, estudios posteriores no encontraron estas diferencias (McCollister y col., 1974; Moser y Padilla, 1998), pero si indicaron que los machos se recuperaban con más facilidad que las hembras (Moser y Padilla, 1998). En otros trabajos se ha demostrado que las ratas hembras manifestaban mayores efectos neurotóxicos (Mattsson y col., 1996) e hipotérmicos (Gordon y col., 1997) que los machos.

El clorpirifós también presenta diferencias en la toxicidad aguda en función de la edad de los individuos, ya que son varios los trabajos que indican que las ratas jóvenes son más sensibles que las adultas (Pope y col., 1991; Pope y Chakraborti, 1992; Whitney y col., 1995; Atterberry y col., 1997; Moser y Padilla, 1998). En un estudio desarrollado en cerdos, a los cuales se les aplicó clorpirifós al 2,5%, en forma de spray sobre la superficie corporal, también se observó que los más jóvenes eran los más sensibles, ya que encontraron que este tratamiento producía mortalidad en los individuos tratados a las 3, 6 o 24 h posteriores al nacimiento, en tanto que cuando el tratamiento se aplicaba a cerdos de 36 h de vida no se producía mortalidad (Scheidt y col., 1987). Los terneros jóvenes, de igual forma, son más sensibles que los adultos, así individuos con edades que oscilaban entre 1 y 2 semanas presentaron un severo cuadro de intoxicación cuando fueron tratados con clorpirifós en spray al 0,12%; sin embargo, cuando el compuesto se aplicó a concentraciones 7,5 veces superiores en animales que tenían entre 4 y 6 semanas de vida, no se observaron signos de toxicidad (Palmer y col., 1980).

I.1.5.2.- Síndrome intermedio

Una segunda forma de manifestación a la exposición a los organofosforados es el llamado síndrome intermedio. Este cuadro se presenta en un 20 a 50% de los pacientes que desarrollaron el cuadro agudo. El síndrome aparece a los pocos días de la exposición, bien durante la fase de recuperación de las manifestaciones colinérgicas, o en algunos casos, cuando los pacientes están completamente recuperados de la crisis colinérgica inicial (Costa, 2006).

Las principales manifestaciones que presentan los individuos afectados por el síndrome intermedio incluyen la debilidad de los músculos respiratorios, del cuello y de los miembros anteriores. La mortalidad debido a la parálisis respiratoria y otras complicaciones oscila entre un 15 y 40%. La recuperación de los pacientes que sobreviven requiere aproximadamente 15 días (Costa, 2006).

Es importante señalar que este síndrome no es una consecuencia directa de la inhibición de la AChE, y que hasta el momento no se ha dilucidado completamente la

patogenia de este cuadro. Una hipótesis vincula la debilidad muscular con la desensibilización colinérgica ocasionada por una prolongada estimulación colinérgica (Lotti, 2001).

I.1.5.3.- Neurotoxicidad retardada

Tal como se citó anteriormente, la aplicación de algunos OF puede desencadenar un cuadro de neuropatía periférica retardada; precisamente, el clorpirifós es uno de ellos. Los signos característicos de este cuadro incluyen síntomas de alteraciones sensitivas leves, pero pueden evolucionar a ataxia, fatiga de los músculos de los miembros inferiores y parálisis muscular. Este cuadro aparece entre las dos y tres semanas posteriores a la aplicación del fármaco (Costa, 2006).

Este síndrome es una axonopatía sensitivomotora bilateral que afecta a los axones y terminales nerviosas, alterando en un primer momento a las fibras largas mielínicas. La lesión se caracteriza por tumefacción, segmentación y rotura axonal con desmielinización secundaria (Lotti y Moretto, 2005).

Esta polineuropatía no está relacionada con la inhibición de la acetilcolinesterasa, ya que un compuesto que generalmente causa esta patología, el tri-orto-cresil-fosfato, es un inhibidor muy débil de la AChE. Se han desarrollado muchos estudios tratando de dilucidar cual es el causante de este cuadro clínico, habiéndose identificado una esterasa como posible responsable, a la cual se la denomina esterasa neurotóxica (Johnson, 1982; Loti, 1991).

La fosforilación de la NTE es similar a la observada sobre la AChE, ya que para que se desarrolle el cuadro de OPIDP es necesario la fosforilación y envejecimiento de aproximadamente el 70% de la esterasa. Estos procesos se producen en unas horas, y los primeros signos clínicos de este síndrome sólo son evidentes varias semanas más tarde. Además, hay que tener en consideración la participación de otros compuestos que inhiben la NTE y no producen OPIDP, pero pueden actuar como promotores de la misma (Costa, 2006).

La edad influye en la susceptibilidad a padecer esta neuropatía, siendo los animales jóvenes más resistentes que los adultos; así, en pollos jóvenes debe fosforilarse el 90% de la NTE para que se desarrolle el cuadro, mientras que en gallinas adultas con un 70% de inhibición es suficiente (Peraica y col., 1993).

La NTE pertenece a una familia de proteínas presente tanto en procariotas como en eucariotas. De sus 1327 aminoácidos constitutivos, los 200 próximos a la cadena C terminal están altamente conservados entre las diferentes especies animales (Lush y col., 1998). Se ha demostrado que esta NTE, en células de mamíferos y en levaduras, tiene la capacidad de degradar fosfatidilcolina a glicerofosfolina, por lo que desempeñaría un importante rol en la homeostasis lipídica (Zaccheo y col., 2004). Existe evidencia que esta NTE podría ser una lisofosfolipasa que hidroliza a la lisolecitina, el principal fosfolípido de la membrana, el cuál posee propiedades desmielinizantes (Quistad y Casida, 2004).

Es raro que ocurran actualmente los focos epidémicos de esta neuropatía que se producían en el pasado, ya que antes de su aprobación, estos compuestos deben evaluarse en gallina mediante pruebas de neurotoxicidad para determinar si origina OPIDP, empleándose esta especie en edad adulta por ser la que presenta mayor sensibilidad. Hay que tener en cuenta que actualmente todavía se comercializan tres OF (metamidofos, triclorfón y clorpirifós) capaces de producir el cuadro en seres humanos, pero para que se desarrolle, los individuos deben estar expuestos a dosis muy elevadas, tal como acontece en intentos de suicidio (Lotti y Moreto, 2005).

I.1.5.4.- Efectos sobre la reproducción

El clorpirifós puede originar problemas reproductivos en animales de laboratorio; así, luego de la administración incorporado a la comida de las ratas preñadas se evidenció que cuando se aplicaba en dosis elevadas las crías presentaban bajo peso al nacer, reducción de la supervivencia y en algunos casos malformaciones óseas y que si se suministraba a dosis bajas originaba defectos craneales (Deacon y col., 1980; California Environmental Agency, 1993).

Otras formas de exposición al clorpirifós también causaron problemas reproductivos en roedores preñados. Así, la aplicación por vía parenteral ocasionó un incremento en la mortalidad fetal, un menor peso al nacer y problemas neurológicos en los que sobrevivieron (Muto y col., 1992). La exposición dérmica en roedores originó una elevada mortalidad en los progenitores y las hembras preñadas que sobrevivieron generaron camadas poco numerosas y de bajo peso al nacimiento, de los cuales muchos morían a las pocas horas de nacer (Gregory y col., 1993).

Durante el desarrollo embrionario, el clorpirifós también puede provocar varios efectos nocivos; así cuando los cultivos de embriones de ratas fueron expuestos a concentraciones de 1 μM de clorpirifós se presentaron anomalías mitóticas y apoptosis en células del neuroepitelio (Roy y col., 1998). En otro estudio desarrollado en ratas tratadas con clorpirifós por vía subcutánea se observó que los embriones presentaban cambios en proteínas neuronales específicas, muchas de ellas asociadas a procesos de transporte o trasducción de señales, y específicamente alteraciones en los receptores serotoninérgicos (Aldridge y col., 2003), así como alteraciones en las células de la glía (García y col., 2005). Además, la aplicación prolongada de clorpirifós en ratas preñadas originó alteraciones en el comportamiento y debilidad muscular en la prole (Terry y col., 2003), así como también disturbios en la neurotransmisión colinérgica presináptica (Richardson y Chambers, 2003).

Las alteraciones reproductivas también se observaron en rumiantes. Los toros de un centro de inseminación artificial tratados con Dursban 44[®], presentaron una marcada disminución en la producción de esperma (57-88%) durante los 6 meses siguientes a la exposición, observándose una mayor reducción en aquellos animales con más signos clínicos de intoxicación (Everett, 1982). En una segunda granja, en la que también se realizó el mismo tratamiento, pero en la que se procedió al lavado de todos los animales tratados después de que aparecieran animales enfermos en la primera granja, sólo se apreció una disminución del 7% en la producción espermática, y ninguno de los animales manifestó signos nerviosos compatibles con intoxicación por organofosforados. Existen otros autores que describen una menor inhibición (16%) de la producción de esperma

tras el tratamiento con CPF (Lein y col., 1982). Posiblemente estos distintos resultados estén relacionados con diferencias medio ambientales.

I.1.5.5.- Mutagenicidad

Si bien los resultados obtenidos en diversas evaluaciones, realizadas para poder registrar en Estados Unidos especialidades que contengan CPF como principio activo, han indicado que el mismo no posee capacidad mutagénica (California Environmental Protection Agency, 1993), existen datos que indican que el clorpirifós puede modificar el material genético. En un estudio desarrollado con células de linfonódulos humanos se presentó un incremento en las mutaciones, caracterizada por un intercambio de material genético entre cromátidas hermanas (Sobti, 1982). El mismo tipo de mutación se observó en glóbulos blancos expuestos al clorpirifós (Nelson y col., 1990).

I.1.5.6.- Carcinogenicidad

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos en su informe del año 1994, clasificó al clorpirifós como no cancerígeno, ya que los ensayos remitidos para el registro de productos a base de clorpirifós indicaron que, cuando el mismo era administrado en el alimento de ratas o ratones durante por lo menos dos años no se evidenciaba un incremento en la tasa de tumores.

Es importante consignar que en muchos casos se utilizó xileno como excipiente para las formulaciones a base de clorpirifós, del cual existen reportes que indican que este compuesto aumentó la tasa de leucemia en trabajadores expuestos por vía aerógena; además es capaz de potenciar el efecto cancerígeno en piel de otros compuestos aplicados por vía dérmica en animales de laboratorio (Cox, 1994b).

I.1.5.7.- Efectos sobre el sistema inmune

En individuos expuestos durante aproximadamente 5 años al clorpirifós se ha registrado un incremento en la frecuencia de padecimientos alérgicos y modificación en la población de linfocitos, ya que se produce una disminución en los linfocitos T y un incremento en los linfocitos CD26; este aumento está asociado a trastornos de autoinmunidad (Thrasher y col., 1993).

I.1.6.- Efectos ecológicos

El clorpirifós además de actuar sobre los organismos a los cuáles se quiere controlar, ejerce efectos tóxicos, tanto agudos como crónicos, sobre un gran número de organismos no diana. Esto trae aparejado cambios importantes en el ecosistema, ya que los efectos no son sólo directos sobre la especie afectada sino también indirectos, ya que produce modificaciones en los nichos ecológicos (Cox, 1994c).

I.1.6.1.- Efectos sobre los insectos benéficos

Un efecto común que se presenta con los insecticidas de amplio espectro es que actúan también sobre insectos benéficos, incluyendo aquellos que parasitan o destruyen al organismo blanco que se pretendía controlar. Un estudio desarrollado por la Organización Internacional de Control Biológico demostró que la aplicación de clorpirifós causó un 80% de mortalidad en 17 de las 23 especies de insectos benéficos estudiadas (Hassan, 1988).

I.1.6.2.- Efectos sobre los peces

El clorpirifós es sumamente tóxico para los peces, tanto de agua salada como dulce. En términos generales, exposiciones a concentraciones de 3 ppm son letales para estos animales (Cox, 1994c). El clorpirifós, cuando alcanza en el agua concentraciones de 1 ppb, causa una importante inhibición de la actividad de la AChE, la cual no retorna a valores normales hasta 15 a 69 días posteriores de haber retirado los peces del agua contaminada; este efecto fue constatado en varias especies de peces, como *Pimephales promelas*, *Lebistes reticulatus* y *Fundulus heteroclitus* (Thirugnanam y col. 1977, Jarvinen y col., 1983, van der Wel y Welling, 1989). Además, debemos destacar que la presencia de clorpirifós en el agua puede originar una disminución del crecimiento de los peces (2 ppm en *Leuresthes tenuis*; Goodman y col., 1985), nefrotoxicidad (2 ppb en *Heteropneustes fossilis*; Srivastava y col., 1990) y una reducida tolerancia térmica (5 ppb en *Gambusia affinis*; Johnson, 1978).

El efecto del clorpirifós sobre los organismos acuáticos no sólo es severo, sino que en algunos casos es sumamente persistente. En un accidente ocurrido en Inglaterra en el año 1985, se derramaron 500 L de Dursban 44[®] en un río cuando volcó el camión que lo transportaba. Como consecuencia de este accidente, todos los invertebrados

acuáticos virtualmente desaparecieron. Si bien el clorpirifós se dejó de detectar en las aguas de forma relativamente rápida, por ser arrastrado por la corriente y sufrir procesos de degradación, los efectos biológicos permanecieron por aproximadamente un año, y no se restablecieron los niveles normales de invertebrados acuáticos previos al accidente hasta transcurridos dos años (Boreham y Birch, 1990).

El efecto del clorpirifós sobre los organismos acuáticos se agrava por la bioconcentración que sufre. Esta sustancia tiene más afinidad por los tejidos que por el agua, en consecuencia, puede alcanzar concentraciones más elevadas en organismos que en el agua. La extensión de la bioconcentración se expresa mediante el Factor de Bioconcentración (FBC), el cuál se calcula dividiendo la concentración en los tejidos (mg/kg) por la concentración en el agua (mg/L). El FBC para el clorpirifós varía entre 220 a 5000 L/kg, tanto en condiciones experimentales como naturales (Racke, 1993). Esta situación conlleva a que se presente biomagnificación, por lo que una serie de organismos en la cadena alimentaria acumulan el tóxico en la grasa en cantidades crecientes en cada nivel alimentario superior, hasta que, por último afecta a la especie que ocupa el vértice de la pirámide alimentaria, de forma muy marcada.

I.1.6.3.- Efectos sobre las aves

El impacto ambiental como consecuencia de la aplicación de clorpirifós también se manifiesta de forma especial en las aves, debido a la mayor sensibilidad que poseen a los efectos tóxicos de los OF, relacionado con el déficit de paroxonasa en la mayoría de la especies aviares (Thompson, 1993). Por ello, además de ser la especie de elección en las fases de evaluación de nuevos OF, son unos indicadores medio-ambientales excelentes. Como ejemplo, podemos citar una fuerte intoxicación que sufrieron diferentes especies de passeriformes en el Reino Unido luego de la aplicación de clorpirifós en un cultivo, que originó la muerte de 200 verderones (*Carduelis chloris*) y pardillos comunes (*Carduelis cannabina*) (Simpson, 1984).

Aunque los procesos de intoxicación aguda con efecto letal son muy llamativos, tiene una especial relevancia la exposición crónica a dosis bajas, puesto que origina anorexia (Brust y col., 1971), reducción en la eficiencia de conversión alimenticia

(Schlinke, 1970) y disminución en los índices reproductivos, entre otros efectos. Todas estas consecuencias podrían estar contribuyendo al declive de ciertas poblaciones de aves silvestres (Cox, 1994c).

Entre los factores que afectan la toxicidad en las aves se encuentra la exposición a condiciones estresantes, así, las temperaturas frías aumentan la sensibilidad a la intoxicación (Maguire y Williams, 1987).

I.1.6.4.- Efectos sobre los organismos del suelo

Las lombrices son sumamente sensibles al clorpirifós, aunque existe una marcada diferencia dependiendo de la especie, ya que *Lumbricus rubellus* es 10 veces más sensible que *Eisenia foetida* (Roberts y Dorough, 1984; Ma y Bodt, 1993).

El clorpirifós inhibe, además, el crecimiento de hongos del suelo (El-Hissy y Abdel-Kader, 1980; Beaty y Sohn, 1986) y de algas verde azuladas (Lal y col., 1987) y bacterias (Martinez Toledo y col., 1992) fijadoras de nitrógeno al suelo.

I.1.7.- Interacciones farmacológicas del clorpirifós

El clorpirifós puede interaccionar con otros compuestos químicos potenciando su propio efecto o el del otro compuesto. Se observó que en ratas, la adición de ácido ascórbico a la dieta duplica la toxicidad del clorpirifós (Enan y col., 1982). En perdices, el tratamiento previo con el fungicida procloraz incrementó un 80% la inhibición que produce el clorpirifós sobre la colinesterasa (Johnston y col., 1990).

Un aspecto que debemos destacar es la presencia de excipientes inertes en la formulación de ciertas especialidades que contienen clorpirifós. Del análisis de las formulaciones comercializadas hasta el año 1996 en los Estados Unidos, se pudo evidenciar que entre “excipientes inertes” se incluía: xileno, 1,2,4-trimetilbenzeno, etiltolueno, propilenglicol y 1,1,1-tricloroetano. Éstos compuestos pueden causar desde irritación de piel, mucosas y vías respiratorias superiores hasta aumentar la incidencia de ciertos tipos de tumores, como ocurre con el xileno y el 1,1,1-tricloroetano (Cox, 1994c).

I.1.8.- Diagnóstico de la intoxicación por clorpirifós

I.1.8.1.- Historia clínica

La historia clínica debe enfatizar la búsqueda de antecedentes del individuo intoxicado. Esta información es de gran importancia no sólo para determinar si la intoxicación es de origen accidental o intencional, sino para recoger datos útiles, que permitan conocer detalles como la vía de ingreso, el tiempo de exposición, la composición química del plaguicida, la cantidad de producto a la que fue expuesto el paciente y la posible contaminación de otros individuos (Buck y col., 1981).

I.1.8.2.- Examen físico

Al momento de efectuar el examen físico, se debe tener presente que en la intoxicación por plaguicidas inhibidores de colinesterasas la aparición de signos y síntomas depende del grado de inhibición de la enzima y, en alguna medida, de la rapidez de este proceso. Generalmente, luego de la exposición a clorpirifós por vía tópica, los signos comienzan 3 a 4 días posteriores al contacto con el plaguicida (Meerdink, 1989).

I.1.8.3.- Pruebas de laboratorio

La determinación de la actividad colinesterásica en sangre es la prueba de laboratorio que se utiliza como ayuda diagnóstica en la intoxicación por plaguicidas organofosforados y carbamatos (Buck y col., 1981; Eddleston y col., 2008).

En la actualidad se cuenta con una amplia gama de métodos de laboratorio para medir la inhibición de la colinesterasa, los que se seleccionan generalmente en función a los recursos disponibles en cada país. Es muy importante tener presente, al momento de interpretar un resultado de la actividad de la colinesterasa, cuál fue el método utilizado y los valores normales que se obtienen localmente con ese método (Sanz y Repetto, 1995).

Es importante recordar que el descenso de la butirilcolinesterasa en el plasma y/o de la actividad acetilcolinesterásica de los eritrocitos, constituyen índices

bioquímicos relevantes para el diagnóstico, ya que hacen evidente la exposición a organofosforados y carbamatos (Worek y col., 2005; Eddleston y col., 2008).

Si el diagnóstico de la intoxicación se basa en la inhibición de la actividad colinesterásica, éste debe hacerse cuando la disminución sea del 50% o más. La depresión enzimática aparece, por lo general, inmediatamente después de producirse una absorción significativa de los inhibidores o dentro de las 24 horas siguientes, aunque obviamente está condicionada por la cantidad de plaguicida a la que fue expuesto el individuo y la vía de ingreso del mismo (Aygün y col., 2002).

En la mayoría de los casos la enzima plasmática se deprime y recupera antes que la eritrocitaria. El descenso en la primera, persiste generalmente por varios días, hasta unas pocas semanas; en cambio, la recuperación de la eritrocitaria es más lenta, algunas veces de uno a tres meses, motivo por el cual la determinación de sus niveles constituye el análisis de elección en los sistemas de vigilancia para intoxicación crónica (Worek y col., 2005).

Para una adecuada interpretación de los resultados de laboratorio, es necesario recordar que, en ciertas condiciones, la actividad de la colinesterásica plasmática y la eritrocitaria están disminuidas en ausencia de inhibición química, por ejemplo, en humanos, alrededor del 3% de los individuos tienen un bajo nivel de colinesterasa determinado genéticamente. Los pacientes con parasitismo intestinal, enfermedad hepática avanzada, desnutrición y diabetes, entre otras, muestran baja actividad de colinesterasa plasmática (Sanz y Repetto, 1995). Un mayor detalle de los factores que influyen en la actividad de estas enzimas se presenta en la sección correspondiente a colinesterasas.

Otras pruebas de laboratorio que pueden practicarse es determinar la presencia del plaguicida y/o sus metabolitos en sangre, orina o tejidos. El problema que se presenta aquí es que generalmente en sangre y orina sólo se detectan en concentraciones cuantificables hasta 48 horas después de transcurrida la exposición. Nuevamente, la vía

de ingreso y la cantidad a la que fue expuesto condicionan la posibilidad de encontrar en orina el plaguicida o su metabolito (Buck y col., 1981; Walker y Nidiry, 2002).

Además de las pruebas de laboratorio ya señaladas, pueden efectuarse todas aquellas que contribuyen a definir otras alteraciones presentes en este tipo de intoxicación, tales como hipoxemia, acidosis metabólica, hiperglicemia, hiperkalemia, niveles disminuidos de alanino aminotransferasa (ALAT) y aspartato aminotransferasa (ASAT), aumento de gamaglobulina, trombocitopenia, leucopenia, anemia, eosinopenia, leucocitosis con neutrofilia y linfocitopenia; esta última se presenta en intoxicaciones agudas (Buck y col., 1981).

Dado el contexto en el que generalmente ocurren las intoxicaciones por plaguicidas, no siempre es posible conocer sus antecedentes. Por otro lado, puede ocurrir que no se disponga de laboratorio para efectuar las pruebas correspondientes. Ante esta situación y la necesidad de esclarecer o de confirmar el diagnóstico de una intoxicación por organofosforados y carbamatos, se puede recurrir a la prueba diagnóstica-terapéutica con atropina (Meerdink, 1989).

I.1.8.4.- Hallazgos de necropsia

Los cambios patológicos asociados al envenenamiento agudo por organofosforados son generalmente mínimos e inespecíficos. Se aprecian con facilidad los efectos de la hiperactividad colinérgica. La estimulación continuada de glándulas secretoras provoca la existencia de un exceso de saliva en la boca y de secreciones bronquiales en las vías respiratorias, llegando incluso al edema pulmonar. Pueden apreciarse hemorragias difusas en pericardio y petequias y equimosis en serosa y mucosa del tracto gastrointestinal (Buck y col., 1981).

I.1.9.- Tratamiento

Las medidas de soporte juegan un rol muy importante para la atención de pacientes afectados por intoxicación aguda con plaguicidas. Muchas veces la vida del paciente depende de su adecuada aplicación, por lo que se les debe brindar atención

médica inmediata, debiéndose vigilar la funcionalidad de las vías respiratorias y del aparato cardiovascular (Buck y col., 1981; Eddleston y col.; 2008).

El objetivo del rescate o eliminación de la sustancia tóxica está dirigido a dos aspectos fundamentales, disminuir o evitar la absorción por medio de las medidas de descontaminación y aumentar la eliminación de la sustancia tóxica absorbida (Marrs y Allister Vale, 2006).

Para tratar la intoxicación se debe utilizar atropina. El objetivo de esta terapia es antagonizar los efectos producidos por la excesiva concentración de la acetilcolina, ya que la atropina no reactiva la colinesterasa ni acelera la eliminación de los organofosforados, sino que controla las manifestaciones muscarínicas. Antes de administrar atropina, debe suministrarse una adecuada oxigenación tisular para minimizar el riesgo de fibrilación ventricular. La dosis de atropina a utilizar es de 0,2 a 0,5 mg/kg. En la primera aplicación se administra un cuarto de la dosis por vía intravenosa y el resto por vía subcutánea, repitiendo cada 3 a 6 h por vía subcutánea según la respuesta (Costa, 2006).

Otra media terapéutica consiste en emplear oximas, tales como pralidoxima, obidoxima o trimedoxima. Éstas actúan reactivando la enzima acetilcolinesterasa al liberarla de la molécula del plaguicida, por lo que están indicadas exclusivamente en la intoxicación por organofosforados. Con su aplicación no sólo se contrarrestan las manifestaciones muscarínicas, sino también las nicotínicas periféricas y las centrales, aunque este último efecto sólo se presenta si la oxima es capaz de alcanzar el SNC (Bajgar y col., 2007).

Deben utilizarse en las primeras 24 a 36 h del inicio de la intoxicación, ya que una vez que la enzima ha envejecido carecen de efectividad. La oxima más utilizada es la pralidoxima, y si bien el régimen de dosificación varía en función del organofosforado y la severidad del cuadro clínico, en general se emplea una dosis de 15 a 20 mg/kg de peso vivo (diluidos en 100 o 200 mL de suero glucosado al 5% ó solución salina isotónica), sin superar un ritmo de administración de 10-20 mL/min. Si

transcurridos treinta minutos a una hora no se observan mejorías, se puede repetir la mitad de la dosis inicial por infusión intravenosa lenta, de modo que toda dilución se administre en el lapso de 1 hora. Con este régimen de administración se consigue que las concentraciones de oxima en plasma se mantengan en aproximadamente 4 mg/mL, lo cual ha demostrado ser efectivo en gatos intoxicados con organofosforados (Lotti, 2001; Costa, 2006).

Respecto a otras oximas, la obidoxima presenta efectos similares a la pralidoxima, pero se diferencia en su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. Se debe tener cuidado al momento de establecer la dosis, pues cuando se la aplica en grandes cantidades puede generar hepatotoxicidad. La trimedoxima es el más potente de los reactivadores de la acetilcolinesterasa, pero también es la oxima más tóxica (Jokanović y Stojiljković, 2006).

Si se presentan convulsiones, debe administrarse diazepam en dosis de 1 a 2 mg/kg en el animal adulto; otros tratamientos sintomáticos están dirigidos a controlar el edema pulmonar y las arritmias (Meerdink, 1989).

Una posible alternativa terapéutica, que está en fase de evaluación, es la aplicación de fosfotriesterasas, las cuales tienen la capacidad de hidrolizar y, por lo tanto, detoxificar una amplia variedad de compuestos organofosforados. Estas enzimas son de origen microbiano, siendo *Pseudomona diminuta* y *Flavobacterium* spp. los principales microorganismos implicados en su síntesis (Raushel, 2002).

I.1.10.- Pronóstico y seguimiento

La intoxicación por clorpirifós constituye una situación de emergencia con alta mortalidad. Muchos son los factores que juegan un papel importante en el pronóstico de la intoxicación, tales como la dosis, la vía de aplicación, la rapidez de acceso al centro de atención, la aplicación oportuna y adecuada de las medidas de soporte, prontitud en el diagnóstico correcto, calidad de la asistencia médica y disponibilidad de los antidotos (Costa, 2006).

Si el paciente logra superar la fase aguda de la intoxicación, el seguimiento debe hacerse con base en la evaluación clínica y en la determinación de la actividad colinesterásica, evaluando la recuperación de la actividad de la enzima en los días y semanas subsiguientes (Meerdink, 1989; Thiermann y col., 2007).

Debido a que la intoxicación por clorpirifós puede producir efectos tardíos una vez superada la fase aguda, es necesario llevar a cabo un control médico para detectarlos oportunamente (Costa, 2006).

I.2.- COLINESTERASAS

I.2.1.- Introducción

La primera referencia sobre la existencia de un factor capaz de hidrolizar la acetilcolina fue realizada por Dale (1914). Este factor que hidrolizaba los ésteres de la colina de forma más activa que a otros ésteres recibió el nombre de colinesterasa (Stedman y col., 1932).

Las colinesterasas (ChE) son enzimas ubicuas que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el reino animal y vegetal. Forman parte del grupo de las esterasas o hidrolasas de los enlaces tipo éster, es decir, los constituidos por la unión de ácidos orgánicos o inorgánicos con alcoholes o tioles de muy diferente naturaleza (Sanz y Repetto, 1995).

Desde el punto de vista bioquímico, las esterasas son enzimas con una baja especificidad de sustrato y comprenden a cientos de enzimas diferentes que se distribuyen en 10 subgrupos. El primero de ellos corresponde a las hidrolasas de los ésteres carboxílicos (EC 3.1.1), que entre otras enzimas, incluye a la carboxilesterasa (EC 3.1.1.1), la acetilcolinesterasa (EC 3.1.1.7) y la butirilcolinesterasa (EC 3.1.1.8). Los otros subgrupos corresponden a las tiolester hidrolasas (EC 3.1.2), las hidrolasas monoéster fosfórico (EC 3.1.3), las hidrolasas diéster fosfórico (EC 3.1.4), las hidrolasas monoéster trifosfórico (EC 3.1.5), las sulfatasas (EC 3.1.6), las hidrolasas monoéster difosfórico (EC 3.1.7), las hidrolasas triéster fosfórico (EC 3.1.8), las exonucleasas (EC 3.1.11-16) y las endonucleasas (EC 3.1.21-31) (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2008).

Desde el punto de vista toxicológico, las esterasas se clasifican en tres categorías según su reactividad frente a los compuestos organofosforados (Aldridge, 1953; Costa 2006):

- Esterasas tipo A: también conocidas con la denominación de arilesterasas o paraoxonasas, constituyen un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la sangre y los tejidos de prácticamente todos los seres vivos; son capaces de hidrolizar una gran variedad de ésteres con grupos arílicos, incluyendo a los OF,

por lo que desempeñan un papel muy importante en la detoxificación de algunos de ellos (Tang y col., 2006).

- Esterasas tipo B: Son enzimas que hidrolizan ésteres con radicales alquílicos. Son inhibidas por los OF por lo que no pueden hidrolizar catalíticamente a estos compuestos. Dentro del grupo tenemos enzimas con actividad hacia diferentes sustratos, las cuales se conocen con los nombres de colinesterasas (ChE) y carboxilesterasas (CbE) (Thompson, 1999).

- Esterasas tipo C: Son enzimas que muestran preferencias por los ésteres de acetato y que no interactúan con los organofosforados.

Las carboxilesterasas constituyen un grupo de enzimas presentes en tejidos de vertebrados e invertebrados capaces de hidrolizar una amplia variedad de ésteres. La esterasa neurotóxica representa un grupo de enzimas presente en el sistema nervioso de los vertebrados que cuando son inhibidas por algunos organofosforados generan neuropatía periférica retardada. Las colinesterasas constituyen una familia de esterazas caracterizadas por contener un resto de serina en el sitio activo (serinohidrolasas) y se distinguen de otras esterazas inespecíficas por su capacidad de ser inhibidas por eserina a concentraciones de 10^{-5} M (Sanz y Repetto, 1995).

En la familia de las colinesterasas se pueden distinguir dos grupos, los cuales a su vez pueden presentar variantes. Uno de ellos está representado por la acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7), también denominada como colinesterasa verdadera, genuina, tipo I o eritrocitaria. Esta enzima se encuentra principalmente en neuronas colinérgicas periféricas y centrales, estando distribuida en dendritas, axones y especialmente concentrada en las sinapsis colinérgicas, debiendo destacar los elevados niveles que alcanza en la placa terminal post sináptica de la unión neuromuscular; además, también se ha detectado en otros territorios orgánicos como eritrocitos, pulmón o bazo (Chatonnet y Lockridge, 1989; Taylor, 2006, Zimmerman y Soreq, 2006).

El otro grupo corresponde a la butirilcolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8) también conocida con los nombres de pseudocolinesterasa, colinesterasa sérica, plasmática, falsa o tipo II. La BChE aparece en cantidades pequeñas en células gliales o satélites, pero prácticamente no se detecta en las neuronas de los sistemas nerviosos central y periférico. Esta enzima se expresa principalmente en plasma e hígado; además también se encuentra en músculo liso, intestino, páncreas, corazón y sustancia blanca del encéfalo (Massoulie y col., 1993; Taylor, 2006).

Ambas enzimas se diferencian en la afinidad por los sustratos, así, la acetilcolinesterasa hidroliza a la acetilcolina y a la propionilcolina en proporciones similares, pero no a la butirilcolina. Por su parte, la butirilcolinesterasa hidroliza a la butirilcolina en una mayor proporción que la propionilcolina, mientras que la acetilcolina es lentamente hidrolizada y a diferencia de la AChE no hidroliza a la β -metilacetilcolina (Dass y col., 1994).

La función biológica de la AChE en el mecanismo de transmisión nerviosa ha estado perfectamente definida desde su descubrimiento. Además de su actividad hidrolítica se ha sugerido que podría actuar como receptor fisiológico. Aunque se ha definido como enzima de membrana típicamente postsináptica, se ha demostrado que también está asociada a terminales presinápticos. Parece ser que la AChE presináptica podría, por una parte, regular la síntesis de ACh por mecanismos de retroacción y, por otra parte, regular la liberación de ACh de las terminales nerviosas, determinando la unión de ésta a los receptores presinápticos (Britto y col, 2001; Minic y col., 2002).

Dado a que se encuentra en tejidos no nerviosos y en neuronas no colinérgicas, se deducen funciones adicionales de la AChE, incluso independientes de sus actividades catalíticas, así como efectos no colinérgicos de sus inhibidores (Soreq y Seidman, 2001).

También se ha postulado su participación en el desarrollo de los procesos cognitivos en los animales y en el hombre (Kostoviv y col., 1988). De hecho, fármacos anticolinesterásicos como donepezilo, galantamina y rivastigmina son empleados en el

tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Giacoboni, 2004; Marco y do Carmo Carreiras, 2006; Onor y col., 2007; Herholz, 2008).

Se desconoce el papel que desempeña en la membrana eritrocitaria, aunque podría estar relacionada con el transporte iónico, concretamente de potasio, y consecuentemente influir en los cambios que ocurren en el potencial eléctrico celular (Torp, 1986). Dado que la AChE fue encontrada ya en las células precursoras del sistema eritropoyético, se ha sugerido también su participación en la eritropoyesis regulando precisamente el proceso de diferenciación de los megacariocitos, sin embargo se desconoce el mecanismo de íntimo de este accionar (Lev-Lehman y col., 1997; Soreq y Seidman, 2001).

La AChE también participa en la neurogénesis, ya que se demostró que la incorporación de extracto purificado de AChE a cultivos de células nerviosas de pollos promueve el desarrollo de axones y dendritas, no pudiendo este efecto ser inhibido por todos los agentes anticolinesterásicos evaluados en el estudio (Layer y col., 1993). Del mismo modo, la transfección con AChE o ARN monocatenario complementario para producir la expresión del gen específico que codifica AChE demostró que la enzima posee actividad neurogénica en células de neuroblastomas (Koenigsberger y col., 1997; Soreq y Seidman, 2001) y neuronas de la raíz ganglionar dorsal (Bigbee y col., 2000).

La AChE podría también acelerar el depósito de placas del péptido β -amiloide. Esta actividad estaría favorecida por ligandos (como decametonio y propidium) que se unen al sitio activo aniónico periférico de la AChE, mientras que no se vería afectada por inhibidores específicos del centro activo de la enzima, como edrofonio, lo que indicaría posiblemente que es el centro activo periférico de la AChE el que estaría implicado en la formación de las placas de péptido β -amiloide (Inestrosa y col., 1996). Dado que la enfermedad de Alzheimer está neurohistopatológicamente caracterizada por la aparición de placas seniles extracelulares, mayoritariamente formadas por péptido β -amiloide, la aplicación de anticolinesterásicos específicos que inhiban este proceso serían de utilidad en el tratamiento de esta patología (Inestrosa y col., 2008).

Otras de las funciones “no clásicas” de la acetilcolinesterasa son las de participar como proteína de adhesión, activar las neuronas dopaminérgicas y promover la sinaptogénesis (Soreq y Seidman, 2001, Paraoanu y Layer, 2008).

Durante mucho tiempo las funciones de la enzima BChE fueron un interrogante, pero actualmente se sugiere que además de participar en el metabolismo de varios ésteres, como procaína, bupivacaína (Galenko-Yaroshevskii y col., 2003), suxametonio (Morgan, 1982), ácido acetilsalicílico (Masson y col, 1998) o sustancias tóxicas (Schwarz y col., 1995), participa en el metabolismo de lipoproteínas (Kutty y Payne, 1994), en el mantenimiento de la mielina (Earl y Thompson 1952) y en mecanismos de adhesión tisular y neurogénesis (Layer and Willbold, 1995).

En la epidermis y las glándulas de la piel, esta enzima parece participar en la síntesis de los productos de secreción y en el pulmón parece intervenir en el sistema surfactante, ya que la administración de BChE ejerce un efecto protector en conejos (Sanz y Repetto, 1995). Además, en ambos tejidos desempeña un importante efecto metabólico sobre muchos compuestos que presentan un enlace tipo éster, como ser organofosforados y cocaína (Jbilo y col. 1994; Schallreuter y col., 2007)

I.2.2.- Estructura molecular de la colinesterasa.

En función de su estructura cuaternaria, las colinesterasas pueden presentarse como oligómeros homoméricos simples de subunidades catalíticas, así nos encontramos monómeros (G1), dímeros (G2) y tetrámeros (G4) globulares, o bien como agregados heteroméricos asimétricos (A4, A8 o A12), cuya característica principal es poseer una cola de colágeno (Figura I.4). Cada monómero es una molécula elipsoidal constituida por cordones centrales de conformación β rodeados por 15 α hélices (Figura I.5) (Sussmann y col., 1991).

Estas colinesterasas pueden presentarse como formas libres hidrosolubles o bien estar fijadas a las membranas. Las hidrosolubles son secretadas en los fluidos corporales, siendo la BChE del plasma humano la forma soluble más estudiada. La

forma tetramérica G4 representa el 95% de la actividad encontrada en el plasma humano; este tetrámero es una asociación de dos dímeros con fuertes interacciones hidrofóbicas (Lockridge y col., 1979). Las dos subunidades en cada dímero están unidas por enlaces disulfuro (Lockridge y col., 1987). Los dímeros y monómeros encontrados en plasma parecen ser productos de degradación de los tetrámeros (Chubb y Smith, 1975).

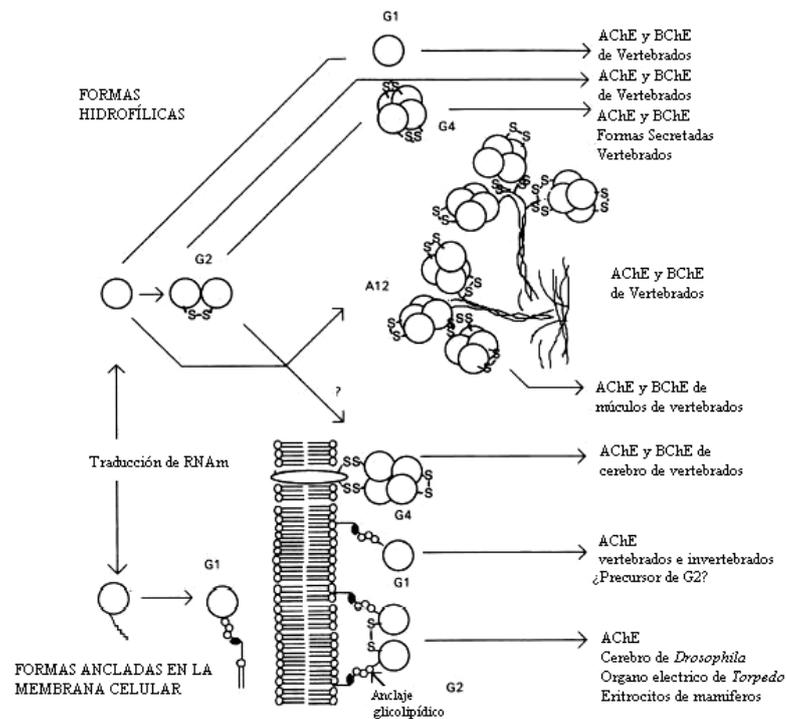


Figura I.4. Modelo esquemático del polimorfismo de las enzimas AChE y BChE. (Adaptado de Chatonnet y Lockridge, 1989).

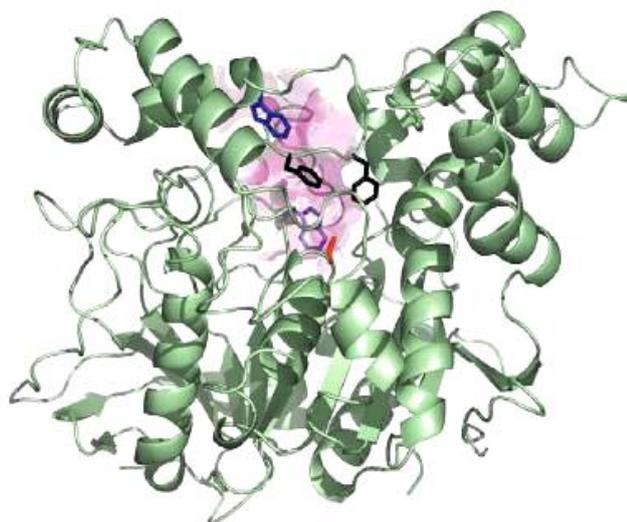


Figura I.5. Estructura tridimensional de la acetilcolinesterasa de la raya eléctrica *Torpedo californica*. (Adaptado de Silman y Sussman, 2005).

La forma G4 hidrosoluble de AChE es secretada por glándulas adrenales, cultivos celulares de neuronas, cultivos de células musculares y células nerviosas periféricas. Esta forma de AChE se ha encontrado en plasma de rata y conejo adulto y en feto bovino (Chatonnet y Lockridge, 1989). La AChE fetal de los bovinos tiene la misma organización de subunidades que la BChE humana (Ralston y col., 1985).

Las formas globulares de AChE unidas a las membranas celulares presentan un dominio hidrofóbico que fija las mismas a la bicapa fosfolipídica de las membranas. Existen dos formas anfífilicas diferentes, estas son las formas G2 y la G4. Las formas G2 se encontraron en eritrocitos de mamífero (Roberts y col., 1987), plaquetas, ganglios basales del encéfalo ovino y en la cabeza de la mosca *Drosophila* (Fournier y col., 1987; Fournier y col., 1988). Las formas G4 de BChE se reportaron en encéfalo de mamíferos (Vigny y col., 1978; Atack y col., 1986).

Las formas asimétricas se encuentran unidas a la membrana. La forma A12 de la AChE del pez *Torpedo californica* resulta de la unión de tres tetrámeros vinculados entre si por una cola de colágeno. Las formas asimétricas A12 existen tanto para BChE como para AChE de mamíferos, aves y en músculos de vertebrados primitivos, pero no en invertebrados (Toutant y Massoulié, 1988).

Si bien tanto BChE y AChE se encuentran en los tejidos durante el desarrollo, existe evidencia de que la presencia de BChE en algunas células embrionarias es de carácter transitorio, pudiendo sus funciones ser posteriormente reemplazadas por AChE, lo cual sugiere que la BChE sustituye a la AChE durante el estadio embrionario (Chatonnet y Lockridge, 1989).

La concentración de BChE en plasma humano esta correlacionada con los niveles de hormona de crecimiento, siendo influenciado por la obesidad, la preñez y el parto (Chatonnet y Lockridge, 1989).

Aproximadamente un 94% de la BChE presente en plasma corresponde a la forma G4 hidrosoluble, la cual se originaría a nivel hepático. De la AChE presente en

plasma, un 54% corresponde a la G4 en tanto que el 44% restante corresponde a las formas G1 y G2 (Atack y col., 1986). Las formas G1 y G2 de AChE serían liberadas desde los eritrocitos, en tanto que la G4 probablemente se originaría de las uniones neuromusculares, ganglios autonómicos o desde el sistema nervioso central. Es de destacar que el suero fetal humano contiene mucha más AChE que el suero de los adultos (Sorensen y col., 1986).

Por clonación molecular se ha observado que sólo un gen codifica la AChE de los vertebrados. Este gen, compuesto por 6 exones y 4 intrones, da lugar a un amplio polimorfismo de la enzima gracias a mecanismos de corte y empalme que originan múltiples productos génicos de RNA mensajero, y a modificaciones post traduccionales. Estas variaciones condicionan una diferente solubilidad y forma de unión a la membrana, más que diferencias en la actividad catalítica, ya que no varía la zona genómica que codifica el centro catalítico de la enzima (Schumacher y col., 1986, Taylor, 2006).

El gen que codifica la BChE es similar, presentando una estructura exónica semejante. También se han descrito formas oligoméricas de esta enzima, que al parecer se regulan de forma específica en cada tejido (Taylor, 2006).

I.2.3.- Sitio activo de la enzima colinesterasa

Para explicar la afinidad de las colinesterasas por sustratos catiónicos y por sus inhibidores, Zeller y Bissiger (1943) postularon la combinación de éstos compuestos a dos lugares distintos en el centro activo de la enzima. Actualmente se conoce que efectivamente en la estructura de la colinesterasa se distinguen el sitio aniónico y el sitio esteárico (Figura I.6). El primero corresponde a una región de la superficie de la molécula que presenta carga negativa y que tiene la capacidad de combinarse con la carga positiva del átomo de N cuaternario del sustrato o del inhibidor mediante una interacción hidrofóbica (Patocka y col., 2004, Silman y Sussman, 2008).

El segundo, o sitio esteárico, está situado dentro de la hendidura de la proteína, localizado a unos 4 Å por encima de la base de la hendidura, la cuál tiene una profundidad aproximada de 20 Å y penetra hasta aproximadamente la mitad de la enzima. Cerca del 40% de la superficie de la hendidura está tapizada por residuos de compuestos aromáticos, los cuales conservan homología entre las colinesterasas de las diferentes especies (Harel y col., 1993). Este sitio esteárico parece combinarse con el grupo carboxílico del enlace éster y es el responsable de la afinidad y de la hidrólisis del sustrato mediante la llamada tríada catalítica, constituida por serina, histidina y glutamato (Patocka y col., 2004; Silman y Sussman, 2008).

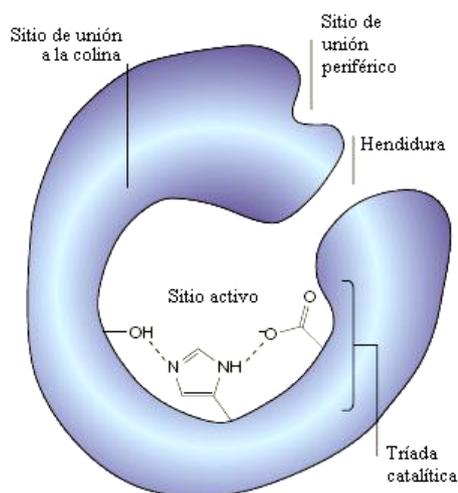


Figura I.6. Estructura del sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa (Adaptado de Soreq y Seidman, 2001).

Los aspectos más interesantes de la enzima se refieren al sitio aniónico periférico. Changeux (1966) fue el primero en sugerir que este sitio periférico participaba en la inhibición alostérica de la enzima, aunque sin conocer los mecanismos moleculares de acople entre este sitio y el lugar catalítico.

El sitio aniónico tiene la capacidad de unirse a muchos ligandos; la asociación con el apropiado puede prevenir el acceso del sustrato a la hendidura, ya sea por repulsión eléctrica de cargas o por modificación en la conformación del centro activo. De este modo el ligando se comportaría como un modulador alostérico, y por lo tanto el sustrato ya no tiene acceso al sitio catalítico (Soreq y Seidman, 2001; Patocka y col., 2004).

I.2.4.- Factores que afectan la actividad de las colinesterasas

Además de la aplicación de fármacos inhibidores de la colinesterasa, tales como carbamatos, organofosforados y de los agentes específicos empleados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, existen varios factores que pueden afectar la actividad de las esterasas y que por lo tanto deben ser tenidos en cuenta al momento de diseñar e interpretar los datos de evaluación de estas enzimas. Así, por ejemplo, la actividad de la AChE puede alterarse por la exposición medio ambiental a ciertos contaminantes, como es el caso del mercurio, así como también por condicionantes fisiológicos o patológicos, e incluso por el estrés (Thompson, 1999). A continuación vamos a abordar brevemente algunos de estos aspectos que pueden modificar la actividad colinesterásica y que por lo tanto tienen implicación en el trabajo realizado:

I.2.4.1- Especie:

Existe una amplia variación en el nivel de actividad de las colinesterasa entre las diferentes especies. Por ejemplo, los niveles de actividad de AChE cerebral variaron hasta tres veces entre 48 especies distintas de aves silvestres pertenecientes a 11 órdenes y 23 familias; incluso especies relacionadas mostraron diferencias significativas (Hill, 1988). La actividad de la AChE cerebral es menor en mamíferos que en aves, y dentro de los mamíferos, las especies mayores tienen valores de actividad de colinesterasas superiores a las pequeñas (Westlake y col., 1983).

Cuando se comparó la actividad colinesterásica total en sangre de rumiantes de interés zootécnico, se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ya que los bovinos (2948 ± 289 UI/mL) presentaron mayor actividad enzimática que los ovinos (1903 ± 198 UI/mL) y caprinos (1554 ± 300 UI/mL) (Brem y col., 1985).

La relación de AChE y BChE en plasma también está influenciada por el orden al que pertenece el animal, ya que Fairbrother y Bennett (1988), indican que las aves rapaces presentan una mayor proporción de AChE que de BChE, mientras que los pollos y las codornices presentan una proporción relativamente baja de AChE. Trabajos más recientes, incluso demuestran que existen diferencias dentro de las aves de presa, ya que en las familias Accipitridae, Tytonidae y Strigidae predomina la BChE, en

cambio en la familia Falconidae predomina la AChE; siendo casi inexistente la actividad de la carboxilesterasa, excepto en la lechuga común. Además, las aves a diferencia de los mamíferos carecen de AChE eritrocitaria y son deficitarias en esterasas tipo A (Roy y col., 2005)

En la mayoría de los mamíferos, la actividad colinesterásica sanguínea se encuentra en un 80% en glóbulos rojos (Munro y col., 1991). Cuando se evaluó la actividad de la AChE en bovinos se evidenció que el 98,9% de la actividad se encuentra en los eritrocitos, en tanto que el 1,5% se encuentra en plasma (Pardio y col., 2001, Pardio y col., 2007). Estos resultados son coincidentes a los reportados por Abdelsalam y Ford (1985), quien señaló que en novillos el 95,3% de la actividad de ChE se hallaba en eritrocitos y un 4,7% en plasma.

En la Tabla I.2 se resumen los valores de actividad de colinesterasa en sangre entera y plasma de bovinos determinada por el método de Ellman, y utilizando acetiltiocolina como sustrato.

Tabla 1.2. Valores de actividad colinesterásica en sangre entera y plasma y en diferentes categorías de bovinos reportados por Abdelsalam y Ford, 1985⁽¹⁾, Brem y col., 1985⁽²⁾ y Khan y col., 1988⁽³⁾.

Matriz biológica	Actividad de ChE μmol/mL/min	Categoría evaluada
Sangre	4,34	Terneros ⁽¹⁾
Plasma	0,39	(3 a 6 meses)
Sangre	5,51	Novillos ⁽¹⁾
Plasma	0,19	(1 a 2 años)
Sangre	4,47	Vacas ⁽¹⁾
Plasma	0,22	(Adultas)
Sangre	2,21	Terneros ⁽²⁾
Plasma	0,18	(1 a 6 meses)
Sangre	2,95	Machos ⁽²⁾
Plasma	0,21	(Adultos)
Sangre	2,34	Vacas ⁽²⁾
Plasma	0,16	(Adultas)
Sangre	5,01	Novillos ⁽³⁾
Plasma	0,71	(1 a 2 años)

Brem y colaboradores (1985) indicaron que en bovinos el 92,86% de la actividad colinesterásica se presenta en eritrocitos, en tanto que representa el 89,94% en ovinos y el 84,90% en caprinos. Una situación similar fue reportada en los porcinos, donde se

determinó que el 89,19% de la actividad ChE se registra en eritrocitos (Hazelwood y Heath, 1976). En el caso de los caninos, un 40 a 60% de la actividad de ChE se presenta en plasma, y el resto en eritrocitos (Munro y col., 1991; Tecles y col.; 2000). En los felinos prácticamente toda la actividad colinesterásica se presenta en el plasma (Munro y col., 1991), lo cual fue ratificado por Tecles y Cerón (2001) quienes informaron que los eritrocitos de los felinos presentan baja actividad de la enzima acetilcolinesterasa.

En el caso de las ratas se describe que el plasma presenta tanto actividad de BChE como de AChE (Chen y col., 1999), siendo incluso mayor la actividad de la acetilcolinesterasa (Çokuğraş, 2003). En humanos la ChE que predomina en el plasma es la BChE, así, según algunos investigadores la AChE plasmática sólo representa un 8% de la actividad acetilcolinesterásica total (Mohammad y col., 2007a), ya que el resto se encuentra en los eritrocitos, donde constituye el único tipo de ChE encontrada. En términos relativos, la actividad colinesterásica es más elevada en glóbulos rojos, que en el plasma, donde está determinada principalmente por la BChE (Lewis y col., 1981; Chen y col., 1999; Mason, 2000; Mohammad y col., 2007a).

Por tanto, en las especies de rumiantes estudiadas y en los porcinos más del 80% de la actividad colinesterásica se presenta a nivel eritrocitario, situación que no acontece en los caninos y felinos. Además se aprecia una alta variabilidad entre los resultados obtenidos en los diferentes trabajos, lo cuál en algunos casos está determinada por la edad o el sexo del individuo, pero en otros podría estar influenciada por factores ambientales, patologías o bien por la metodología de análisis.

Todos aquellos factores que afectan solamente la actividad de la ChE plasmática tendrán pocas modificaciones en la actividad colinesterásica total, sobre todo en aquellas especies en la mayor actividad colinesterásica se desarrolla en los eritrocitos (Munro y col., 1991).

I.2.4.2- Variaciones individuales:

Al valorar la actividad de las colinesterasas se debe tener en consideración las variaciones inter-individuales que se suelen presentar frecuentemente. Por ello, se deberían utilizar los valores basales de cada individuo como control, lo cual no siempre es posible. Por ejemplo, cuando se quiere determinar la actividad de la AChE cerebral no se pueden determinar los niveles basales del propio individuo, por lo tanto, los valores tomados como referencia en estas situaciones deben provenir de una población lo suficientemente grande como para que tengan validez estadística (Thompson, 1993; Garabrant y col, 2008).

Halbrook y colaboradores (1992) reportaron, luego de evaluar la actividad de la ChE mensualmente durante 1 año en bovinos de carne y leche, ovejas y caballos por el método de Ellman, que en todas las especies estudiadas el promedio del menor valor de colinesterasa registrado fue un 20% menor que el que había sido considerado como valor basal de referencia para esa especie animal. A partir de estos estudios, se ha considerado que cuando se presenta un descenso superior a un 20% del valor basal en la actividad de la ChE, puede sospecharse que el individuo fue expuesto a un inhibidor de las colinesterasas, aunque generalmente se considera que debe disminuir como mínimo un 50% para indicar que ha existido exposición, como veremos posteriormente. Por su parte, los signos de intoxicación generalmente se presentan con valores que alcanzan el 75-80% de inhibición (Lotti, 1995; Chem y col, 1999; van Gemer y col., 2001).

En un estudio desarrollado por Lein (1982), donde se monitorizó la actividad de la ChE sanguínea en 5 bovinos realizando 6 determinaciones en un período de 90 horas, se encontró que el promedio de la diferencia entre la media y los valores extremos de todos los animales fue del 16%. Es importante señalar que en este estudio las muestras fueron tomadas a distintas horas del día.

Estas diferencias no hacen más que ratificar la necesidad de contar con valores basales de actividad de ChE previo a usar la actividad de la enzima como indicador de exposición a inhibidor de colinesterasa.

I.2.4.3- Edad:

Tanto en mamíferos como en aves se han descrito variaciones en la actividad de la AChE en función de la edad de los mismos, aunque los resultados son muy diversos. En aves precociales, es decir aquellas que nacen con plumón denso, ojos abiertos, gran movilidad y que se pueden valer por si mismas desde el nacimiento, tal el caso del pato, se puede evidenciar un incremento en la actividad de la AChE cerebral desde el embrión hasta el momento de la eclosión del huevo, donde los animales recién nacidos presentan valores similares de actividad que los adultos. Por su parte, en las aves altriciales, es decir que nacen con poco plumón o desnudos, con los ojos cerrados e incapaces de dejar el nido y dependiendo completamente de sus padres en las primeras semanas de vida, como el estornino pinto (*Sturnus vulgaris*), los valores de AChE cerebral se incrementan cuatro veces desde la eclosión hasta que el animal esta completamente emplumado (Grue y col., 1981; Gard y Hooper, 1993).

En las ratas se observa un incremento en la actividad de la AChE desde el nacimiento hasta el destete; en el ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*) la actividad cerebral de AChE se incrementa en dos a tres veces su valor inicial durante las primeras semanas de vida, para luego disminuir ligeramente hasta que ya no presenta diferencias con los adultos. Esta meseta se alcanza aproximadamente a las 20 semanas de vida (Fishwick y col., 1996).

La evolución temporal en la actividad sérica de la BChE también difiere. En el pato, la actividad de BChE disminuye desde la eclosión del huevo hasta que alcanza los valores de los adultos, esto acontece hacia el día 40 de vida (Rattner y Fairbrother, 1991). Gard y Hooper (1993) demostraron que en el estornino pinto y en el pájaro ventura o azulillo (*Sialia sialis*) la actividad de la AChE plasmática se incrementaba, mientras que la BChE disminuía desde el nacimiento hasta que las aves estaban completamente emplumadas.

En pequeños mamíferos, como el ratón de campo y la ratilla agreste, la actividad de la BChE no se ve afectada por la edad de los animales (Fishwick y col., 1996). Los cobayos neonatos presentaron aproximadamente un 50% de la actividad de ChE de los

adultos (Chow y Ecobichon, 1974) y las ratas hembras inmaduras un 25% de la actividad de ChE sérica que la que era observada en ejemplares adultos (Beveridge y Lucas, 1941).

Cuando se comparó la actividad de la BChE y AChE en bovinos de entre 2,5 y 7 años, no se encontraron diferencias en función de la edad y de la dieta que ingerían, aunque estos autores si encontraron diferencias cuando compararon animales de menos de 6 meses con adultos (Forslund y Björkman, 1983). Abdelsalam y Ford (1985) encontraron resultados similares, con una actividad ChE en sangre entera superior en machos castrados de 1-2 años de edad que en terneros de 3-6 meses. No se obtuvieron diferencias al comparar la actividad colinesterásica en sangre entera entre novillos de más de 3 años de edad ($2,50 \pm 0,53 \mu\text{mol/mL/min}$) con novillos de entre 1 y 2 años ($2,40 \pm 0,22 \mu\text{mol/mL/min}$), y entre vacas adultas ($2,32 \pm 0,19 \mu\text{mol/mL/min}$) y vaquillonas ($2,52 \pm 0,26 \mu\text{mol/mL/min}$) (Halbrook y col., 1992).

Al evaluar la actividad colinesterásica en plasma y eritrocitos de bovinos, ovinos y caprinos de diferentes edades, Brem y colaboradores (1985) reportaron que los bovinos machos adultos presentaban mayor actividad colinesterásica que los terneros, en tanto que en el caso de los caprinos, la mayor actividad enzimática se presentó en los cabritos. En el caso de las ovejas, no registraron diferencias entre corderos y borregos adultos. Es importante consignar que en este trabajo no se aclara específicamente la edad de cada uno de los individuos empleados en el ensayo. En contraste, la sangre fetal de ovejas presentó una actividad de ChE plasmática de 2 a 3 veces el valor de los adultos (Bell y Van Petten, 1976).

I.2.4.4- Sexo:

Existen diversos trabajos en los que se estudió la influencia del sexo en la actividad de estas enzimas tanto en la Clase Aves como Mamífera; aunque no todas las publicaciones muestran el mismo tipo de respuesta, como veremos a continuación (Ratner y Fairbrother, 1991).

En rumiantes, Abdelsalam y Ford (1985) encontraron que prácticamente no existían diferencias en la actividad de la ChE en sangre entera entre machos castrados de 1-2 años de edad ($5,51 \pm 0,60 \mu\text{mol/mL/min}$) y vacas adultas mayores de 2 años ($4,47 \pm 0,66 \mu\text{mol/mL/min}$). Tampoco hallaron diferencias Halbrook y colaboradores (1992), ya que indicaron que la actividad en novillos era de $2,50 \pm 0,53 \mu\text{mol/mL/min}$ y en vacas era de $2,32 \pm 0,19 \mu\text{mol/mL/min}$. En tanto, estos mismos autores indicaron que la actividad en machos enteros era superior ($3,50 \pm 0,55 \mu\text{mol/mL/min}$) a la de novillos y vacas. La mayor actividad colinesterásica en toros respecto a novillos también fue descrita por Haas y colaboradores (1983). Por su parte, Mohammad y colaboradores (2005), describieron que la actividad de colinesterasa eritrocitaria en cabras hembras era inferior a la que presentaban los machos, en tanto que no observaron diferencias en función del sexo en la actividad de BChE.

En ratas y ratones también se encontraron diferencias en función del sexo, así las hembras adultas de ratas presentaron una actividad de ChE 3,7 veces superior a la de los machos, mientras que en ratones la actividad fue 1,5 veces superior en hembras que en machos (Beveridge y Lucas, 1941). Similares resultados fueron encontrados por Haufe (1965), quien indicó que la actividad colinesterásica en sangre era superior en vacas que en toros y novillos, aunque hay que destacar que ese estudio fue desarrollado utilizando dos individuos en cada grupo.

La administración de estradiol en ratas machos y hembras causó un incremento en la actividad de la colinesterasa en plasma, mientras que la aplicación de testosterona causó su disminución (Everrett y Sawyer, 1946; Munro y col, 1991). En contraste a la disminución en la actividad de ChE inducida por testosterona en ratas, la aplicación de altas dosis de testosterona en bovinos causó un incremento en la ChE sanguínea (Haas y col., 1983).

Zeller y colaboradores (1941) encontraron una mayor actividad en la colinesterasa plasmática en machos adultos que en hembras de cobayos. Por su parte Ecobichon y Comeau (1973) estudiaron la actividad de la ChE plasmática en varias especies, incluyendo equinos, porcinos, caprinos, caninos, felinos, ratas, ratones,

conejos y humanos. Sólo se encontraron diferencias atribuibles al sexo en ratas, donde la actividad en hembras fue de entre 4 a 10 veces superior a la de los machos.

Los cambios hormonales que acontecen durante la preñez y la lactación, también generan modificaciones en la actividad de la ChE plasmática en ratas. Después de una disminución del 10% durante la primera mitad de la gestación, la actividad se incrementó hasta un 150% comparado con los valores previos a la preñez. Luego la actividad disminuyó significativamente desde 2 a 3 días previos al parto, alcanzando aproximadamente un valor igual al 50% de la actividad pre-preñez, manteniéndose en esos niveles durante la lactación. Las ratas a las cuales no se les permitía lactar, pero que reasumían la funcionalidad ovárica, recuperaron los valores basales de actividad ChE a las 2 semanas posteriores al parto (Sawyer y Everret, 1946). También se encontró que la preñez determina cambios en la actividad colinesterásica en mujeres, siendo superiores en las embarazadas (Rumenjak, 1998).

I.2.4.5- Variaciones Temporales

Se han descrito variaciones circadianas en la actividad de la AChE en el ratón de laboratorio, sin embargo no se encontraron cambios en función de la hora del día en algunos géneros aviares estudiados. Aunque este hecho no ha sido evaluado en muchas especies, se considera importante que las muestras para determinar la actividad de las colinesterasas se tomen siempre a la misma hora del día, ya que de lo contrario se puede incurrir en interpretaciones incorrectas (Thompson, 1999).

La actividad de BChE y CbE sérica en las águilas ratoneras (*Buteo buteo*) y en el estornino pinto varía en función de la hora del día en la que se obtienen las muestras, incrementándose un 150% la actividad de la carboxiesterasa a lo largo de un período de 12 horas (García-Rodríguez y col., 1987; Gard y Hooper, 1993).

En cambio, no se encontraron diferencias significativas en la actividad de ChE en bovinos de raza holando entre las muestras tomadas a la mañana y las que se tomaban a la tarde, aunque esos datos deben ser considerados de modo especial, ya que los muestreos no eran en el mismo día. De todos modos las diferencias en función a la

hora del día nunca fueron superiores a las diferencias observadas en un mismo animal tomando sólo las muestras matutinas o vespertinas (Halbrook y col., 1992). Tampoco se encontraron diferencias significativas cuando compararon durante 3 días consecutivos la actividad de la AChE en 5 novillos hereford (Khan y col., 1988).

Además, también se deben tener en consideración las posibles variaciones circaestacionales, ya que en una gran cantidad de especies de aves se han descrito variaciones estacionales en la actividad de la BChE. En pequeños mamíferos, como en el ratón de campo, se apreciaron diferencias estacionales en la actividad de la AChE cerebral. Esta situación no fue apreciada en aves (Rattner y Fairbrother, 1991).

Sin embargo, en un estudio en el que se utilizaron 6 vacas adultas, 6 vaquillonas, 6 toros y 6 novillos se realizaron mediciones repetidas en la actividad de ChE durante 1 año, los resultados indicaron que no se encontraban diferencias en la actividad de la misma lo largo del tiempo. La actividad media de ChE en sangre entera fue de $2,65 \pm 0,30 \mu\text{mol/mL/min}$ (Halbrook y col., 1992).

I.2.4.6- Salud y estado nutricional

Estos factores también pueden modificar la actividad de la colinesterasa. Cualquier situación que conduzca a anemia puede, por ende, disminuir la actividad de la AChE eritrocitaria, mientras que los individuos que habitan en las alturas pueden presentar un mayor número de glóbulos rojos y por tanto más AChE (Coye y col., 1986).

Prácticamente toda la BChE encontrada en plasma es sintetizada en hígado, por lo tanto aquellas patologías que afectan la funcionalidad hepática producen una disminución en la actividad de esta enzima, tal como fue reportado en pacientes afectados por neoplasias hepáticas, hepatitis y cirrosis (McQueen, 1995).

Las ratas adaptadas al frío (5 °C durante 2 semanas) presentaron una mayor actividad en la ChE plasmática y en la AChE cerebral, pero menores valores en la ChE en sangre entera (Ryhanen y col, 1988). Se desconoce si este efecto se presenta en otras especies animales.

La dieta también puede ocasionar cambios en la actividad colinesterásica, así, cuando las ratas son alimentadas durante seis meses con dietas ricas en azúcar y grasas presentaban una menor actividad de AChE en hipocampo, corteza cerebral e hipotálamo (Kaiser y col., 2004).

I.2.5.- Inhibición de las colinesterasas: Complejidad en su interpretación.

Aunque los organofosforados inhiban tanto a la AChE como a la BChE, la inhibición de esta última no necesariamente se correlaciona con el grado de inhibición que presenta la AChE en sistema nervioso, quien en definitiva metaboliza la acetilcolina en las sinapsis nerviosas.

De todos modos es preciso resaltar que es muy difícil estimar el grado de precisión con el que la inhibición de AChE eritrocitaria o BChE plasmática refleja lo que realmente acontece en el SNC, ya que los compuestos organofosforados alcanzan más fácilmente la sangre que el SNC, y por lo tanto el grado de inhibición de ChE sanguínea podría sobreestimar lo que ocurre a nivel cerebral (Tabla I.3).

Tabla I.3. Concentración de compuestos organofosforados requerida en la dieta (mg/kg) para producir la inhibición del 50 % de la actividad de la colinesterasa cerebral y sérica en ratas (Su y col., 1971).

Organofosforado	Concentración requerida para causar el 50% de inhibición	
	ChE Cerebral	ChE Sérica
Fentión	33	27
Folex	130	52
Coumafós	80	25

Cuando la AChE eritrocitaria es inhibida irreversiblemente por un compuesto organofosforado, la recuperación a los valores normales depende de la tasa de ingreso a la circulación general de nuevos hematíes. Se ha establecido que para varios organofosforados, la tasa de recuperación corresponde aproximadamente al 1% diario (Gallo y Lawryk, 1991). En tanto, la semivida de síntesis de AChE en el sistema nervioso central se estima en 5 a 7 días (Lotti, 1995).

Esto lleva a la conclusión de que la correlación entre la inhibición de la AChE eritrocitaria y la que acontece en el SNC depende del comportamiento farmacocinético del compuesto, específicamente de la facilidad y efectividad con que atraviesa barrera hematoencefálica, así como también de la semivida de eliminación y del tiempo de exposición al organofosforado (Lotti, 1995).

Dado las grandes variaciones que existen en los valores basales entre individuos de una misma especie, para poder interpretar correctamente los valores de AChE, sería preciso disponer de los valores basales del individuo del cual se sospecha se ha expuesto al compuesto en cuestión. Se ha descrito que la actividad de la AChE presenta un coeficiente de variación (C.V.) intra-individual del 10%, en tanto que el C.V. inter-individual oscila entre el 10 y el 40% (Gallo y Lawryk, 1991).

Si bien esta aceptado que para sospechar de una intoxicación por OF la actividad de la AChE debe reducirse en por lo menos un 50% de su valor normal, los síntomas de intoxicación, en numerosas ocasiones, aparecen cuando la actividad enzimática alcanza valores de inhibición próximos al 60%, tal como se muestra en la **Tabla I.4**, donde se correlacionan los principales signos clínicos con el porcentaje de inhibición de la AChE.

Tabla I.4. Signos clínicos en humanos intoxicados por organofosforados y su correlación con el porcentaje de inhibición de AChE eritrocitaria. (Lotti y col., 1995).

Grado de intoxicación y % de inhibición de AChE eritrocitaria	Signos y síntomas		
	Muscarínicos	Nicotínicos	S.N.C.
Leve, menor al 60%	Náuseas, vómitos, diarrea, salivación, lagrimeo, bradicardia broncoconstricción, aumento de secreciones bronquiales.	No se presentan	Dolor de cabeza y mareos
Moderado, entre el 60 y 80%	Similar al anterior, más miosis e incontinencia urinaria y fecal.	Fasciculaciones en músculos pequeños	Dolor de cabeza, mareos y ataxia
Severo, mayor al 80%	Similar al anterior, pero de mayor intensidad	Fasciculaciones musculares (diafragma y músculos respiratorios)	Dolor de cabeza, mareos, ataxia y convulsiones.

Una sustancial inhibición de la AChE eritrocitaria puede no correlacionarse con los signos clínicos. Este comportamiento podría deberse a un efecto a nivel post sináptico de los OF generando una regulación a la baja de los receptores, lo cual determina el desarrollo de tolerancia por el receptor muscarínico. Esto podría conducir a una disminución de los signos muscarínicos y un retraso en su desarrollo hasta 7 a 10 días luego de la exposición de los signos de parálisis por efecto sobre el receptor nicotínico (Good y col., 1993).

I.3.- FARMACOCINÉTICA

I.3.1.- Introducción

Intentar una definición de farmacocinética es una difícil tarea si consideramos la diversidad de disciplinas en las que se aplican sus conceptos. Quizás la mejor definición que describe el alcance del término “farmacocinética” la hallemos en el prefacio de la primera edición del ya clásico texto “Pharmacokinetics” (Gibaldi y Perrier, 1975).

“La farmacocinética es el estudio de las variaciones en las concentraciones de los fármacos y sus metabolitos en función del tiempo en los diferentes fluidos, tejidos y excretas del organismo, y de las relaciones matemáticas necesarias para desarrollar modelos que permitan interpretar tales datos”.

Los logros de la farmacocinética son tan diversos como las disciplinas que han llegado a beneficiarse aplicando sus principios. Para algunos, el gran logro de la farmacocinética es el descubrimiento de las relaciones entre la respuesta farmacológica y la toxicidad de los niveles de un fármaco y/o sus metabolitos en los líquidos corporales. Para otros, en cambio, el estudio de las cinéticas de absorción, distribución, metabolismo y/o excreción son los pilares indiscutibles en los que hay que basarse para mejorar la comprensión de los mecanismos básicos involucrados en dichos procesos. Otros autores sostienen que la farmacocinética ofrece una herramienta indiscutible y eficaz para lograr mejorar y optimizar el manejo terapéutico de los pacientes en forma individual (Baggot, 1977), además de ser necesaria para velar por la seguridad de un fármaco frente al consumidor y al medio ambiente (EMEA, 2006).

Teniendo en cuenta los conceptos desarrollados anteriormente, consideramos que los procesos involucrados en el destino de un medicamento en el organismo son los de absorción, distribución, biotransformación y excreción. De manera que el comportamiento farmacocinético de un medicamento no puede ser comprendido a menos que estos procesos sean cuantificados. En otras palabras, es necesario conocer la velocidad y la magnitud de cada uno de ellos, y por lo tanto todas las metodologías matemáticas utilizadas para la realización de un análisis farmacocinético se basan en la estimación de las velocidades con que se llevan a cabo estos procesos (Baggot, 1977).

I.3.1.1.- El lenguaje de la farmacocinética

Tal como fuera explicado anteriormente, el estudio de la farmacocinética de un medicamento se basa en la estimación de las velocidades con que sus moléculas se absorben, distribuyen y eliminan, y el lenguaje matemático utilizado para la estimación de las mismas es el del cálculo diferencial.

En farmacocinética, la velocidad de un proceso se define como la variación de masa por unidad de tiempo, lo cual es sinónimo del flujo de medicamento a través del organismo, y se representa de la siguiente manera:

$$\frac{\Delta X}{\Delta t}$$

donde la variación se expresa con la letra griega delta (Δ), X es la masa del medicamento y t es el tiempo. Debe tenerse en cuenta que X se refiere a la cantidad de medicamento presente a un tiempo dado y que el término no debe ser confundido con concentración. La velocidad así definida tiene dos componentes; una es la constante que se refiere a la velocidad del proceso y la otra es la cantidad de medicamento disponible para ser eliminada o transferida,

$$\frac{\Delta X}{\Delta t} = -KX^n$$

donde $-K$ es la constante de velocidad. Como se trata de un proceso de desaparición o pérdida de medicamento ya sea desde un compartimiento, el organismo o desde el sitio de absorción, esta constante se expresa con valor negativo, X es la cantidad de medicamento disponible para ser transferido o eliminado a un tiempo dado y n es el orden del proceso (Gibaldi y Perrier, 1975).

I.3.1.2.- Procesos de orden uno

En estos procesos, también llamados de primer orden, n es igual a 1, de manera que $X^1 = X$, lo que simplifica la ecuación anterior, que queda reducida a la siguiente expresión:

$$\frac{\Delta X}{\Delta t} = -KX$$

Por definición, en un proceso de orden uno $-K$ es una constante, pero la velocidad real del proceso ($\Delta X / \Delta t$) varía en forma proporcional al valor de X , de allí el concepto de cinética lineal. De esta manera $-K$ puede ser vista como la fracción de X que por unidad de tiempo se transfiere desde un compartimiento a otro, desde el organismo al exterior o desde el sitio de absorción hacia la circulación general, por lo que debe ser considerada como una constante de velocidad fraccional masa independiente que se expresa en unidades de tiempo recíproco (Gibaldi y Perrier, 1975; Riviere, 1999).

I.3.1.3.- Procesos de orden cero

En estos procesos n es igual a 0, de manera que $X^0 = 1$, por lo que la ecuación de velocidad se simplifica a la siguiente expresión:

$$\frac{\Delta X}{\Delta t} = -K_0$$

Esto significa que K_0 ya no es una constante de velocidad fraccionaria sino que es la velocidad real del proceso. Esta velocidad es fija y se expresa como masa transferida, eliminada o absorbida por unidad de tiempo (mg/kg, μ g/kg). En resumen, se trata de un proceso cuya velocidad no varía en función del valor de la magnitud de X , o sea que es independiente de la masa presente a un tiempo dado, de allí el concepto de proceso no lineal (Gibaldi y Perrier, 1975; Riviere, 1999).

I.3.1.4.- Frecuencia de los procesos de orden uno y de orden cero

La mayoría de los medicamentos son eliminados mediante sistemas de transporte activo y/o son biotransformados por procesos enzimáticos que involucran gasto de energía (Buxton, 2006). Por definición, estos sistemas presentan capacidad limitada y cuando el número de moléculas de un medicamento excede la capacidad de los mismos, se produce la saturación. Como resultado, la velocidad de los procesos pasa a estar determinada precisamente por su máxima capacidad.

En el caso de un proceso de transporte activo o un sistema enzimático saturado, la cantidad de moléculas transferidas o eliminadas por unidad de tiempo pasa a ser constante e independiente de la cantidad de moléculas disponible en el sitio de transferencia o eliminación, dando lugar a un proceso de orden cero.

Sin embargo, la farmacocinética de la mayoría de los medicamentos puede ser explicada mediante procesos de orden uno, y ello se debe a que a las dosis terapéuticas éstos no llegan a alcanzar concentraciones capaces de saturar los sistemas involucrados en su disposición.

No obstante lo explicado anteriormente, los procesos de orden cero se dan con relativa frecuencia en los procesos de absorción por la transferencia de una cantidad constante de medicamento desde el sitio de absorción al organismo. Este fenómeno es determinado ya sea por el uso de formas farmacéuticas de liberación prolongada de administración enteral, o por el uso de formulaciones de depósito de aplicación parenteral, las que han sido diseñadas para producir la liberación sostenida del fármaco desde su sitio de administración (Baggot, 1977).

I.3.1.5.- Análisis farmacocinético compartimental

El paradigma más importante de un estudio farmacocinético es el análisis compartimental. Se considera como compartimiento a un volumen teórico en donde el fármaco se distribuye en forma instantánea y su concentración es homogénea en cualquier punto del mismo.

En este tipo de análisis se asume que el organismo está formado por un número variable de compartimentos. Cada uno de estos compartimentos está integrado por una o varias regiones no específicas del organismo (órganos y/o tejidos), en donde las concentraciones del fármaco a un tiempo dado son similares y sus velocidades de ingreso y desaparición desde los mismos presentan un mismo orden (Cardoniga, 1993).

El destino de un medicamento en el organismo puede explicarse representando a éste con modelos de diversa complejidad, constituidos por un número variable de compartimentos. En su forma más simple, se puede representar al organismo como un único compartimiento en donde el medicamento ingresa y desde el cual es eliminado, tal y como se presenta en la Figura I.7.

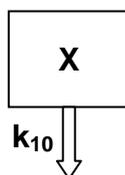


Figura 1.7. Modelo de un compartimiento: donde X es la cantidad de medicamento presente en el organismo y k_{10} es la constante de velocidad de eliminación.

En un mayor grado de complejidad se puede representar al organismo como si estuviese conformado por dos compartimientos (Figura I.8). El primer compartimiento llamado central, que estaría representando la sangre y aquellos órganos con elevada irrigación y a los cuales el medicamento accederá de manera casi instantánea, tales como hígado, riñón, corazón y cerebro. El segundo compartimiento llamado periférico estaría representado por el resto de los órganos y tejidos a los cuales el medicamento difundirá a menos velocidad (Baggot, 1977).

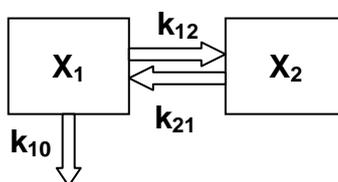


Figura 1.8. Modelo de dos compartimientos; donde X_1 y X_2 son las cantidades de medicamento presentes en los compartimientos central y periférico, respectivamente, k_{12} y k_{21} son las constantes de velocidad de distribución y redistribución y k_{10} es la constante de velocidad de eliminación.

Si bien un organismo puede ser representado por más compartimientos, el modelo de dos compartimientos es el que describe y explica la disposición o destino de la mayoría de los medicamentos, ya que asume que tras la administración de un fármaco éste difunde desde el espacio vascular hacia el resto de los tejidos, desde donde reingresa al torrente sanguíneo para ser eliminado por los principales órganos depuradores (hígado y riñón).

Debe considerarse, que el concepto de compartimiento constituye una visión extremadamente simplificada de un sistema biológico, y que de hecho los compartimientos no constituyen estructuras anatómicas definidas, sino que son entidades teóricas empleadas para el desarrollo de modelos matemáticos que permiten describir, explicar y predecir el movimiento del medicamento dentro del organismo (Rowland y Tozer, 1995).

I.3.1.6.- Análisis farmacocinético no compartimental

I.3.1.6.1. Definición

Conviene tener en cuenta que aunque el término “no compartimental” es usado para definir a esta metodología, todo análisis no compartimental asume que al menos un compartimiento existe, en este caso el central, ya que la mayoría de los estudios farmacocinéticos se realizan a partir de las concentraciones de fármaco medidas en plasma (Riviere, 1999).

Para que el análisis no compartimental pueda ser aplicado, se debe trabajar en sistemas lineales, es decir que debe existir una relación directa entre las concentraciones plasmáticas y la cantidad de medicamento presente en el organismo.

Considerando este último aspecto, todo análisis farmacocinético no compartimental tiene su análogo compartimental, ya que la disposición de un fármaco puede ser explicada por procesos de transferencia y eliminación de orden uno.

El método no compartimental fue aplicado por primera vez en la resolución de problemas farmacocinéticos en el año 1978 por Yamaoka y colaboradores, y se basa en

la teoría del momento estadístico. Esta teoría afirma que una curva de concentración plasmática puede ser considerada como una curva de distribución estadística de manera independiente de la vía de administración utilizada. Los dos primeros momentos estadísticos son los siguientes:

- Área bajo la curva (*AUC*) o momento cero.
- Área bajo el momento de la curva (*AUMC*) o primer momento.

Estos momentos pueden ser calculados mediante integración numérica usando el método trapezoidal. El *AUC* proporciona una estimación de la cantidad de medicamento presente en el organismo, o en otras palabras la magnitud de la exposición al mismo. El *AUMC* no tiene una interpretación fisiológica evidente, pero es empleado para calcular el tiempo medio de residencia o *MRT*, siendo este último, un parámetro indicador del tiempo promedio de permanencia de las moléculas de fármaco en el organismo (Martinez, 1998).

I.3.1.6.2.- Cálculo del área bajo la curva (*AUC*)

Un perfil plasmático esta compuesto por un número finito de concentraciones plasmáticas (C_p) correspondientes a los tiempos (t) de muestreo. En la Figura I.9 se muestra que la $C_{p(1)}$ corresponde al t_1 y la $C_{p(2)}$ corresponde al t_2 . Aunque estas dos concentraciones determinan el segmento de una curva exponencial, podemos considerar que ambas pueden ser unidas por una línea recta descendente desde la $C_{p(1)}$ hasta la $C_{p(2)}$. De esta manera el área delimitada por $C_{p(1)} - C_{p(2)}$ y $t_1 - t_2$ es un trapecio y el cálculo de su área se realiza por medio de la siguiente ecuación:

$$AUC_{t_1-t_2} = \frac{C_{p(1)} + C_{p(2)}}{2} (t_2 - t_1)$$

La sumatoria de todas las *AUC* parciales da como resultado al *AUC* comprendida desde el t_0 hasta el tiempo de la última concentración medida (t_n).

$$AUC_{0-t(last)} = \sum_{i=1}^n \frac{C_{p(i)} + C_{p(i+1)}}{2} (t_{(i+1)} - t_{(i)})$$

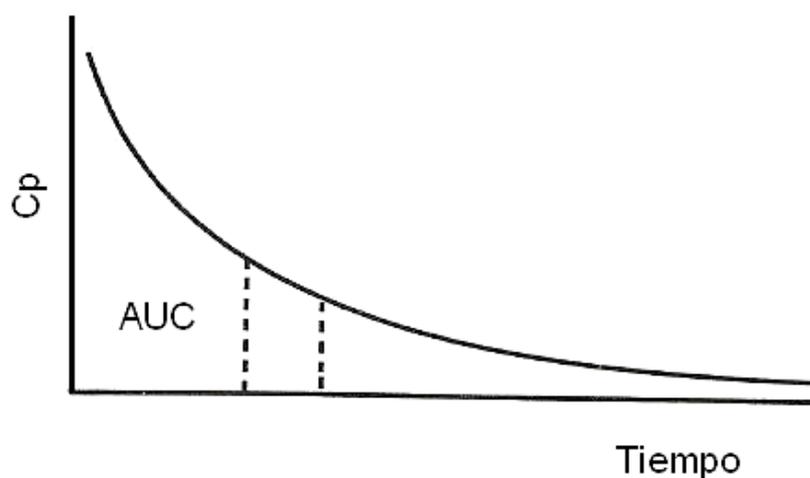


Figura I.9. Representación del área bajo la curva y su determinación mediante el método trapezoidal.

En contraste con la sencillez de su procedimiento de cálculo, éste método acarrea un pequeño error, ya que asume que la relación entre las concentraciones plasmáticas; como por ejemplo $C_{p(1)}$ y $C_{p(2)}$ es una función lineal y no una función exponencial. De lo anterior resulta que en los tramos descendentes de la curva las áreas de los trapecios estarán sobreestimadas, mientras que ocurre lo contrario en los tramos ascendentes de la curva, en donde las áreas de los trapecios se haya subestimada. La magnitud del error, tanto por sobreestimar como por subestimar el área, depende de la curvatura y la distancia entre los puntos. Lo expuesto puede ser comprendido más fácilmente observando la Figura I.10 (Riviere, 1999).

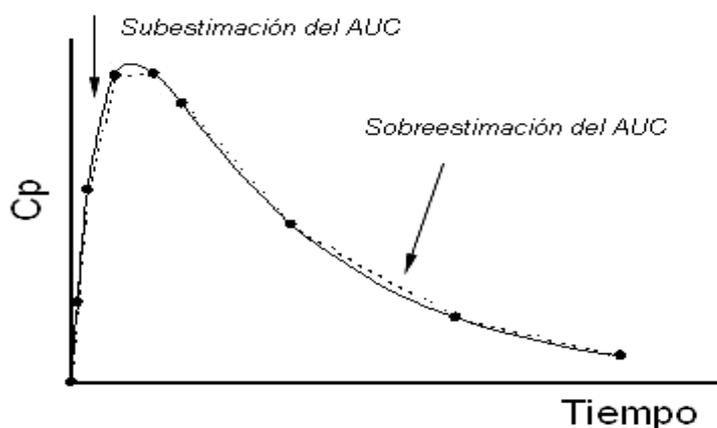


Figura I.10. Evolución de las concentraciones plasmáticas de un medicamento frente al tiempo, obtenida tras su administración extravascular. Los puntos unidos por una línea sólida representan las concentraciones plasmáticas experimentales y la línea de puntos el área bajo la curva calculada por el método trapezoidal aritmético.

I.3.1.6.3.- Cálculo del área bajo un momento de la curva (*AUMC*).

El área bajo el momento de la curva se representa en una gráfica cartesiana como el producto de la concentración plasmática por el tiempo de muestreo *versus* el tiempo. A partir de esta figura, empleando el método del trapecio, puede fácilmente estimarse el área de la Figura I.11. La estimación del *AUMC* es menos precisa que la del *AUC*, puesto que la concentración esta ponderada por el tiempo, y por lo tanto los tiempos mayores generan un valor de mayor peso (Riviere, 1999).

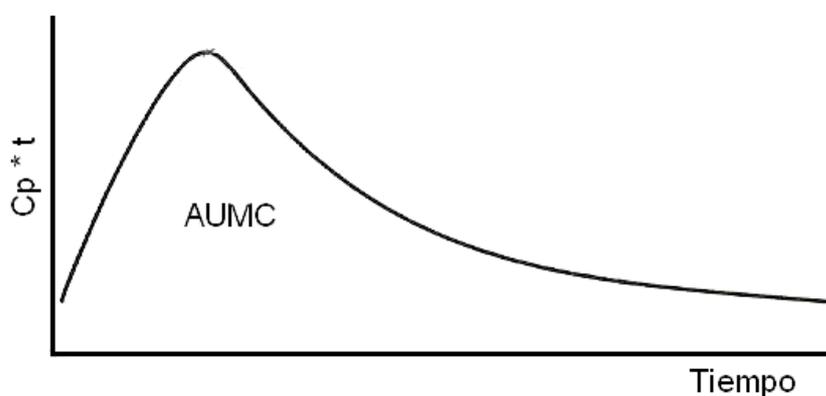


Figura I.11. Representación gráfica del área bajo el momento de la curva.

La fórmula empleada para el cálculo de un intervalo determinado del área bajo el momento de la curva se resuelve de la siguiente manera:

$$AUMC_{t_1-t_2} = \frac{C_{p(1)} + C_{p(2)}}{2} (t_2 - t_1) t_2$$

De modo que el *AUMC* total se calcula por medio de la sumatoria de los valores de las *AUMC* parciales

$$AUMC_{0-t_{(last)}} = \sum_{i=1}^n \frac{C_{p(n)} + C_{p(n+1)}}{2} (t_{(n+1)} - t_{(n)}) t_{n+1}$$

I.3.1.6.4.- Cálculo del Tiempo Medio de Residencia (*MRT*) y de la semivida terminal ($t_{1/2el}$).

El cálculo del *MRT* se basa en la siguiente teoría; si se considera a una molécula “*a*” que ingresa al organismo, es imposible predecir el tiempo que esta permanecerá dentro del mismo, ya que puede ser eliminada rápidamente o permanecer por un período prolongado. Pero si por el contrario consideramos a un grupo de moléculas “*n*”, entonces el tiempo de permanencia del conjunto de moléculas consideradas presentará un comportamiento más homogéneo y el tiempo de permanencia de las mismas puede ser estimado en forma estadística (Martinez, 1998; Riviere, 1999).

Por ejemplo, si un conjunto de “*n*” moléculas permanece en el organismo un período de tiempo “*t*”, entonces $n \times t$ es igual al tiempo medio de residencia acumulado por todas las moléculas. Dividiendo ese valor por el número de moléculas, entonces obtenemos el *MRT* para cada una de las mismas.

$$MRT = \frac{n \times t}{n}$$

Donde *MRT* es el tiempo medio de residencia para un grupo de moléculas; *n* es el número de moléculas ingresadas al organismo y *t* es el tiempo de permanencia de estas en el mismo. Siguiendo la misma línea de razonamiento y considerando varios conjuntos de moléculas, el *MRT* es la sumatoria de los *MRT* parciales de cada grupo de moléculas.

$$MRT = \frac{n_1 t_1}{n_1} + \frac{n_2 t_2}{n_2} + \dots + \frac{n_i t_i}{n_i} = \frac{n_1 t_1 + n_2 t_2 + \dots + n_i t_i}{n_1 + n_2 + \dots + n_i}$$

En un sistema farmacocinético lineal, asumimos que existe una relación directa entre la *C_p* medida a un tiempo determinado y la cantidad de moléculas presentes en el organismo en ese mismo momento. Si en una curva de concentración plasmática *versus* tiempo consideramos una Δt y la *C_p* medida al tiempo final de ese intervalo, entonces tendremos que *C_p* x Δt da como resultado el *AUC* correspondiente al conjunto de moléculas que permanecieron en el organismo durante ese intervalo de tiempo. Aceptando

que $AUC_{0-\infty}$ es proporcional a todas las moléculas que estuvieron presentes en el organismo tenemos que:

$$\frac{C_p \Delta t}{AUC_{0-\infty}}$$

entonces obtenemos el factor de proporcionalidad, que multiplicado por el número de moléculas ingresadas al organismo determina el número de moléculas presentes en el organismo en el intervalo de tiempo considerado:

$$\frac{C_p \Delta t}{AUC_{0-\infty}} n$$

él que a su vez multiplicado por el tiempo final del intervalo:

$$t \frac{C_p \Delta t}{AUC_{0-\infty}} n$$

nos indica el MRT acumulativo de todas las moléculas presentes en el organismo durante el intervalo considerado. De manera que dividiendo ese valor por el número de moléculas ingresadas al sistema:

$$\frac{t \frac{C_p \Delta t}{AUC_{0-\infty}} n}{n}$$

obtenemos el MRT para cada una de las moléculas presentes en el organismo durante el intervalo de tiempo considerado. Suprimiendo el término n e integrando el numerador obtenemos el MRT de todas las moléculas ingresadas al organismo (Riviere, 1999).

$$MRT = \frac{\int_0^n t C_p dt}{AUC_{0-\infty}} = \frac{AUMC}{AUC}$$

El *MRT* así calculado es análogo al $t_{1/2}$ calculado a partir de la k_{el} , y para el caso de un modelo de un compartimiento, el mismo puede ser calculado de la siguiente manera:

$$MRT = \frac{1}{k_{el}}$$

El *MRT* es el tiempo en el cual se han eliminado del organismo el 63,2% de las moléculas tal como lo prueba la siguiente relación:

$$C_p = C_{p(0)} e^{-k_{el} t}$$

Reemplazando t por *MRT* entonces tenemos que:

$$C_p = C_{p(0)} e^{-k_{el} MRT}$$

$$C_p = C_{p(0)} e^{-k_{el} \frac{1}{k_{el}}}$$

$$C_p = C_{p(0)} e^{-1}$$

$$C_p = C_{p(0)} 0,368$$

Es decir que al *MRT* la C_p es el 36,8% de la $C_{p(0)}$ por lo que el 63,2% restante ha sido eliminado.

A partir de esta ecuación tenemos que:

$$k_{el} = \frac{1}{MRT}$$

$$t_{1/2} = 0,693 / (1 / MRT)$$

$$t_{1/2} = 0,693 MRT$$

La $t_{1/2}$ así calculada es el tiempo en que la cantidad de medicamento presente en el organismo ha disminuido hasta su mitad y no debe ser confundido con el $t_{1/2el}$ calculado a partir de la constante de eliminación estimada en la fase terminal de un perfil de concentraciones plasmáticas en función del tiempo (Riviere, 1999; Toutain y Bousquet-Mélou, 2004b).

La semivida de eliminación calculada en la fase terminal o $t_{1/2el}$ es el parámetro farmacocinético más reportado, debido a que es un término que tiene la ventaja aparente de ser fácilmente comprensible puesto que se expresa en unidades de tiempo. Se define como el tiempo necesario para que la concentración plasmática de un medicamento, luego de haberse alcanzado el estado de equilibrio estacionario, disminuya a su mitad (Baggot, 1977). Es un término, que a menudo, ha sido objeto de interpretaciones inadecuadas, donde se le ha considerado como el tiempo necesario para eliminar la mitad de la dosis administrada. Actualmente, se prefiere el uso de semivida terminal en vez de semivida de eliminación, debido a que de esta forma no se prejuzga el mecanismo que controla el descenso de la concentración plasmática (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004b).

La semivida de eliminación permite estimar el momento en el que un medicamento ha sido eliminado del organismo casi en su totalidad. Es un parámetro especialmente relevante en los regímenes de dosis múltiple, debido a que controla el grado de acumulación de un fármaco, las fluctuaciones que sufre la concentración y el tiempo en que tarda en alcanzar el equilibrio. Se puede considerar que el 99% de la cantidad administrada de un medicamento ha sido eliminada luego de haber transcurrido un período equivalente a 10 semividas de eliminación ($t_{1/2el} \times 10$) desde el momento en que comienza la fase aparente de eliminación. Sin embargo, desde un punto de vista clínico, se puede considerar que trascurridas 5 semividas de eliminación ($t_{1/2el} \times 5$) la cantidad de medicamento presente en el organismo es despreciable y prácticamente sin actividad terapéutica, ya que en ese momento se ha eliminado el 97% del total de fármaco ingresado (Riviere, 1999; Toutain y Bousquet-Mélou, 2004b).

I.3.1.6.5.- Concepto de clearance o aclaramiento

El aclaramiento plasmático es uno de los parámetros farmacocinéticos más importante, debido a que es el único que controla, para una biodisponibilidad determinada, la exposición total al fármaco. Este parámetro permite el cálculo de la dosis requerida para mantener una concentración en el estado estacionario, es decir la dosis de mantenimiento. Además, actualmente es una herramienta clave, ya que se emplea para establecer la dosis en base a modelos Farmacocinéticos/Farmacodinámicos (PK/PD), buscando la pauta terapéutica que no sólo permita el éxito clínico, sino que trate de impedir la aparición de resistencias (McKellar y col., 2004).

El aclaramiento representa la capacidad del organismo de eliminar un fármaco, relacionando la velocidad de eliminación del compuesto (cantidad por tiempo) con la correspondiente concentración plasmática (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004a). Así, por definición el clearance o aclaramiento sistémico (Cl_B), es la cantidad de medicamento eliminada por unidad de tiempo dividida por una concentración plasmática de referencia (Baggot, 1977; Baggot y Brown, 1998):

$$Cl_B = \frac{dX / dt}{C_p} = \frac{\text{cantidad / unidad de tiempo}}{\text{concentración}} = \frac{\text{masa} \times T^{-1}}{\text{masa} \times V^{-1}}$$

que en otras palabras puede ser expresado por a la ecuación siguiente:

$$Cl_B = \frac{X_{el}}{C_p}$$

donde X_{el} es la cantidad de medicamento eliminada y C_p es la concentración de referencia, lo que equivale a decir que la velocidad de eliminación del medicamento es relativa a su concentración plasmática. Por lo tanto el clearance puede ser calculado por medio de la siguiente fórmula:

$$Cl_B = \frac{\text{Dosis}}{ABC}$$

El aclaramiento de un fármaco, es decir el volumen de sangre que se depura de éste por unidad de tiempo, es un concepto farmacocinético de suma importancia. Considerando que la eliminación de un medicamento se lleva a cabo en órganos a los cuales este llega vía circulación sanguínea, la velocidad de eliminación del fármaco (masa por unidad de tiempo), estaría expresada por la diferencia entre la cantidad de fármaco que ingresa a los órganos depuradores vía sangre arterial y la cantidad que egresa de los mismos vía sangre venosa.

En ese caso la capacidad máxima de depuración de un organismo estaría dada por el volumen de sangre arterial impulsado por el corazón por unidad de tiempo o gasto cardíaco (Q), por lo que el verdadero elemento de juicio para evaluar la capacidad de un organismo para depurar un fármaco es el coeficiente de extracción (ER) que se calcula como la razón entre el Cl_B y el Q . El valor del ER nos proporciona una medida global de la capacidad depuradora de un organismo expresada como la fracción del Q que es depurada por unidad de tiempo y el mismo es independiente del volumen.

I.3.1.6.6.- Volumen de distribución

El volumen de distribución, relaciona la cantidad de fármaco en el organismo con la concentración plasmática, reflejando un espacio aparente, dentro de la circulación sistémica y la distribución tisular, que es capaz de contener el fármaco; este espacio no tiene por qué identificarse con un volumen fisiológico; incluso cuando puede estar relacionado numéricamente con el volumen orgánico de un compartimento natural no se puede concluir que la distribución del compuesto está limitado a ese fluido orgánico. Este tipo de error se ha cometido de forma muy frecuente. Por todo ello, su correcta denominación es volumen aparente de distribución.

La principal aplicación del volumen de distribución es el poder calcular la dosis de ataque, como puede suceder en un régimen de dosis múltiples o bien en una infusión, para poder alcanzar rápidamente la concentración plasmática terapéutica (Toutain y Bousquet-Mélou, 2004c; Baggot y Brown, 1998)

Simplificando al organismo y considerándolo como si este fuese un único compartimento, el volumen de distribución (V_d) es el volumen teórico en el cual el medicamento se distribuye luego de su administración de manera instantánea y homogénea (Baggot, 1977).

El V_d es por definición el factor de proporcionalidad que relaciona la cantidad de medicamento presente en el organismo a un tiempo dado $X_{(t)}$ con la concentración plasmática medida a dicho tiempo $C_{p(t)}$, tal y como se presenta en la siguiente ecuación:

$$V_d = \frac{X_{(t)}}{C_{p(t)}}$$

Se han definido varios volúmenes de distribución, dos de los más relevantes son el volumen de distribución durante el estado de pseudo-equilibrio, calculado por el método del área ($V_{d(\text{área})}$) y el obtenido en el estado de equilibrio ($V_{d(ss)}$). El volumen de distribución en el estado de equilibrio estacionario puede calcularse empleando la teoría de los momentos estadísticos mediante la siguiente ecuación:

$$V_{d(ss)} = Cl \times MRT = \frac{Dosis}{AUC} MRT = \frac{Dosis}{AUC} \times \frac{AUMC}{AUC} = \frac{Dosis AUMC}{AUC^2}$$

El volumen de distribución en estado de pseudo-equilibrio se puede calcular a partir de la siguiente ecuación:

$$V_{d(\text{área})} = \frac{Cl}{\lambda_z} = \frac{Dosis}{AUC_{(0-\infty)}} \times \frac{1}{\lambda_z}$$

De esta manera, el V_d es determinado por la fisiología del organismo en cuestión, las propiedades físico químicas de la molécula administrada y los coeficientes de difusión transmembrana (Buxton, 2006).

I.3.1.6.7.- C_{\max} y t_{\max}

La máxima concentración plasmática observada (C_{\max}) y el tiempo en el que ésta se presenta (t_{\max}) son importantes elementos a tener en cuenta ya que pueden darnos una idea general sobre la magnitud y la velocidad del proceso de absorción. Sin embargo tanto C_{\max} como t_{\max} son también influenciados por la cinética de los procesos de absorción, distribución y eliminación (Gibaldi y Perrier, 1975).

Se considera que C_{\max} es el punto de la curva de concentración plasmática vs. tiempo en el que la velocidad instantánea de absorción es igual a la velocidad instantánea de eliminación y la derivada de la concentración plasmática en función del tiempo (dC_p/dt) es igual a cero.

El valor de t_{\max} es un indicador indiscutible de la velocidad del proceso de absorción de un medicamento, y su valor es inversamente proporcional a la velocidad a la que ésta se lleva a cabo, razón por la cual si un fármaco se absorbe rápidamente, alcanzará el C_{\max} en poco tiempo, mientras que si la absorción se realiza lentamente, C_{\max} se alcanzará tardíamente y el valor del t_{\max} será mayor (Baggot, 1977).

I.3.2.- Influencia de la edad en la farmacocinética

I.3.2.1.- Introducción

El nacimiento determina el cese de la protección intrauterina y del aporte placentario de oxígeno, agua y nutrientes. El feto pasa de un medio ambiente isotérmico, oscuro, acuoso y estéril a otro de temperatura cambiante, luminoso, aéreo y contaminado. Este cambio brusco requiere un gran esfuerzo de adaptación fisiológica por el organismo en conjunto y por sus distintos órganos, aparatos y sistemas particulares (Brines y col, 1997).

La maduración de los órganos ocurre de forma paulatina desde el nacimiento; esto implica que los procesos farmacocinéticos también experimentan maduración, y hasta que se normalizan o alcanzan los valores del adulto transcurre un período de tiempo que varía para cada proceso en particular. No obstante, en la vejez, la funcionalidad de estos sistemas orgánicos sufre una apreciable disminución (Baggot, 2001).

Como consecuencia, los regímenes de dosificación, que normalmente son desarrollados a partir de estudios en los que se utilizan animales adultos, no pueden ser simplemente extrapolados a neonatos o a pacientes seniles de la misma especie ya que muchas de las modificaciones fisiológicas que acontecen a lo largo de la vida, pueden alterar las concentraciones y el tiempo de permanencia del fármaco en el organismo, y consecuentemente, originar un fallo terapéutico o toxicidad, además del riesgo de inducir resistencia medicamentosa y de los efectos que puede ocasionar sobre el medio ambiente (Schwark, 1992).

Por lo expuesto, desde el punto de vista farmacocinético podríamos considerar tres grupos etarios bien diferenciados, esto es, el de los individuos jóvenes, el de los adultos y el de los seniles. A continuación se describen brevemente las principales características diferenciales en el comportamiento farmacocinético entre animales jóvenes respecto a los adultos, ya que precisamente éste fue uno de los ejes centrales del estudio.

I.3.2.2.- Absorción

Aunque son muchos los factores que se modifican con la edad y que por lo tanto pueden afectar la absorción, nuestra revisión se ha centrado en las particularidades de la absorción cutánea, debido a que en nuestro estudio se ha evaluado la administración *pour-on* de clorpirifos. Además, hemos considerado adecuado abordar las particularidades de la piel de los bovinos y su influencia en la absorción.

I.3.2.2.1.- Absorción dérmica:

En veterinaria existe una gran variedad de preparados farmacológicos disponibles para la aplicación tópica sobre la piel; la mayoría de estas preparaciones tienen como objetivo producir un efecto local, pero algunas van dirigidas a originar un efecto sistémico. La piel, una de las barreras biológicas más impermeables al agua que se encuentran en la naturaleza, es un órgano complejo y de gran tamaño, que llega a representar el 10% del peso vivo en bovinos (Baggot, 2001). Está constituida por epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis es la capa más externa y esta compuesta por células epiteliales queratinizadas dispuestas en capas, agrupadas de acuerdo al

estadio de diferenciación. Estas células se originan en el estrato basal y se tornan más queratinizadas en la medida que se acercan a la superficie cutánea, por lo que precisamente el estrato córneo se constituye en el punto crucial de la absorción de medicamentos (Baggot, 2001; Magnusson y col., 2001).

La liberación del principio activo desde la formulación aplicada en la superficie de la piel y su transporte hacia la circulación sistémica es un proceso que incluye diversos pasos: (a) disolución del principio activo y liberación desde la formulación, (b) partición desde la formulación hacia la capa más externa de la piel, (c) difusión dentro del estrato córneo, (d) partición desde el estrato córneo hacia la dermis y (e) difusión hacia los capilares sanguíneos (Kalia y Guy, 2001).

Los fármacos aplicados de forma tópica pueden atravesar la piel por diferentes rutas: intercelular, transcelular y a través de los anexos. Las drogas no polares atraviesan el estrato córneo por la vía intercelular, mientras que las drogas polares lo hacen por la ruta transcelular. Las glándulas sebáceas son más permeables que los corneocitos, por lo tanto la unidad pilo-sebácea (foliculo piloso, pelo y glándula sebácea) constituye una importante vía alternativa que permite que las drogas alcancen la dermis evadiendo la impermeabilidad del estrato córneo intacto (Barry, 2001).

El lento paso de los fármacos a través de los dominios lipídicos del estrato córneo es seguido de una rápida difusión a través de la dermis papilar (Ramachandran y Fleisher, 2000). Ambos procesos se llevan a cabo por difusión pasiva. La velocidad y la magnitud de este transporte están gobernadas por la ley de Fick, según la cual la velocidad de difusión es directamente proporcional al coeficiente de difusión y al de partición del principio activo y a la solubilidad del mismo en el medio acuoso que rodea la membrana, siendo inversamente proporcional al grosor de la membrana a ser atravesada (Villarino y Landoni, 2006).

A esto se debe sumar otro factor que influye notoriamente en la absorción de fármacos aplicados por vía cutánea, como es el excipiente empleado en la formulación; el parathión es absorbido mucho más rápido desde la piel de los porcinos cuando es

aplicado junto a dimetilsulfóxido que cuando es aplicado junto a una mezcla de gliceroformaldehído, isopropranol, octanol y macrogol (Baggot, 2001). Además, siempre se debe tener en consideración la posibilidad de un efecto de primer paso a este nivel, ya que pueden tener lugar reacciones de oxidación mediadas por el citocromo P450, de hidrólisis y de conjugación con glucurónico, sulfato y glutatión (Gochfeld, 2007, Baggot, 2001).

I.3.2.2.2.- Influencia de la especie

De forma más específica, debemos señalar que existen una serie de diferencias anatómo-fisiológicas entre los rumiantes y otros mamíferos que pueden condicionar una diferente respuesta farmacocinética tras su aplicación en piel. En bovinos y ovinos, el folículo piloso constituye una de las vías más importante para la absorción de medicamentos a nivel cutáneo. Se estima que existen más de 10.000 folículos pilosos por cm² en algunas regiones de la piel de ovejas merino frente a los 40-70 folículos/cm² en humanos (Rider y col., 1957). Además, estas especies para proteger su piel exudan grandes cantidades de material lipóideo. Estas secreciones exocrinas poseen propiedades emulsionantes que pueden aumentar la disolución y, así, facilitar la absorción (Baggot, 2001).

Precisamente, la alta densidad de estas estructuras y la presencia de estas sustancias emulsificantes provenientes de la secreción sebácea, facilitan la absorción cutánea de fármacos y hacen que probablemente esta estructura contribuya más en la absorción percutánea de compuestos hidrofílicos en estos rumiantes que en otras especies (Walters y Roberts, 2002). Respecto a la influencia de la secreción sudorípara hay que tener en cuenta que sólo los equinos y los seres humanos son capaces de sudar profusamente (Baggot, 2001). Otro factor a considerar es el grosor del estrato córneo, ya que en los perros, cerdos y seres humanos es en promedio de 19,9 µm, en tanto que en los bovinos y ovinos puede alcanzar los 30 µm (Magnusson y col., 2001). También se debe considerar que el peso que supone la piel con respecto al peso vivo del animal es, aproximadamente, del 10% para vaca, cabra y perro, 7,5% para caballo y 3,7% para humanos (Monteiro-Riviere y col., 1990).

Estas diferencias que se presentan entre las diversas especies animales, hacen que sea difícil extrapolar los datos de absorción dérmica de una especie a otra (Monteiro-Riviere, 1990).

I.3.2.2.3.- Influencia de la edad

Las propiedades de defensa cutánea que impiden el ingreso de sustancias extrañas al organismo no están lo suficientemente maduras inmediatamente después del nacimiento. Esto podría estar determinado por los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en el proceso de maduración de la piel. Dentro de los cambios morfológicos tenemos el espesor de la piel y, fundamentalmente del estrato córneo, ya que este último es mucho más grueso en los animales adultos, en tanto que uno de los principales cambios funcionales es el flujo sanguíneo en la dermis. Todo esto determina que la absorción cutánea sea mayor en neonatos que en adultos (Kielhorn y col., 2006).

I.3.2.2.4.- Influencia de la estación del año

La temperatura cutánea tiene un importante impacto en la velocidad de absorción de los fármacos aplicados sobre la piel. Por un lado, el incremento en la temperatura aumenta la absorción por un mecanismo directo, ya que afecta la difusión dentro de la piel, al modificar la conformación del estrato córneo, particularmente la estructura cristalina de la bicapa lipídica. Por otra parte, la temperatura también afecta el flujo sanguíneo a la piel, así el aumento de la temperatura cutánea reduce la resistencia vascular periférica con lo cual se incrementa el flujo de sangre a la piel y por lo tanto facilita la absorción de los fármacos. En general, este mecanismo, es importante para incrementar la absorción de moléculas pequeñas y moderadamente liposolubles que ingresan rápidamente a la piel, pero que se absorben lentamente a la circulación general (Kielhorn y col. 2006).

Por lo tanto, es evidente que la época del año puede modificar la tasa de absorción de fármacos aplicados por vía tópica, fundamentalmente de aquellos de liposolubilidad moderada, tal como fue demostrado en humanos para parathión, o-ethyl metilfosfonotionato y clonidina (Funckes y col., 1963; Craig y col., 1977; Fujimura y col., 1996). En el caso de los bovinos, Taylor y colaboradores (1983), demostraron que

la biodisponibilidad del levamisol era entre un 60 y 70% superior en verano respecto a la obtenida cuando el medicamento era aplicado en invierno. De todos modos, es importante consignar que las condiciones climáticas no sólo afectan la absorción por modificar las características de las secreciones cutáneas, sino que hay otros factores que deben ser tenidos en cuenta, como son la exposición a la lluvia o a baños (que incrementan la tasa de lavado del fármaco) y la intensidad de la radiación solar a la que se ven sometidos los animales (que, sin lugar a duda, constituye un factor que disminuye la disponibilidad de compuestos fotosensibles aplicados de forma tópica) (Forsyth y col., 1983).

I.3.2.3.- Distribución

Existen varios factores que afectan la distribución de fármacos que tienen la particularidad de diferir entre neonatos y adultos y que por lo tanto originan modificaciones en la disposición cinética en estos animales.

El agua corporal, que constituye del 60 al 75% del organismo, puede considerarse distribuida en varios compartimentos. Algo más de la mitad está contenida en el interior de las células, por lo que el agua intracelular constituye del 30 al 40% del peso corporal. El líquido extracelular incluye el plasma sanguíneo (4-5%), el líquido intersticial (16- 18%) y el transcelular (1-3%) (Baggot, 1977).

El contenido acuoso es más bajo en los adultos que en los recién nacidos. Así, el agua corporal puede comprender el 75% del peso total en un animal neonato, mientras que en un adulto es del 60%. En el caso de cabras, el volumen extracelular representa el 43% del peso corporal a la primer semana de vida, mientras que a la tercera desciende al 34% (Kami y col., 1984). Ese descenso en el volumen acuoso es más notorio en los primeros meses, pero continúa lentamente hasta la edad adulta (Figura I.12) (Gürtler y col., 1976).

Es importante destacar que después del nacimiento se producen modificaciones en las proporciones de cada uno de los compartimentos. Así, mientras el volumen de líquido extracelular se reduce, el del líquido intracelular aumenta (Friis, 1979; de Backer, 1986).

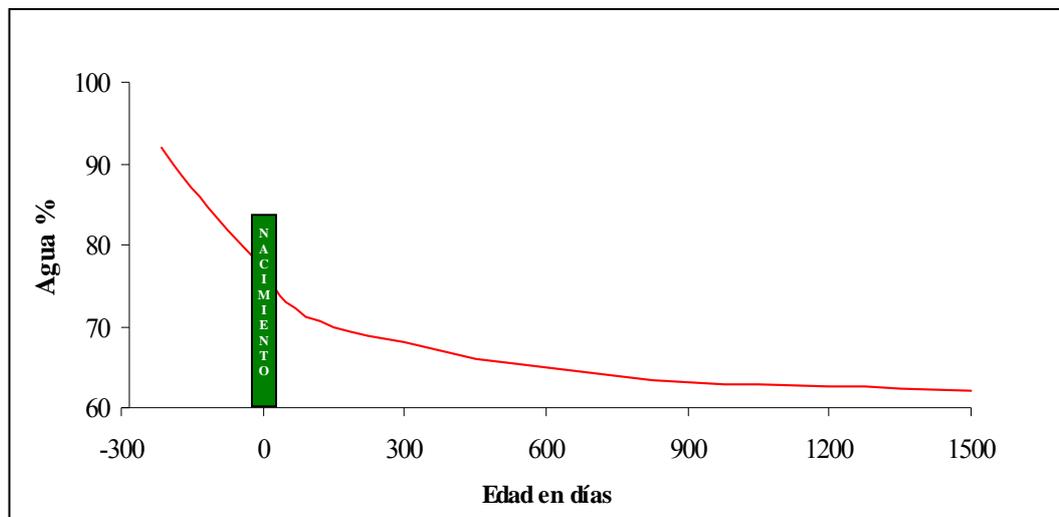


Figura I.12. Relación entre el contenido acuoso y edad en el ganado vacuno (Gürtleret, 1976)

El desarrollo de este tipo de cambios podría tener un efecto significativo en la distribución de fármacos polares, compuestos hidrosolubles como el caso de penicilinas, aminoglucósidos y antiinflamatorios no esteroideos (Baggot, 1992, de Backer, 1986).

Aunque los fluidos del contenido gastrointestinal pueden considerarse extracorpóreos, conviene tener presente que en los rumiantes el contenido del tubo digestivo, que representa del 12 al 15% del peso corporal, puede constituir un compartimento especial de “distribución” de ciertos compuestos, como sucede con el sistema rumen-retículo, pudiendo realizarse un intercambio bidireccional de fármacos y justificando así los elevados volúmenes de distribución descritos para algunos fármacos en estas especies (Dunlop, 1983).

En los rumiantes el desarrollo del estómago es incompleto al momento del nacimiento, pudiéndose dividir en general en tres etapas: del nacimiento a las tres semanas de edad, donde el rumen y el retículo no son funcionales; de tres a ocho semanas, aquí los preestómagos inician su desarrollo y de las ocho semanas en adelante, cuando estos órganos son por completo funcionales (Gürtler y col., 1976).

En los terneros recién nacidos pueden distinguirse ya claramente las cuatro cavidades del estómago. En ese momento corresponde al abomaso entre el 56 al 62% del volumen total del complejo gástrico. Como resultado de la ingestión de alimentos vegetales, se produce después un notable desarrollo de los preestómagos, de manera que a la edad de 4 semanas constituyen, el rumen y el retículo, el 64% del volumen gástrico total, cifra que se eleva al 75% a las 12 semanas. En los animales adultos esta proporción acaba por ser del 87% del volumen total (Gürtler y col., 1976).

La unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas es otro factor importante a tener en cuenta, ya que solamente la fracción no unida puede atravesar membranas biológicas. Esta unión a proteínas plasmáticas depende de la cantidad de proteínas presentes y de la afinidad del fármaco hacia las proteínas. Debido a que animales neonatos presentan una menor cantidad de proteínas plasmáticas que los adultos, el grado de unión está condicionado por la edad del animal (Baggot, 1977).

En el cerdo, la unión del trimetropin a las proteínas plasmáticas se incrementa de un 45% en el neonato al 75% en el adulto (Gyrd-Hansen y col., 1984). También en cerdos, la unión del ácido salicílico a las proteínas plasmáticas se incrementa en forma paralela al aumento en la concentración de albúminas en plasma (Short y Tumbleson, 1973).

Por lo tanto, se puede concluir que en los neonatos existe una menor tasa de unión a las proteínas plasmáticas y por ende los fármacos pueden evidenciar una mayor distribución (Baggot, 1992).

En general, el tejido adiposo y la masa muscular son sustancialmente más escasos en animales jóvenes que en animales maduros (Reiche, 1983). A causa de que muchos fármacos tienen gran afinidad por estos tejidos, sobre todo los fármacos liposolubles en el tejido adiposo, se podría predecir que la carencia de estos depósitos en los neonatos puede limitar la captación de fármacos liposolubles, incluyendo dentro de éstos a los barbitúricos y a los organofosforados, lo que puede generar una

prolongación del efecto, ya que estos fármacos presentarían una menor redistribución en el tejido adiposo (Branson y Booth, 1995).

Una diferencia adicional, particularmente en el período neonatal temprano, es la carencia en el desarrollo de ciertas barreras al acceso de los fármacos, tales como la barrera hematoencefálica (Saunders, 1977), lo cual puede permitir la difusión de los fármacos hacia estas zonas en el neonato, esto hace que se alcancen concentraciones terapéuticas de muchas drogas en sitios que se consideran inaccesibles para los adultos, tal es el caso de la penicilina, que solamente atraviesa la barrera hematoencefálica en neonatos o cuando se ha alterado la integridad de la misma por algún proceso patológico (Shoaf y col., 1989).

I.3.2.4.- Metabolismo

El principal sitio donde los fármacos son biotransformados es el hígado, y las reacciones metabólicas que allí acontecen pueden clasificarse en reacciones de Fase I (oxidación, reducción e hidrólisis) y Fase II (acilación, glucuronidación, metilación, sulfonación, conjugación con aminoácidos, entre otros) (Baggot, 1977).

El grado de desarrollo de estas vías metabólicas al nacimiento es diferente para cada una de ellas; así la actividad oxidativa del sistema microsomal citocromo P-450 al igual que las reacciones de glucuroconjugación están poco desarrolladas en neonatos, en tanto que la capacidad de acilación y conjugación con sulfatos y glicina en el recién nacido es similar a la de los adultos (de Backer, 1986; Nouws, 1992).

El metabolismo oxidativo en terneros se desarrolla de manera gradual, siendo similar al de los adultos entre las 3 y 12 semanas de vida (Nouws, 1992). Es importante consignar que la naturaleza del fármaco al igual que la composición del alimento afectan el desarrollo del metabolismo oxidativo a nivel hepático, así la ingesta de alimentos toscos estimula los procesos de oxidación, mientras que la alimentación con leche parece demorarla. En terneros, se ha demostrado que existe una baja capacidad oxidativa durante los primeros días de vida para varias sulfamidas (Nouws y col., 1988; 1991).

Muchas reacciones de oxidación son seguidas por conjugación con ácido glucurónico. Esta vía metabólica acelera notoriamente la excreción renal de los fármacos que sufren este proceso. La glucuronoconjugación es una importante vía metabólica para fármacos del tipo alcoholes, fenoles, ácidos carboxílicos y amidas (Baggot, 1977), y requiere aproximadamente entre 2 a 8 semanas en potrillos, terneros y niños para desarrollarse completamente (Reiche, 1983; Adamson y col., 1991).

Como consecuencia de estas deficiencias enzimáticas los compuestos no polares, que requieren de biotransformación para originar metabolitos rápidamente excretables, permanecerían por más tiempo en el cuerpo de los animales inmaduros que en los adultos (Schwark, 1992).

Si bien no hay reportes que indiquen si existen diferencias entre neonatos y adultos, la piel es un sitio importante en el cual los fármacos aplicados por vía cutánea pueden ser metabolizados mediante reacciones oxidativas mediadas por citocromo P450, reacciones hidrolíticas, conjugaciones con glucurónido, sulfatos y glutatión así como también por acetilación. Aunque la actividad enzimática del citocromo P450 de la piel representa sólo entre un 1 a 5% de la capacidad hepática, la actividad de las transferasas que participan en reacciones de conjugación puede constituir hasta un 10% de la actividad del hígado (Baggot, 2001).

I.3.2.5.- Excreción

La principal ruta de eliminación de fármacos y sus metabolitos es por excreción renal. El fármaco libre en plasma, es decir aquel no unido a proteínas, alcanza la luz tubular por filtración glomerular, y en el caso de bases y ácidos débiles por secreción tubular. La cantidad final de fármaco eliminado en la orina está gobernado por el grado de reabsorción tubular que acontece en la nefrona distal. Esto se ve afectado por factores tales como la concentración de orina, el pH urinario y pK del fármaco (Baggot, 1977). Debido a que los cambios en la dieta provocan modificaciones en el pH urinario, éste es un factor que puede afectar el grado de ionización del fármaco y por ende la reabsorción tubular (Watson y col., 1987).

La funcionalidad renal es incompleta en la mayoría de los animales al momento del nacimiento. En las especies rumiantes, parece ser completa entre la primera y segunda semana de vida (de Backer, 1986).

El desarrollo de la filtración glomerular requiere solamente de 2 a 7 días en rumiantes neonatos, pero necesita más de 2 semanas en cerdos, perros y humanos (Friis, 1979; de Backer, 1986; Nouws y col., 1988). Para aquellas drogas que son eliminadas principalmente por filtración glomerular y que no son metabolizadas, se debe esperar tasas de aclaración similares entre rumiantes neonatos de más de dos semanas y adultos (Burrows y col., 1983; 1987).

La maduración de la función tubular requiere más tiempo y, por lo tanto, los efectos que ejerce sobre la farmacocinética son más pronunciados que la que genera la filtración glomerular. En rumiantes la madurez se alcanza dentro de las 2 a 3 semanas, mientras que en cerdos y perros se requieren 4 a 8 semanas (Friis, 1979; de Backer, 1986; Nouws y col., 1988).

I.3.3.- Influencia del sexo en farmacocinética

Existen diversos factores atribuibles al dimorfismo sexual que pueden modificar el comportamiento cinético de los fármacos, ya sea tanto en la fase de absorción, distribución, metabolismo o excreción, tal como se detalla a continuación.

I.3.3.1.- Absorción

Sin lugar a dudas es a nivel gastrointestinal donde el sexo ejerce una mayor influencia en la absorción, ya que precisamente algunos de los factores que la condicionan, tales como la secreción estomacal ácida, la tasa de vaciado gastrointestinal, el flujo sanguíneo, el área de superficie expuesta, el efecto de primer paso gastrointestinal y hepático, son dependientes del sexo del individuo (Gandhi y col., 2004).

Algunas características de las secreciones gastrointestinales como el pH, la osmolaridad, las concentraciones de electrolitos y los niveles de ácidos biliares y proteínas parecen no variar en función del sexo (Dressman y col, 1990; Lindahl y col., 1997), aunque no todos los autores coinciden en este hecho (Collen y col., 1994).

Es importante señalar que la motilidad gastrointestinal está influenciada por las hormonas sexuales (Hutson y col., 1989; Singer y Brandt, 1991). Los estrógenos disminuyen el vaciado gástrico (Coskun y col., 1995), en tanto que la progesterona a bajas concentraciones la incrementa y a altas la inhibe (Liu y col., 2002; Chen y col., 1995). En humanos está demostrado que la velocidad de tránsito gastrointestinal es más lenta en mujeres que en hombre (Sadik y col., 2003; Barahona y col., 2001). Durante la preñez también se producen modificaciones en la velocidad de vaciado gástrico, por el efecto mecánico que ejerce la presencia del feto y por los altos niveles de progesterona circulante (Singer y Brandt, 1991).

Las enzimas gastrointestinales responsables del metabolismo de los fármacos también pueden variar por efecto del sexo. La actividad de la enzima alcohol deshidrogenasa es superior en hombres que en mujeres (Barahona y col., 2001; Pastino y col., 2000; Frezza y col., 1990), por ello, ante la ingestión de la misma cantidad de alcohol, las concentraciones plasmáticas son superiores en mujeres que en hombres. Esta diferencia también fue descrita en animales (Lee y col., 2001; Aasmoe y Aarbakke, 1999).

Los enterocitos expresan niveles significativos de la isoenzima citocromo P450 3A (CYP3A), la cual contribuye significativamente con el efecto de primer paso de muchos fármacos administrados por vía oral. De todos modos no se han reportado que existan diferencias significativas en la expresión intestinal de CYP3A entre machos y hembras (Kolars y col., 1992). Tampoco se han encontrado diferencias en la expresión a nivel intestinal de proteínas transportadoras, como glicoproteína P, entre machos y hembras (Gandhi y col., 2004).

Son muy escasos los estudios que evalúan la influencia del sexo en la absorción de fármacos a través de la piel (Bronaugh y Maibach, 1999) siendo las ratas una de las especies en la cual se ha comprobado que existen diferencias en la permeabilidad cutánea en función del sexo, puesto que la piel de las ratas hembras es más permeable a los compuestos polares que la de los machos (Bronaugh y col., 1983).

La Comisión Internacional de Protección Radiológica estableció que en humanos el grosor de la piel es aproximadamente el mismo tanto para hombres como para mujeres, 70 μm (Valentin, 2001). Por su parte en bovinos de raza Holstein el grosor de la piel de los toros ($5,98 \pm 0,53$ mm) es mayor que el de las vacas ($4,62 \pm 0,06$ mm) de una edad equiparable (Muralidharan, 2006).

No obstante, es preciso señalar que resulta sumamente complicado evaluar la absorción cutánea, puesto que la actividad metabólica que presenta la piel intacta puede ocasionar que el fármaco sea metabolizado antes de alcanzar la circulación general, y por lo tanto se confunda el efecto de primer paso con baja absorción cutánea (Gochfeld, 2007).

I.3.3.2.- Distribución

En general, las hembras presentan un mayor porcentaje de grasa corporal, un menor promedio de peso, un menor volumen plasmático y un menor flujo sanguíneo a los tejidos, todo lo cuál puede influenciar la distribución de los fármacos (Gandhi y col., 2004). Estas diferencias en bovinos a su vez, pueden depender del tipo de animal a evaluar, ya que es muy distinto el porcentaje de grasa corporal que presentan las razas índicas, británicas o continentales (Mezzadra, 2005).

Las principales proteínas responsables de vehiculizar a los fármacos en plasma son la albúmina, la α_1 -glicoproteína ácida (AAG) y las α -globulinas. La concentración de albúmina no se modifica en función del sexo, pero la AAG sí está influenciada por los estrógenos, tanto endógenos como exógenos, ya que estos disminuyen el nivel de esta glicoproteína en plasma y aumentan su glicosilación (Brinkman-Van der Linden y col., 1996).

No obstante, en un estudio desarrollado en ovejas se evidenció que tras la aplicación de albendazol, la unión de los metabolitos de este fármaco a las proteínas plasmáticas, tanto albúminas como globulina, era menor en machos que en hembras (Cristofol y col., 1998). Esto podría ser debido a que los ácidos grasos no esterificados y la testosterona se unen a las albúminas plasmáticas (Watanabe y Sato, 1996), por lo tanto compiten con el fármaco por el sitio de unión, pudiéndolo desplazar y hacer que aumente la fracción libre en los machos.

La preñez ejerce un efecto sumamente complejo interfiriendo en la tasa de unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas, ya que en la medida que la preñez avanza, la concentración de albúminas y otras proteínas plasmáticas disminuye, lo cuál determina que exista más fármaco libre y, por ende, una mayor cantidad de fármaco disponible (Haram y col., 1983). Los resultados obtenidos cuando se ha valorado la influencia del sexo sobre la concentración de la AAG son contradictorios; en algunos trabajos se observa que los niveles de dicha glicoproteína disminuyen (Aquirre y col., 1988; Wood y Wood, 1981), mientras que otros indican que no hay diferencias (Chu y col., 1981).

A medida que avanza la preñez, se produce un incremento sostenido en la producción de ligandos endógenos, tal el caso de los ácidos grasos libres, que compiten con los fármacos por sitios de unión a la albúmina (Notarianni, 1990; Hill y Abramson, 1988). Además, la capacidad de unión a las proteínas podría estar reducida de forma secundaria, debido a las modificaciones que acontecen durante la preñez en la estructura proteica (Perucca y Crema, 1982).

I.3.3.3.- Metabolismo

El metabolismo parece desempeñar un papel importante en las diferencias farmacocinéticas que se presentan entre machos y hembras. El aclaramiento hepático de los fármacos depende del flujo sanguíneo al órgano y de la actividad de las enzimas hepáticas. Aunque el gasto cardíaco y el flujo de sangre al hígado es menor en hembras que en machos, las diferencias farmacocinéticas que se presentan en función del sexo

parecen deberse casi exclusivamente a diferencias en la actividad de las enzimas hepáticas, tanto en las de Fase I como de Fase II (Beierle y col., 1999).

Desde el punto de vista clínico las enzimas más importantes del sistema citocromo P450 a nivel hepático y de mucosa intestinal de los humanos son los CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 y CYP2E1 (Gandhi y col., 2004). Los microsomas de los rumiantes expresan las isoformas CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E, CYP3A y CYP4A (Nebbia y col., 2003; Machala y col., 2003).

Las hormonas sexuales influyen sobre la actividad del citocromo P450. La actividad de la CYP2J5 del riñón de ratones, isoenzima que convierte el ácido araquidónico en ácido epoxieicosatrienoico, es estimulada por la testosterona y reprimida por los estrógenos. Así, los machos presentan más actividad CYP2J5 que las hembras y la castración deprime su expresión. Además, la administración de testosterona a hembras o a machos castrados incrementa la expresión de esta proteína a valores cercanos a los normales para machos enteros; el tratamiento de hembras ovariectomizadas o de machos castrados con estradiol reduce el CYP2J5 y aquellos machos que poseen una reducida expresión de receptores androgénicos tienen bajos niveles de CYP2J5 y no responden a la aplicación de dihidrotestosterona (Ma y col., 2004).

Una de las isoformas más abundantes de CYP en el hígado humano es la CYP3A4, isoenzima que representa aproximadamente el 30% de la actividad CYP hepático total. A diferencia de lo descrito a nivel intestinal, existen numerosos estudios que han demostrado que la actividad de la forma CYP3A4 en hígado es superior en mujeres que en hombres, ya que el aclaramiento de algunos fármacos, como eritromicina, verapamilo, diazepam, metilprednisolona y ciclosporina se ve incrementado en un 20 a un 40%. Generalmente, estas diferencias entre sexos se han atribuido a una distinta actividad metabólica; pero, hay investigadores que también las relacionan que en realidad con modificaciones en el transporte a través de membranas (Meibohm y col., 2002). De hecho, la glicoproteína P, importante proteína de membrana, producto del gen MDR-1, que actúa como bomba de expulsión de diversos

fármacos, se expresa entre un 30 a un 50% menos en las células hepáticas de mujeres que de hombres. Esto determinaría que en las hembras se encuentre una mayor disponibilidad intracelular del fármaco y por lo tanto una mayor tasa metabólica hepática para aquellos fármacos que son sustrato tanto de la CYP3A4 como de la glicoproteína P (Kaltenbach y Dukic, 2003).

En bovinos y otros animales domésticos, se han descrito diferencias sexo dependientes en la actividad metabólica del citocromo P450 (Capece y col., 2000; Janus y Antoszek, 2000). En un estudio, desarrollado en bovinos de raza limousine y piemontesa, se comprobó que la actividad de la enzima CYP3A era mayor en machos que en hembras de la raza piemontesa, en tanto que no encontraron diferencias entre machos y hembras de bovinos de la raza limousine (Dacasto y col., 2005).

La CYP2D6, segunda isoforma hepática en importancia para el metabolismo de fármacos en humanos, no presenta una dependencia clara en su actividad frente al sexo; ya que algunos estudios han encontrado una mayor actividad de esta isoforma en mujeres, pero la mayoría de esos trabajos carecen de la suficiente consistencia científica como para determinar fehacientemente que dichas diferencias existen (Kaltenbach y Dukic, 2003).

El CYP1A2, isoforma que participa de la oxidación de la teofilina, de la clozapina y del ondansetrón, presenta una menor actividad en la mujer que en el hombre (Meibohm y col., 2002, Anderson, 2002).

Para otras isoformas, como el caso de CYP2C9 y CYP2C19 no se han reportado diferencias en su actividad en función del sexo (Schwartz, 2003). Aunque es preciso señalar que la actividad de la forma CYP2C19 se reduce cuando se administra conjuntamente a estradiol y progesterona (Palovaara y col., 2003).

Las ratas adultas hembras presentan casi la mitad de la actividad de carboxiesterasa hepática que los machos, en tanto que no se encuentra diferencias en la actividad de esta enzima en plasma (Moser y col., 1998).

Además de las diferencias en la actividad de las isoenzimas del sistema microsomal CYP 450, se han reportado diferencias en las reacciones de conjugación de fase II. Se ha sugerido que la actividad de UDP-glucuronil transferasa y de sulfotransferasas es superior en hombres que en mujeres (Bierle y col., 1999; Anderson, 2002).

Utilizando S-ketoprofeno en ratas, Palylyk-Colwell y Jamali (2004) demostraron que la tasa de glucuronación por los microsomas hepáticos era superior en machos que en hembras, mientras que la situación inversa se presentaba en los microsomas renales.

En estudios desarrollados con microsomas hepáticos humanos, se demostró que las hembras presentan una mayor desarilación y desulfuración de clorpirifós que en machos; aunque debemos señalar que este estudio se realizó en microsomas obtenidos sólo de una muestra poblacional de 10 individuos de cada sexo (Tang y col., 2001). En microsomas hepáticos de ratas, donde se determinó que las isoformas CYP 1A1, CYP2B1, CYP3A1 y CYP3A2 participan del metabolismo del clorpirifós tanto en machos como en hembras, se comprobó que sólo el CYP1A1 presenta una mayor capacidad para activar al clorpirifós en hembras (Dalvi y col., 2004). Estos datos contradicen a lo reportado por Sulfatos (1991) y Ma y Chambers (1994), quienes encontraron que en ratas la actividad de desulfuración, es decir de activación mediada por CYP, era mayor en machos que en hembras.

I.3.3.4.- Excreción

La excreción de los fármacos se realiza principalmente por orina y bilis, siguiendo un proceso de orden uno. Es preciso consignar que el aclaramiento de aquellos fármacos que no son secretados activamente ni reabsorbidos en la luz tubular, depende únicamente de la tasa de filtración renal, la cuál esta condicionada por el peso corporal, entre otros factores. Es por ello, que las diferencias entre ambos sexos en la excreción renal de fármacos se deberían en realidad a diferencias en el peso de los individuos (Hermann y col 2003; Schuttler y Ihmsen, 2000; Sowinski y col., 1999).

Diferente es la situación de aquellos fármacos que necesitan ser secretados a la luz tubular para ser eliminados. En ratas se ha comprobado que el sexo influye en la farmacocinética del ácido aminohipúrico y de la furosemida, ya que estos compuestos en las hembras presentaron un menor aclaramiento y una semivida de eliminación superior que los machos (Cerrutti y col., 2002a; Cerrutti y col., 2002b).

Objetivos

II.- OBJETIVOS

La producción bovina en sus diferentes sistemas de explotación no ha quedado al margen de la revolución tecnológica que ha tenido lugar en los últimos años. Tal innovación incluye desde la elección del sistema de producción y el biotipo animal que mejor se adapte a cada necesidad, la suplementación de la alimentación, la adopción de técnicas de mejoramiento genético y la utilización de xenobióticos.

Este último aspecto adquiere día a día mayor importancia y requiere más atención, por su participación en la reducción de pérdidas por enfermedad, en el aumento de la productividad y fundamentalmente por su implicación en Salud Pública. Dentro de estos xenobióticos destaca la importancia de los antiparasitarios, debido a la fuerte repercusión higio-sanitaria de las enfermedades parasitarias, llegando su uso a representar alrededor del 20% de los compuestos usados en animales de producción en paralelo con los antimicrobianos.

Los antiparasitarios constituyen una herramienta fundamental en veterinaria, pero pueden originar importantes problemas de toxicidad tanto a nivel sanitario como medioambiental, por eso requieren un amplio conocimiento de su comportamiento en los individuos a los que se aplica.

Una forma de evaluar este comportamiento es conocer los efectos sobre sus dianas farmacológicas, que en el caso de los organofosforados objeto de nuestro estudio son las colinesterasas del parásito. Sin embargo, estos fármacos afectan también a las enzimas del hospedador, hecho que justifica la sintomatología colinérgica que se puede producir en el animal tratado. Por otro lado, la importancia de conocer la disposición cinética de un medicamento se ha corroborado por los frecuentes episodios que demostraron el riesgo clínico y por la emergencia de resistencias que supone el empleo empírico de fármacos, al trasladar no sólo las pautas de dosificación de medicina humana a la práctica veterinaria, sino incluso la extrapolación de pautas posológicas entre las distintas especies animales.

El organofosforado en que se ha centrado nuestro estudio es el clorpirifós, un compuesto ampliamente utilizado principalmente en control de las ectoparasitosis que afectan al ganado bovino, para las que se suele usar la aplicación tópica. Sin embargo, bajo nuestro conocimiento, no existe ningún trabajo publicado en el que se haya evaluado el comportamiento de este compuesto tanto sobre las dianas del hospedador, responsable de los efectos adversos que origina este compuesto, como en su cinética, implicada no sólo en la eficacia sino en los posibles resistencias, residuos y los efectos medio ambientales tras su administración *pour-on*.

Todos estos procesos se pueden ver afectados por diferentes estados fisiológicos; así, la constitución corporal y los procesos metabólicos son diferentes entre animales jóvenes y adultos, y entre machos y hembras, lo cual determina que la absorción, distribución y eliminación de los fármacos se modifique en función de la edad y el sexo de los mismos. Estos hechos pueden precisar un ajuste en la pauta posológica, que debe establecerse para realizar un uso racional de los medicamentos en base a estudios farmacocinéticos.

Además, el empleo de bioindicadores como la valoración de la actividad de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, que permiten evaluar como afecta la aplicación de este compuesto en la salud del animal, poseen una gran importancia debido a la toxicidad potencial que presentan los compuestos organofosforados. Estudios previos han demostrado la influencia de numerosos factores fisiológicos y ambientales sobre la actividad de los mismos.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es definir el comportamiento cinético descriptivo del clorpirifós tras su administración *pour-on* en ganado bovino y el efecto que origina sobre las enzimas bioindicadoras de exposición; abordando la influencia del desarrollo, el sexo del animal, la castración y la estación del año en la que se aplique el tratamiento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para lograr estos objetivos generales se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Describir la influencia de factores fisiológicos y ambientales en la actividad basal de la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa.
- Determinar si el desarrollo del animal, el sexo, la orquiectomía o la época del año en la que se aplique el tratamiento afectan la inhibición de las enzimas bioindicadoras de exposición, acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa, de bovinos tratados con clorpirifós por vía tópica.
- Caracterizar el comportamiento farmacocinético del clorpirifós tras su administración *pour-on*, en bovinos machos enteros de diferentes edades, en machos castrados y en hembras.
- Evaluar si existe una relación entre el comportamiento cinético observado y la respuesta enzimática estudiada en los diferentes estados fisiológicos evaluados, edad y sexo, o bien tras la castración.

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

- Los factores fisiológicos, como la edad y el sexo, y/o la orquiectomía pueden alterar el efecto inhibitorio del clorpirifós sobre los bioindicadores de exposición, las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasas, tras la administración *pour-on* en bovinos.
- El comportamiento farmacocinético del clorpirifós, tras su administración *pour-on* en bovinos, podría estar influenciado por la etapa evolutiva, el sexo del animal y/o la castración, haciendo necesario un ajuste de dosis para evitar la producción de efectos adversos por sobredosificación o la aparición de resistencias por subdosificación.
- La eficacia del clorpirifós tras su aplicación en piel podría alterarse dependiendo de la época del año en la que se aplique el tratamiento, bien por razones ambientales, cinéticas o dinámicas.

Materialles y métodos

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

III.1.- MATERIALES

III.1.1.- Material biológico

Para la realización de los ensayos se utilizaron 56 bovinos raza holstein de diferentes edades y sexos, con los cuales se conformaron 9 grupos experimentales (III.2.1.).

III.1.2.- Fármacos

Se utilizó un preparado comercial de clorpirifós formulado al 10% p/v, (Derramin 10[®]), provisto por el Laboratorio Brower (República Argentina). El estándar de clorpirifós (Lote: CCPTA-206), con una pureza de 95,9%, destinado a la validación del sistema del método de extracción y cuantificación en las muestras plasmáticas fue suministrado por Chemo Iberica (España).

III.2.- MÉTODOS

III.2.1.- Conformación de los grupos experimentales

Para la ejecución de los ensayos que permitieron evaluar las hipótesis planteadas en el capítulo anterior, se conformaron 9 grupos experimentales, cada uno de los cuales se integró por 6 individuos, excepto el grupo 9 que se conformó por 8 animales.

Grupo 1: Terneros machos de 1 día de vida ($35,5 \pm 5,7$ kg).

Grupo 2: Terneros machos de 7 días de vida ($39,3 \pm 4,3$ kg).

Grupo 3: Terneros machos de 28 días de vida ($42,5 \pm 4,7$ kg).

Grupo 4: Toros ($167,5 \pm 18,9$ kg).

Grupo 5: Novillos para tratamiento invernal ($163,7 \pm 10,7$ kg).

Grupo 6: Vaquillonas ($231,7 \pm 13,3$ kg).

Grupo 7: Novillos para tratamiento estival ($211,7 \pm 19,8$ kg).

Grupo 8: Terneros testigos, machos de 1 día de vida ($37,2 \pm 4,9$ kg).

Grupo 9: Adultos testigos ($187,4 \pm 15,4$ kg).

Para evaluar el efecto de la edad en el comportamiento farmacocinético del clorpirifós, así como en el porcentaje de inhibición de las enzimas colinesterasas que el mismo ocasionaba, se emplearon los animales de los grupos 1 al 4.

El efecto de la castración sobre la actividad enzimática luego de la exposición al clorpirifós y sobre la cinética plasmática de este compuesto se determinó utilizando los animales de los grupos 4 y 5.

A fin de evaluar otra de las hipótesis de trabajo, es decir si el sexo modificaba la disposición cinética de clorpirifós y el grado de inhibición enzimática, se emplearon los animales de los grupos 4 y 6.

Los individuos del grupo 7 se emplearon para determinar si la época del año en la que se aplicaba el tratamiento modificaba el porcentaje de inhibición de las enzimas colinesterasas comparándolo con los animales del grupo 5.

El grupo 8 fue utilizado como testigo a fin de constatar como evolucionaba la actividad enzimática en los terneros recién nacidos no expuestos al organofosforado, en tanto que los animales del grupo 9 fueron empleados como testigos de los individuos adultos.

III.2.2.- Acondicionamiento de los animales

Todos los ensayos se iniciaron en el mes de junio, a excepción del que se realizó con los novillos del grupo 7, que comenzó en el mes de diciembre, puesto que como se cito anteriormente, el motivo de su inclusión fue determinar la influencia de la época del año en la actividad colinesterásica luego de la administración de clorpirifós.

Los animales fueron trasladados a la Facultad de Ciencias Veterinarias dependiente de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina), 7 días previos al inicio del ensayo para su aclimatación a las condiciones del estudio, excepto en el

caso de los animales recién nacidos, los cuales se llevaron el día de su nacimiento, una vez que cumplieron el calostro.

Previo al inicio del ensayo, los animales fueron identificados con caravanas en la oreja derecha y se les practicó un estudio clínico y hematológico completo a los efectos de corroborar el perfecto estado de salud de los mismos. Además se procedió a depilar el cuello a fin de dejar visibles los cursos cervicales de las dos venas yugulares. Los individuos que conformaron los grupos de novillos fueron orquiectomizados a los dos meses de vida

III.2.3- Condiciones de mantenimiento de los animales

Los terneros de los grupos 1, 2, 3 y 8 fueron alojados en boxes individuales y alimentados dos veces al día con sustituto lácteo y agua. A partir del primer mes de vida se les incorporó a la dieta alimento balanceado y heno. Los animales adultos (grupos 4, 5, 6, 7 y 9) fueron alojados en corrales, desde los cuales tenían libre acceso a una pastura de alfalfa, suplementando con heno de moha y alimento balanceado. El agua fue provista *ad libitum*.

Todos los animales utilizados se mantuvieron libres de contacto con otros plaguicidas desde los 4 meses previos y durante el transcurso del ensayo, no recibiendo tampoco durante este período ninguna otra medicación que pudiera afectar el estudio. Los animales recién nacidos tampoco recibieron durante el transcurso del ensayo ninguna otra medicación que pudiera interferir con los objetivos planteados. Es importante señalar aquí que las madres de dichos terneros no fueron tratadas con productos organofosforados durante todo el período de gestación, puesto que se trataba de vacas lecheras en producción.

Las condiciones de alojamiento y alimentación descritas anteriormente se mantuvieron durante todo el tiempo en que se desarrollaron las experiencias y en todo momento los individuos fueron conducidos bajo normas de bienestar animal.

III.2.4- Aplicación del fármaco

El producto fue aplicado en los animales de los grupos 1 al 7 por vía tópica en forma *pour - on*, es decir, esparciéndolo sobre el lomo del animal desde la región de la cruz hasta la base de la cola. La dosis empleada en todos los casos fue de 10 mg/kg, por lo que se aplicó 1 mL de Derramin 10[®] cada 10 kg de peso vivo.

Los individuos de los grupos 8 y 9 se emplearon como testigos de la actividad colinesterasica, por lo que no fueron expuestos al plaguicida.

III.2.5- Toma de muestras biológicas:

Se tomaron muestras de sangre (3 mL) desde la vena yugular mediante jeringas heparinizadas a diferentes tiempos de extracción pre-establecidos. Para el estudio farmacocinético, se tomó una muestra previo a la aplicación del fármaco y luego a los siguientes tiempos post tratamiento: 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 6, 10, 24 y 36 horas y 2, 3, 4, 7 y 10 días. Estas muestras se transfirieron a tubos de vidrio para luego ser centrifugadas durante 10 min a 2000 g. El plasma obtenido se acondicionó en viales de plástico, siendo refrigerado a 5 °C durante 30 min y luego congelado a -20 °C hasta su análisis, que en todos los casos se realizó dentro de los 30 días posteriores a su extracción. No se tomaron muestras sanguíneas para la realización de análisis farmacocinético en el grupo de animales machos castrados que fueron tratados en verano.

Para la determinación de la actividad de la enzima colinesterasa, tanto plasmática como eritrocitaria, se extrajeron dos muestras sanguíneas (2 mL) previo a la administración con un intervalo de 24 horas entre cada una, y luego a los 2, 4, 7, 15, 21, 28, 50, 80 y 120 días posteriores a la misma. En el caso particular del grupo 8, terneros testigos de 1 día de vida, los tiempos de muestreos fueron modificados a fin de que los datos obtenidos puedan ser utilizados para comparar la evolución con los resultantes en los animales tratados de los grupos 1 al 3 a una misma edad cronológica. En este caso los tiempos de muestreo fueron los siguientes: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 21, 28, 30, 32, 35, 42, 49, 56, 63, 78, 87, 108, 120 y 148 días de vida. Las muestras se transfirieron a tubos de vidrio y se trasladaron en condiciones de temperatura controlada, entre 5 y 10 °C.

Una vez en el laboratorio estas muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 2.000 g a fin de separar el plasma de los eritrocitos. Tanto el plasma como la fracción de glóbulos rojos se mantuvieron bajo refrigeración a 5 °C hasta su análisis. La lectura espectrofotométrica para la determinación de la actividad colinesterásica se ejecutó en un plazo no mayor a las 12 h posteriores a la extracción de la muestra.

El registro de la toma de muestras se efectuó en planillas diseñadas a tal fin en las que constaban los datos de todos los animales (código de identificación, peso, edad y señas particulares), la dosis aplicada y los tiempos de extracción de las muestras.

Todos los animales tratados fueron examinados diariamente a fin de constatar si manifestaban signos clínicos compatibles con los de intoxicación por compuestos organofosforados.

III.2.6- Determinación de concentraciones plasmáticas de clorpirifós

Para la cuantificación de clorpirifós a partir de las muestras plasmáticas se realizó una extracción líquido/líquido y posterior análisis por cromatografía gaseosa, basándose en la metodología descrita por Makovi y McMahon (1994). Todos los reactivos fueron de calidad analítica (Sigma Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO).

III.2.6.1.- Extracción físico-química de los analitos.

Para el procesado de las muestras biológicas, a 1 mL de plasma ubicado en un tubo de centrifuga, se le adicionaron 2 mL de acetona y fueron homogeneizados durante 2 min. Después, se incorporaron 2 mL de agua destilada y la mezcla se agitó durante 2 min. A esta muestra se le adicionaron 2 mL de éter de petróleo, se agitó vigorosamente durante 5 min, se sometió a ultrasonido y, posteriormente se centrifugó a 2000 g durante 10 min. A continuación se extrajo la totalidad de la fase etérea superior y se trasladó a un tubo de vidrio de 10 mL. La fase acuosa se sometió a una nueva extracción mediante la incorporación de 2 mL de éter de petróleo, se agitó y se centrifugó para tomar el sobrenadante, el cual se añadió al extracto etéreo previamente reservado en el tubo de vidrio.

La fase extraída se deshidrató mediante filtración a través de cartuchos de extracción con sulfato sódico (15 mg). El extracto eluido fue llevado a sequedad a 60°C mediante evaporador bajo corriente de nitrógeno. La muestra se reconstituyó en isooctano (0,2 mL) para poder ser analizada cromatográficamente.

III.2.6.2.- Análisis cromatográfico

La cuantificación de clorpirifós se realizó por cromatografía gaseosa, utilizando un Cromatógrafo Varian 3400 con detector de captura de electrones, empleando una columna DB-608 (30 m×0.53 mm I.D., 0.83 µm) con flujo de nitrógeno de 20 mL/min, y temperaturas de 210°C para el inyector y de 330°C para el detector.

III.2.6.3.- Validación de la técnica cromatográfica

Todos los procedimientos correspondientes a la extracción y cuantificación del analito fueron validados previamente. Los parámetros determinados fueron especificidad, linealidad, exactitud, precisión, sensibilidad y recuperación del método.

III.2.6.3.1.- Especificidad del método

Para la determinación de la especificidad se tomaron muestras de plasma bovino de animales no tratados (muestras blanco), las cuales fueron sometidas al procedimiento de extracción descrito previamente, y luego de ser reconstituidas con isooctano fueron analizadas bajo las condiciones operativas citadas a fin de determinar la capacidad del método para evaluar la presencia del analito entre los demás componentes de la muestra biológica.

III.2.6.3.2.- Linealidad

Mediante el estudio de linealidad se determinó la proporcionalidad entre la concentración del principio activo y el área bajo la curva cromatográfica (ABC) obtenida luego del análisis. Primero se evaluó la linealidad del sistema cromatográfico y luego la linealidad del método, a fin de determinar como influye la matriz biológica en el proceso de extracción de la muestra.

III.2.6.3.2.1.- Linealidad del sistema cromatográfico

La relación entre concentración del analito y la respuesta del detector se determinó mediante la construcción de rectas de calibración con soluciones en isooctano con concentraciones conocidas del estándar puro de clorpirifós. Las rectas de calibración se realizaron por triplicado en un rango de concentraciones de 2,5 a 30 µg/L.

Los resultados fueron procesados mediante regresión lineal obteniéndose una ecuación que define la relación existente entre las distintas concentraciones ensayadas y la respuesta observada.

III.2.6.3.2.2.- Linealidad del método

Se realizaron las rectas de calibración desde muestras de plasma bovino enriquecidas con concentraciones conocidas de clorpirifós en un rango de 2,5 a 30 µg/L. Estas muestras se sometieron al procedimiento de extracción descrito y luego de ser reconstituidas con 0,2 mL de isooctano fueron analizadas bajo las condiciones operativas antes citadas.

Las rectas de calibración fueron realizadas por triplicado, determinándose la ecuación de la recta de regresión lineal con los puntos individuales sin promediar por el método de los mínimos cuadrados.

III.2.6.3.3.- Exactitud del método

La exactitud en la determinación de las concentraciones de los analitos se expresó como grado o porcentaje de concordancia entre el valor hallado experimentalmente y el valor aceptado como referencia. El rango establecido para su validación oscila entre 80 y 120% (EMEA, 1996).

Los estándares puros de clorpirifós en plasma se emplearon en un rango de concentraciones de entre 2,5 a 30 µg/L, realizándose el análisis por triplicado.

III.2.6.3.4.- Precisión del método

La precisión del método fue determinada para evaluar el grado de repetibilidad de las condiciones instrumentales y de preparación de las muestras, relacionando la dispersión de una serie de mediciones de una misma muestra sobre su valor promedio. Se estimaron los coeficientes de variación (CV) luego de analizar soluciones del estándar de clorpirifós en isooctano y en plasma con tres concentraciones (2,5; 15 y 30 $\mu\text{g/L}$), comparando tres muestras independientes para cada nivel de concentración durante tres días distintos. El rango establecido para su validación es $\pm 20\%$ (EMEA, 1996).

III.2.6.3.5.- Sensibilidad del método

El límite de detección se halló por integración del ruido de la línea de base al tiempo de retención del analito durante el análisis de muestras de plasma blanco de bovino durante días diferentes. A los valores promedios hallados se les sumo tres desviaciones estándar. En el caso de los límites de cuantificación se consideró la mínima cantidad de analito capaz de ser recuperada y cuantificada dentro de los rangos establecidos de exactitud y precisión (EMEA, 1996).

III.2.6.3.6.- Recuperación

La recuperación del método se expresó como la relación entre las áreas obtenidas tras el análisis de soluciones en plasma e isooctano enriquecidos con estándares puros de clorpirifós a idénticas concentraciones.

$$\text{Recuperación (\%)}: \frac{\text{ABC del analito recuperado} \times 100}{\text{ABC del analito en isooctano}}$$

Los estándares puros de clorpirifós en isooctano se emplearon a las concentraciones de 2,5 $\mu\text{g/L}$, 15 $\mu\text{g/L}$ y 30 $\mu\text{g/L}$. La recuperación de los analitos se realizó desde muestras de plasma bovino (1 mL) enriquecido con clorpirifós a fin de obtener las siguientes concentraciones, 2,5 $\mu\text{g/L}$, 15 $\mu\text{g/L}$, y 30 $\mu\text{g/L}$. La recuperabilidad del método se chequeó analizando todas las muestras por triplicado.

III.2.7.- Determinación de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa

La actividad enzimática fue valorada mediante la adaptación del método cinético de Ellman y colaboradores (1961). La base de esta técnica radica en la capacidad que posee la AChE de hidrolizar la acetiltiocolina, siendo el acetato y la tiocolina los productos de la hidrólisis. La tiocolina reacciona con el ácido 5,5-ditiobis-2 nitro benzoico (DTNB) formando un compuesto coloreado (2-nitro-5-mercaptopbenzoato), el cual puede determinarse por espectrofotometría a 405 nm, a una temperatura constante de 30 °C.

III.2.7.1.- Procedimiento de análisis

El paquete globular de eritrocitos resultante del centrifugado de la sangre se lavó 3 veces con solución fisiológica. De la parte media del centrifugado se tomaron 100 µL y se colocaron en otro tubo, al cual se agregaron 2,4 mL de agua destilada a fin de producir la hemólisis de los hematíes.

En la cubeta del espectrofotómetro (Metrolab 1600 Plus) que contenía 3 mL de la solución tampón fosfato (52 mmol/L, pH 7,7) y el cromógeno DTNB (0,25 mmol/L) se incorporaron 20 µL del hemolisado de la muestra; y se incubaron durante 3 minutos a 30 °C. Luego se agregaron 100 µL de la solución de yoduro de acetiltiocolina (156 mmol/L) (Sigma Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO).

Se determinó la absorbancia inicial de la solución, y luego cada 30 segundos durante 2 minutos, a 405 nm. Posteriormente se determinó la diferencia promedio de absorbancia a cada tiempo ($\Delta A/30$ seg) restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Para el cálculo de la actividad de la acetilcolinesterasa se empleó la siguiente fórmula, expresándose el resultado en UI/L ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$):

$$\text{UI/L} = \frac{\Delta \text{Abs}/\text{min} \times 10^6 \times \text{vol. final del ensayo (L)} \times \text{factor de dilución.}}{\epsilon \times \text{paso óptico(cm)} \times \text{vol. de muestra (L)}}$$

donde ϵ = coeficiente de extinción molar para el DTNB a 405 nm = $13.600 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

III.2.7.2.- Validación del método

III.2.7.2.1.- Linealidad

Para demostrar la linealidad del método se utilizó una muestra plasmática que presentó alta actividad de AChE (17.346 UI/L). Este valor surgió de promediar la actividad resultante de haber analizado seis veces una misma muestra de plasma bovino. A partir de esta muestra se realizaron cuatro diluciones empleando solución fisiológica a fin de obtener cinco soluciones con actividades comprendidas entre el 6,25 y 100%. El análisis se realizó tres veces para cada dilución.

III.2.7.2.2.- Precisión del método:

A partir de la solución estándar con actividad alta (17.346 UI/L), se prepararon soluciones con actividad media (50%) y baja (6,25%), realizando seis repeticiones bajo las mismas condiciones de ensayo. Se determinó el coeficiente de variación (CV).

III.2.8.- Determinación de la actividad de la enzima butirilcolinesterasa

Al igual que en el caso anterior, la determinación de la actividad enzimática se realizó en base al método cinético de Ellman y colaboradores (1961) empleando un kit comercial (Colinesterasa, Laboratorio Wiener®) que utiliza yoduro de butiriltiocolina como sustrato enzimático.

III.2.8.1.- Procedimiento de análisis

En la cubeta del espectrofotómetro mantenida a 30 °C, se incubaron durante 2 min, 3 mL de la solución de buffer fosfato (50 mmol/L, pH 7,7), el yoduro de butirilcolina (7 mmol/L) y el cromógeno DTNB (0,25 mmol/L). A continuación se adicionaron 20 µL de la muestra de plasma y se determinó la absorbancia a 405 nm cada 30 seg durante 2 min para así calcular los ΔA .

La fórmula utilizada para determinar la actividad de la butirilcolinesterasa, expresándola en UI/L ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$), fue la siguiente:

$$UI/L = \frac{\Delta A/\text{min} \times 10^6 \times \text{volumen final del ensayo (L)}}{\epsilon (\text{L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times \text{paso óptico (cm)} \times \text{volumen de muestra (L)}}$$

donde ϵ es el coeficiente de extinción molar para el DTNB a 405 nm ($13.600 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

III.2.8.2- Validación del método

III.2.8.2.1- Linealidad

Para demostrar la linealidad del método se utilizó una muestra plasmática con alta actividad de BChE (783 UI/L), valor que surge de promediar los registros de actividad resultantes de haber analizado seis veces una misma muestra de plasma bovino. A partir de esta muestra se realizaron cuatro diluciones empleando solución fisiológica a fin de obtener cinco soluciones con actividades comprendidas entre el 12,5 y 100%. El análisis de cada dilución se realizó por triplicado.

III.2.8.2.2- Precisión

Se determinó la repetibilidad del método; para ello se utilizaron muestras con actividad alta (100%), media (50%) y baja (12,5%) preparadas a partir de la solución estándar (783 UI/L). Las muestras se analizaron por triplicado, bajo las mismas condiciones de ensayo durante 3 días consecutivos. Con éstos datos se hizo un análisis estadístico básico y se determinó el coeficiente de variación .

III.2.9- Tratamiento Farmacocinético

A partir de las concentraciones plasmáticas de clorpirifós a los diferentes tiempos de muestreo para cada individuo, se construyeron gráficos en los que cuales se puede evidenciar la evolución del fármaco en plasma en función del tiempo.

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon por metodología no compartimental mediante el programa de tratamiento farmacocinético PCnonlin V 4.0. (Statistical Consultants Inc. Lexington, USA). Los parámetros determinados fueron área bajo la curva (*AUC*), área bajo un momento de la curva (*AUMC*), tiempo medio de residencia (*MRT*), máxima concentración plasmática alcanzada (C_{max}) y tiempo en el que se registró dicha concentración (t_{max}). Tanto el *AUC* como el *AUMC* fueron

calculados desde el tiempo cero (t_0) hasta el tiempo de la última concentración medida (t_n) mediante el método trapezoidal, empleando las fórmulas siguientes:

$$AUC_{0-t_{(last)}} = \sum_{i=1}^n \frac{C_{p(n)} + C_{p(n+1)}}{2} (t_{(n+1)} - t_{(n)})$$

$$AUMC_{0-t_{(last)}} = \sum_{i=1}^n \frac{C_{p(n)} + C_{p(n+1)}}{2} (t_{(n+1)} - t_{(n)}) t_{n+1}$$

El *MRT* se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

Los parámetros C_{max} y t_{max} fueron los valores observados a partir de la curva de evolución de las concentraciones plasmáticas en función del tiempo para cada individuo.

Los valores de las concentraciones plasmáticas obtenidos de cada animal fueron procesados y ajustados de forma individual, para luego calcular la media de los parámetros farmacocinéticos entre los individuos que conformaban cada grupo.

III.2.10- Tratamiento Estadístico

Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa de tratamiento estadístico SPSS® 12.0 (SPSS Inc. Chicago, USA). Los resultados obtenidos se sometieron a un estudio estadístico descriptivo y se expresaron como media aritmética, corregida por una medida de dispersión, el desvío estándar, y en algunos casos además, se presenta la mediana y el rango.

También se han utilizado los diagramas de cajas, donde pueden evidenciarse la mediana, el primer y tercer cuartil, así como los valores mínimos y máximos de la variable.

Se determinó el tipo de distribución de los valores de las variables mediante el test de Shapiro-Wilks, específico para muestras menores de 50 datos.

Se realizó regresión lineal, mediante mínimos cuadrados, para poder predecir los valores de una variable dependiente en función de una variable independiente, comprobando la aleatoriedad, la linealidad y la homogeneidad de varianzas. La medida de asociación para la variable cuantitativa se valoró mediante el coeficiente de correlación presentando su valor al cuadrado y su nivel de significación. La bondad del ajuste se evaluó en función a la proximidad de este coeficiente a la unidad.

Se evaluó el grado de relación entre dos variables (dinámica vs. cinética) utilizando el test no paramétrico de correlación de Spearman. Concretamente se aplicó para determinar si existía correlación entre el efecto inhibitorio máximo en la actividad enzimática y los parámetros farmacocinéticos (C_{\max} , t_{\max} , AUC y MRT)

La comparación entre los grupos se efectuó mediante test paramétricos o no paramétricos dependiendo de los resultados obtenidos en el test de normalidad. Las pruebas paramétricas utilizadas fueron el test de T de Student para dos muestras relacionadas o independientes, análisis de la varianza, con un análisis post-hoc mediante los test de Dunnett o Bonferoni, o bien mediante un Modelo Lineal General para medidas repetidas. Las pruebas no paramétricas empleadas fueron el test de Wilcoxon para dos muestras relacionadas, el test de Mann-Whitney para dos muestras independientes, el test de Friedman, para más de dos muestras relacionadas y el test de Kruskal-Wallis para más de dos muestras independientes, seguida por el test de Dunn. En todos los casos, se consideró como significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

IV.- RESULTADOS

IV.1.- Validación del método cromatográfico

IV.1.1.- Especificidad

Luego del análisis cromatográfico de muestras de plasma bovino de animales no tratados que fueron sometidas al procedimiento de extracción descrito previamente, no se observaron interferencias de sustancias endógenas congruentes con el tiempo de retención del analito ($4,96 \pm 0,28$ min.). En la Figura IV.1 se presentan cromatogramas con muestras de clorpirifós en isooctano (A) y plasma (B).

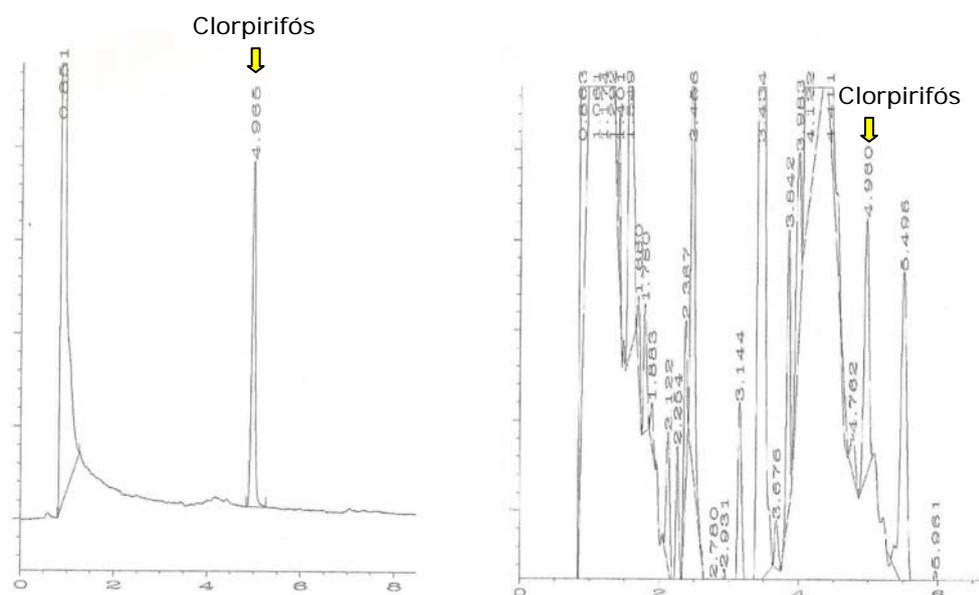


Figura IV.1. Cromatogramas en donde se puede apreciar la separación y el tiempo de retención de clorpirifós en solución en isooctano (A) y en plasma (B)

IV.1.2.- Linealidad

IV.1.2.1.- Linealidad del sistema cromatográfico

La relación entre las distintas concentraciones de clorpirifós disuelto en isooctano (CC_{iso}) y el área bajo la curva cromatográfica (ABC), que se muestra en la Figura IV.2, presentó un comportamiento lineal en el rango de concentración de 2,5 a 30 $\mu\text{g/L}$ ($r^2 = 0,992$; $p < 0,001$). La ecuación de la recta obtenida mediante regresión lineal por mínimos cuadrados fue la siguiente:

$$ABC = 333766 \cdot CC_{iso} + 22804$$

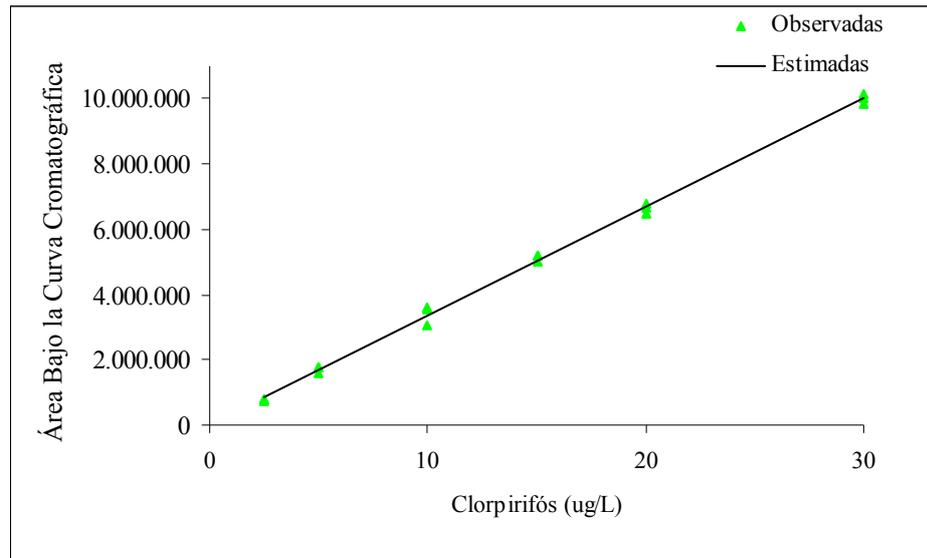


Figura IV.2. Linealidad del sistema cromatográfico. Recta de calibración obtenida mediante regresión lineal de la relación entre la concentración de clorpirifós en isooctano (2,5 - 30 $\mu\text{g/L}$) y las áreas bajo la curva cromatográfica.

IV.1.2.2.- Linealidad del método

En la Figura IV.3. se muestra la recta obtenida al relacionar los valores de área bajo la curva cromatográfica obtenidos para las diferentes concentraciones de clorpirifós en plasma comprendidas entre 2,5 y 30 $\mu\text{g/L}$.

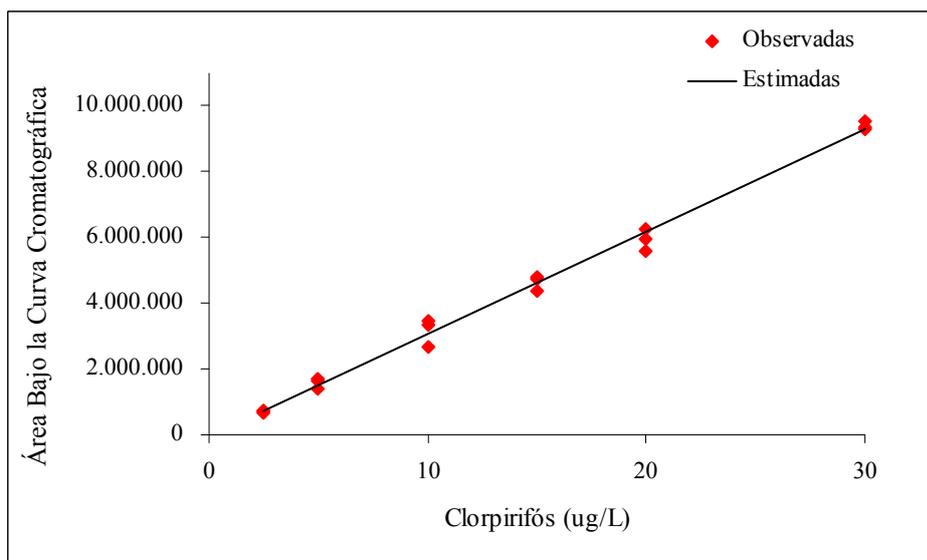


Figura IV.3. Linealidad del método. Recta de calibración obtenida mediante regresión lineal de la relación entre la concentración de clorpirifós en plasma (2,5 - 30 $\mu\text{g/L}$) y las áreas bajo la curva cromatográfica.

El análisis estadístico indicó que se ha establecido una relación lineal entre el clorpirifós disuelto en plasma (CC_{pl}) y el área bajo la curva cromatográfica ($r^2 = 0,994$; $p < 0,0001$), siendo la ecuación de la recta obtenida para las muestras plasmáticas ensayadas en nuestro estudio:

$$ABC = 310353 \cdot CC_{pl} + 30893$$

IV.1.3.- Exactitud

El porcentaje de concordancia entre el valor hallado experimentalmente y el valor aceptado como de referencia osciló entre el 85 y el 115%. La exactitud para cada uno de los puntos de la recta de calibración se presenta en la Tabla IV.1. El análisis de la varianza indicó que no existían diferencias en la exactitud entre cada una de las concentraciones evaluadas.

Tabla IV.1. Área bajo la curva cromatográfica observada y estimada empleadas para el cálculo de la exactitud (%) del método para determinar clorpirifós en plasma.

Concentración $\mu\text{g/L}$	ABC Individual	Exactitud %
2,5	695.862	86,25
	721.848	89,47
	704.996	87,38
5	1.419.166	89,66
	1.689.775	106,76
	1.628.511	102,89
10	2.663.841	84,98
	3.328.090	106,17
	3.448.391	110,01
15	4.374.442	93,34
	4.826.992	103,00
	4.762.582	101,63
20	5.584.292	89,52
	5.982.560	95,90
	6.252.269	100,23
30	9.281.504	99,36
	9.362.113	100,22
	9.529.094	102,00

IV.1.4.- Precisión

La precisión del método fue determinada para evaluar el grado de repetibilidad de las condiciones instrumentales y de preparación de las muestras. El coeficiente de variación intradía para las muestras preparadas en isooctano fue $< 3,76$ ($2,08 \pm 0,94$), en tanto que el coeficiente de variación interdía fue $< 4,30$ ($2,88 \pm 1,25$). Por su parte, el coeficiente de variación intradía para las muestras preparadas en plasma fue $< 5,26$ ($2,43 \pm 1,24$) y el coeficiente de variación interdía fue $< 3,73$ ($3,08 \pm 0,94$). Tablas IV.2 y IV.3.

Tabla IV.2. Repetibilidad del sistema cromatográfico. Se presentan los coeficientes de variación intradía e interdía del análisis de muestras de clorpirifós en isooctano.

Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Días	ABC	Intradía			Interdía		
			Media	D.E.	CV	Media	D.E.	CV
2,5	1	796.247	778.470	16.749	2,15	764.318	32.859	4,30
		776.181						
		762.983						
	2	812.900	784.466	24.687	3,15			
		768.496						
		772.002						
3	730.441	730.017	27.477	3,76				
	702.331							
	757.281							
15	1	4.993.656	5.135.227	123.225	2,40	5.072.288	122.422	2,41
		5.218.370						
		5.193.656						
	2	4.890.946	4.945.600	78.926	1,60			
		4.909.768						
		5.036.087						
3	5.153.952	5.136.037	49.216	0,96				
	5.173.787							
	5.080.372							
30	1	9.852.977	10.005.253	141.308	1,41	9.989.776	192.797	1,93
		10.132.157						
		10.030.626						
	2	10.241.269	10.131.518	106.789	1,05			
		10.027.959						
		10.125.327						
3	9.921.489	9.832.557	223.023	2,27				
	9.997.395							
	9.578.788							
2,08±0,94						2,88±1,25		

Tabla IV.3. Repetibilidad del método de análisis. Se presentan los coeficientes de variación intradía e interdía del análisis de muestras de clorpirifós en plasma.

Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Día	ABC	Intradía			Interdía		
			Media	D.E.	CV	Media	D.E.	CV
2,5	1	695.862	707.568	13.182	1,86	703.905	26.250	3,73
		721.848						
		704.996						
	2	729.984						
		738.524						
		713.330						
3	655.936	676.868	21.959	3,24				
	674.940							
	699.727							
15	1	4.374.442	4.654.672	244.813	5,26			
		4.826.992						
		4.762.582						
	2	4.421.415	4.527.014	99.139	2,19			
		4.541.536						
		4.618.091						
3	4.514.862	4.653.105	135.532	2,91				
	4.785.753							
	4.658.701							
30	1	9.281.504	9.390.904	126.281	1,34			
		9.362.113						
		9.529.094						
	2	9.186.418	9.323.353	173.020	1,86			
		9.265.834						
		9.517.807						
3	9.028.555	9.090.070	128.344	1,41				
	9.237.593							
	9.004.061							
					2,43\pm1,24	3,08\pm0,94		

IV.1.5.- Sensibilidad

La sensibilidad del método se estableció determinando los límites de detección y cuantificación de los analitos. El límite de detección, o sea la menor concentración de analito en una muestra que pudo ser detectada, pero no necesariamente cuantificada fue de 0,6 $\mu\text{g/L}$; en tanto que el límite de cuantificación o sea, la menor cantidad de analito de una muestra que pudo ser determinada con aceptable precisión y exactitud, siguiendo la normativa de la EMEA, bajo las condiciones experimentales fue de 2,5 $\mu\text{g/L}$.

IV.1.6.- Recuperación

El valor promedio de recuperación de clorpirifós en plasma bovino fue de $91,8 \pm 2,6\%$. La cantidad de analito recuperada y el porcentaje de recuperación en cada uno de los puntos de la recta de calibración se presentan en la Tabla IV.4

Tabla IV.4. Cantidad de clorpirifós recuperado ($\mu\text{g/L}$) y porcentaje de recuperación (%) del método

Concentración teórica ($\mu\text{g/L}$)	Concentración hallada ($\mu\text{g/L}$)	% Recuperado	
		Individual	Media \pm DE
2,5	2,19	87,4	$90,93 \pm 3,1$
	2,33	93,0	
	2,31	92,4	
15	13,14	87,6	$90,60 \pm 2,63$
	13,88	92,5	
	13,76	91,7	
30	28,26	94,2	$93,87 \pm 1,33$
	27,72	92,4	
	28,50	95,0	

Por medio de análisis de la varianza se constató que no existían diferencias en el porcentaje promedio de recuperación entre cada una de las concentraciones evaluadas.

Finalmente, debemos indicar que los resultados que hemos presentado a lo largo de este apartado IV.1. se encuentran dentro de los límites establecidos en la normativa EMEA (1996) para la validación del método.

IV.2.- Validación de la determinación de la actividad de acetilcolinesterasa

IV.2.1- Linealidad

Se demostró la linealidad del método (Figura IV.4) analizando cinco diluciones de una muestra de plasma bovino con alta actividad de AChE (17.346 UI/L), relacionando el porcentaje de actividad esperado (%_{AEE}) con la actividad enzimática obtenida (AEO). El coeficiente de correlación al cuadrado fue 0,9966 ($p < 0,0001$) y la ecuación de la recta fue la siguiente.

$$AEO = 174,71 \cdot \%_{(AEE)} + 53,25$$

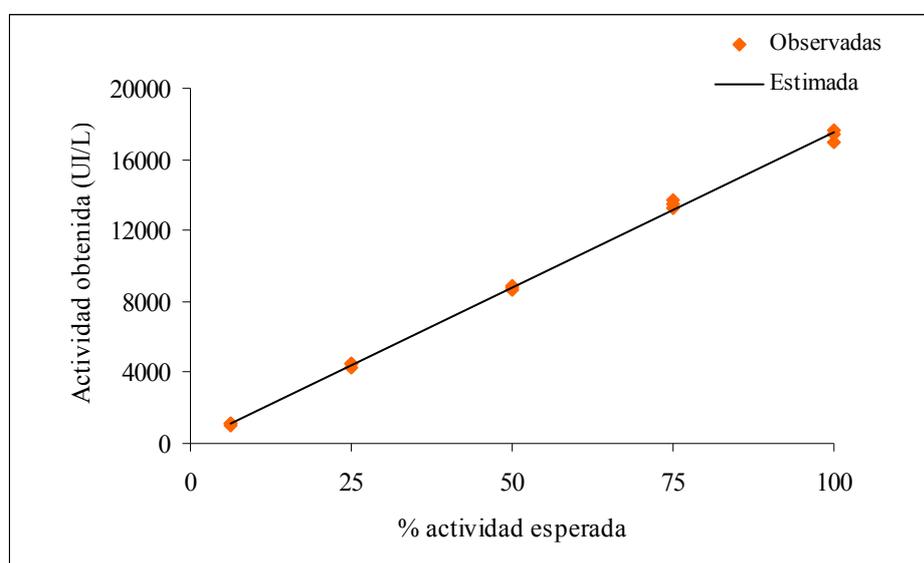


Figura IV.4. Recta de calibración calculada mediante regresión lineal relacionando el porcentaje de actividad esperado y la actividad enzimática obtenida para la enzima AChE a partir de diluciones de plasma bovino.

IV.2.2- Precisión

Se evaluó el grado de repetibilidad que presentó el método. El coeficiente de variación promedio intradía fue $< 3,68$ ($2,70 \pm 0,76$). Dado a la imposibilidad de congelar las muestras de eritrocitos, no se determinó la variación interdía. En la Tabla IV.5 se presentan los valores obtenidos en el estudio de repetibilidad intradía realizado con seis repeticiones de tres diluciones efectuadas bajo las mismas condiciones de ensayo y en el mismo día.

Tabla IV.5. Repetibilidad del método. Coeficientes de variación intradía de la técnica de análisis de actividad de acetilcolinesterasa eritrocitaria.

Dilución (% actividad)	Actividad UI/L	Variación Intradía		
		Media UI/L	D.E. UI/L	CV %
6,25	1.100	1.092	40,15	3,68
	1.018			
	1.094			
	1.084			
	1.125			
	1.129			
50	8.925	8.739	180,17	2,06
	8.741			
	8.612			
	8.547			
	8.624			
	8.987			
100	16.942	17.382	408,48	2,35
	17.585			
	17.371			
	17.926			
	17.595			
	16.874			
				2,70 ± 0,76

IV.3.- Validación de la determinación de la actividad de butirilcolinesterasa

IV.3.1- Linealidad

Se demostró la linealidad analizando cinco diluciones de una muestra de plasma bovino con alta actividad de BChE (783 UI/L). El análisis estadístico indicó que existía relación lineal entre las variables analizadas ($r^2 = 0,9998$; ($p < 0,0001$)). En la Figura IV.5 se muestra la recta obtenida mediante regresión lineal, siendo su ecuación la siguiente:

$$AEO = 7,79 \cdot \%_{(AEE)} - 0,23$$

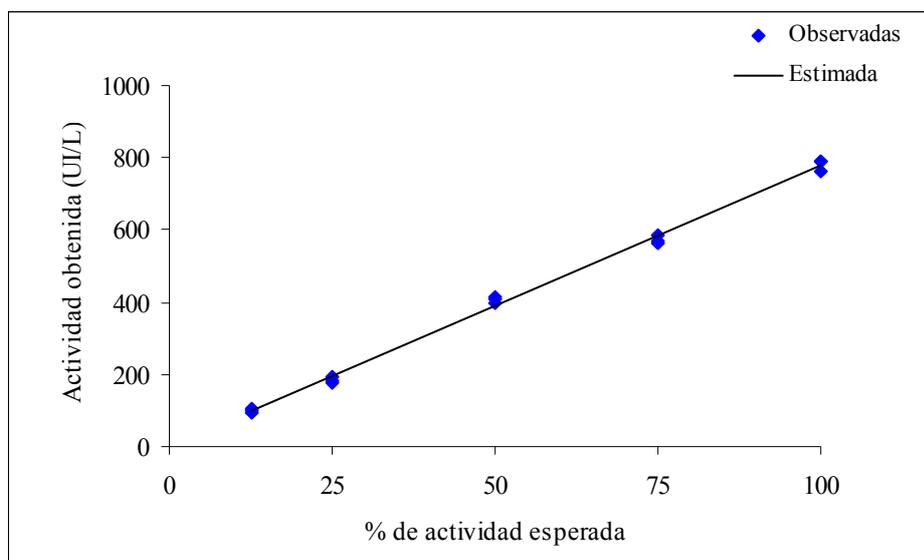


Figura IV.5. Recta de calibración calculada mediante regresión lineal, relacionando el porcentaje de actividad esperado y la actividad enzimática obtenida para la enzima BChE a partir de diluciones de plasma bovino.

IV.3.2- Precisión

Se evaluó la repetibilidad del método a partir de diluciones de una muestra con alta actividad de la enzima butirilcolinesterasa. Las muestras se analizaron por triplicado, bajo las mismas condiciones de ensayo durante 3 días consecutivos, determinándose el coeficiente de variación promedio intradía, el cual fue $< 6,12$ ($3,23 \pm 1,68$) y el interdía, el cual fue $< 5,27$ ($3,46 \pm 1,69$). Los datos obtenidos para el estudio de precisión se muestran en la Tabla IV.6.

Tabla IV.6. Repetibilidad del método. Coeficientes de variación intradía e interdía de la técnica de análisis de actividad de butirilcolinesterasa plasmática.

Dilución (% actividad)	Día	Actividad UI/L	Intradía			Interdía		
			Media UI/L	D.E. UI/L	CV %	Media UI/L	D.E. UI/L	CV %
12,5	Día 1	98	98	6,00	6,12	97	5,09	5,27
		104						
		92						
	Día 2	90	93	4,16	4,46			
		98						
		92						
	Día 3	104	99	5,03	5,10			
		98						
		94						
50	Día 1	398	407	8,50	2,09	398	12,77	3,21
		407						
		415						
	Día 2	390	399	8,32	2,08			
		406						
		402						
	Día 3	370	387	15,01	3,87			
		396						
		396						
100	Día 1	763	781	15,71	2,01	783	6,76	0,86
		788						
		792						
	Día 2	754	772	15,50	2,01			
		783						
		778						
	Día 3	802	791	11,00	1,39			
		791						
		780						
					3,23±1,68	3,46±1,69		

IV.4.- Actividad enzimática basal.

IV.4.1.- Participación de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en la actividad colinesterásica total en sangre.

La actividad basal de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en sangre de las distintas categorías de animales utilizadas en el ensayo puede observarse en la Figura IV.6; en tanto que en la Figura IV.7, se muestra el porcentaje de contribución de AChE y BChE en la actividad colinesterásica total en sangre. De la observación de ambas figuras se desprende que la principal actividad se manifiesta a nivel eritrocitario.

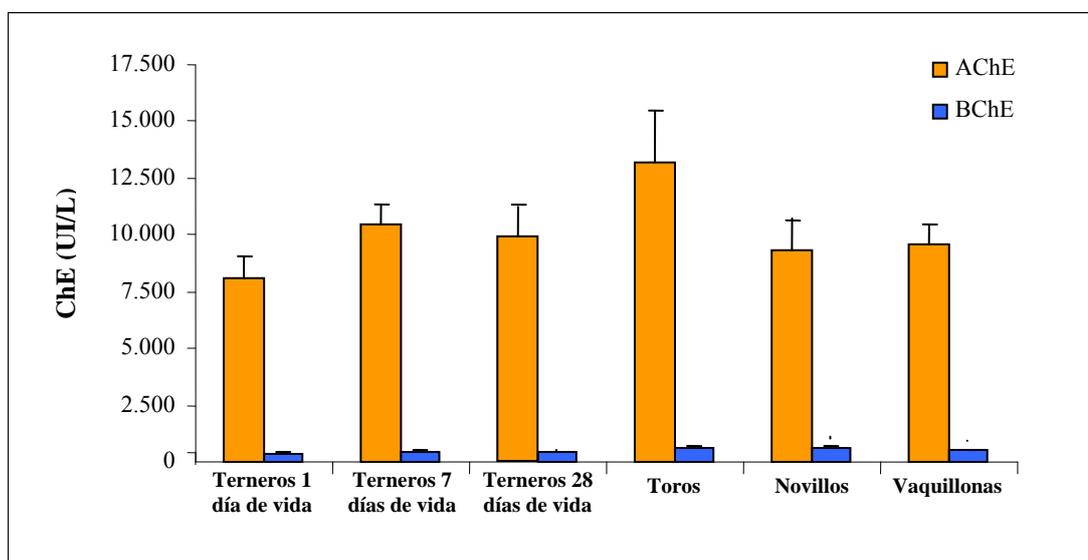


Figura IV.6. Valores de actividad colinesterásica basal (UI/L) de AChE y BChE en bovinos de diferentes edades y sexo.

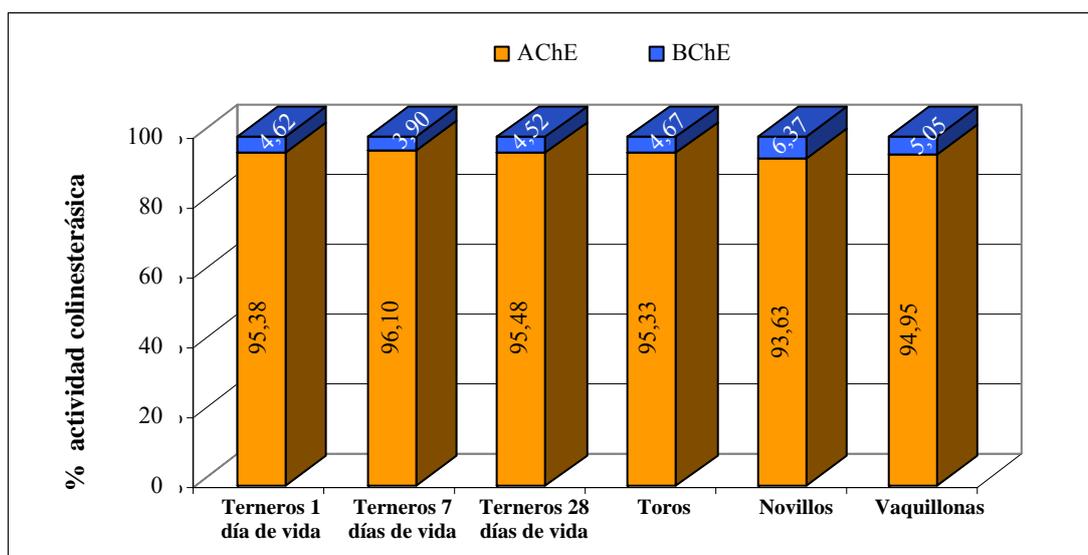


Figura IV.7. Porcentaje de contribución de AChE y BChE en la actividad colinesterásica total en sangre de bovinos de diferentes edades y sexo.

IV.4.2.- Variabilidad interindividual en la actividad colinesterásica.

Al evaluar las variaciones registradas dentro de cada grupo objeto de estudio, observamos que los valores basales de ambas enzimas presentaron coeficientes de variación que fluctuaron, para la AChE entre el 8,81% en novillos y el 17,20% en los toros, y para la BChE entre el 6,30% en vaquillonas y el 18,41% en terneros de 1 día de vida. Estos valores pueden observarse en la Tabla IV.7.

Tabla IV.7. Variabilidad interindividual en la actividad de las enzimas AChE y BChE.

	AChE (UI/L)		BChE (UI/L)	
	Media \pm DS	CV	Media \pm DS	CV
Terneros 1 día de vida	8.077 \pm 1.009	12,50	390 \pm 71	18,41
Terneros 7 días de vida	10.498 \pm 843	8,04	426 \pm 61	14,39
Terneros 28 días de vida	9.916 \pm 1.386	13,97	463 \pm 32	6,96
Toros	13.220 \pm 2.274	17,20	641 \pm 88	13,73
Vaquillonas	9.338 \pm 1.331	14,26	624 \pm 39	6,29
Novillos	9.597 \pm 845	8,81	505 \pm 49	9,87

IV.4.3.- Variabilidad intraindividual temporal en la actividad colinesterásica.

En las Figuras IV.8 y IV.9 se muestra la evolución temporal de la actividad enzimática de AChE y BChE durante el período de estudio, en el grupo de animales adultos que no fueron expuestos al plaguicida. Este grupo fue incluido en el diseño para evaluar posibles influencias ambientales en la actividad enzimática.

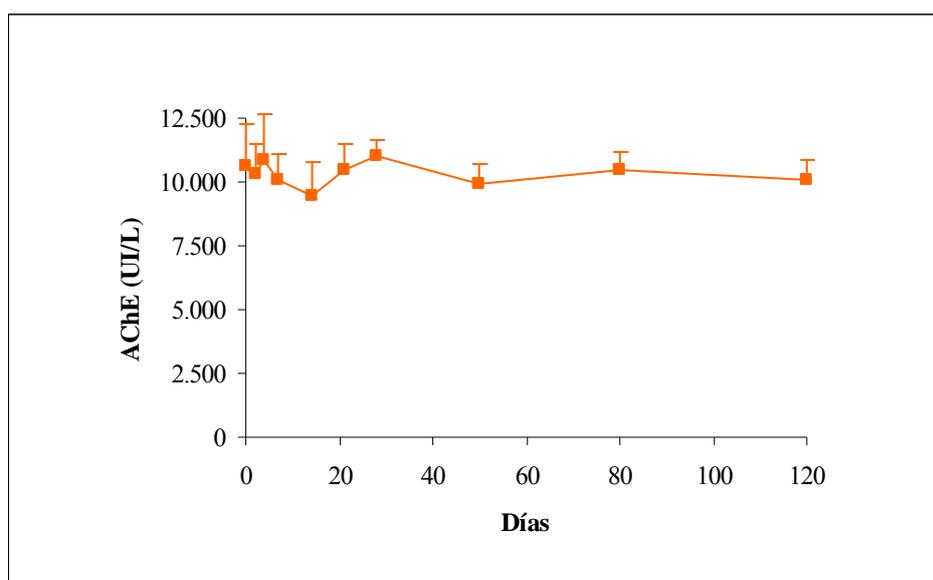


Figura IV.8. Evolución temporal de la actividad enzimática de AChE en animales adultos testigos no expuestos al plaguicida.

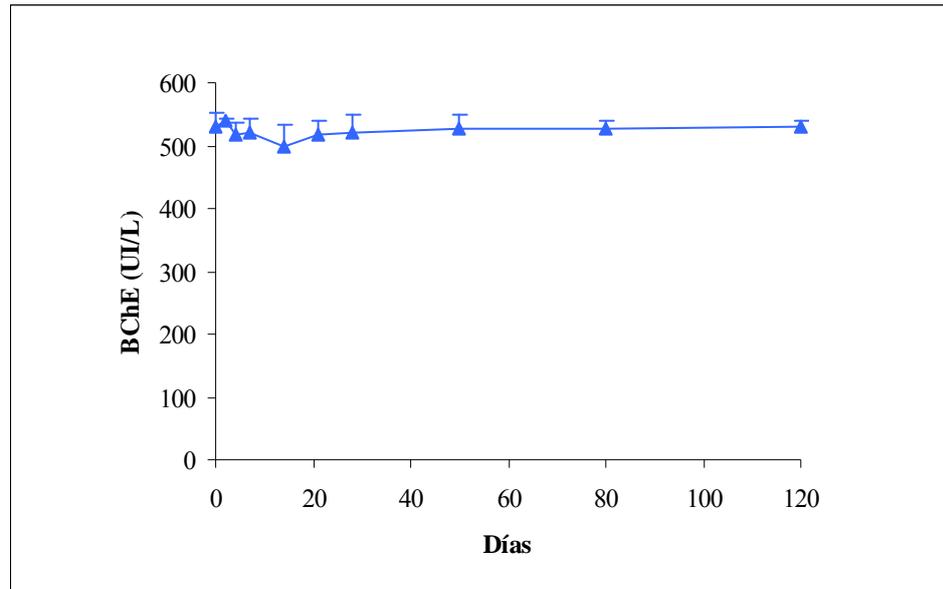


Figura IV.9. Evolución temporal de la actividad enzimática de BChE en animales adultos testigos no expuestos al plaguicida.

En este estudio no se han presentado variaciones significativas a lo largo de todo el período de muestreo tanto en la actividad de la BChE como de la AChE, tal como lo refleja el análisis estadístico ($p > 0,05$). En el caso de butirilcolinesterasa el CV fue $< 5\%$ ($3,16 \pm 1,32$) y para la acetilcolinesterasa $< 8\%$ ($7,24 \pm 0,91$).

IV.5.- Influencia de la edad en la actividad colinesterásica

La evolución de la actividad de las enzimas en animales recién nacidos, no expuestos al plaguicida, se puede apreciar en las Figuras IV.10 y IV.11. Este grupo se incluyó para evaluar si la edad modifica la actividad de las enzimas colinesterasas de los bovinos. En este caso se tomaron muestras adicionales a fin de obtener datos que nos permitan comparar los valores de actividad colinesterásica en los animales no tratados con los que presentaban los animales tratados a una misma edad cronológica.

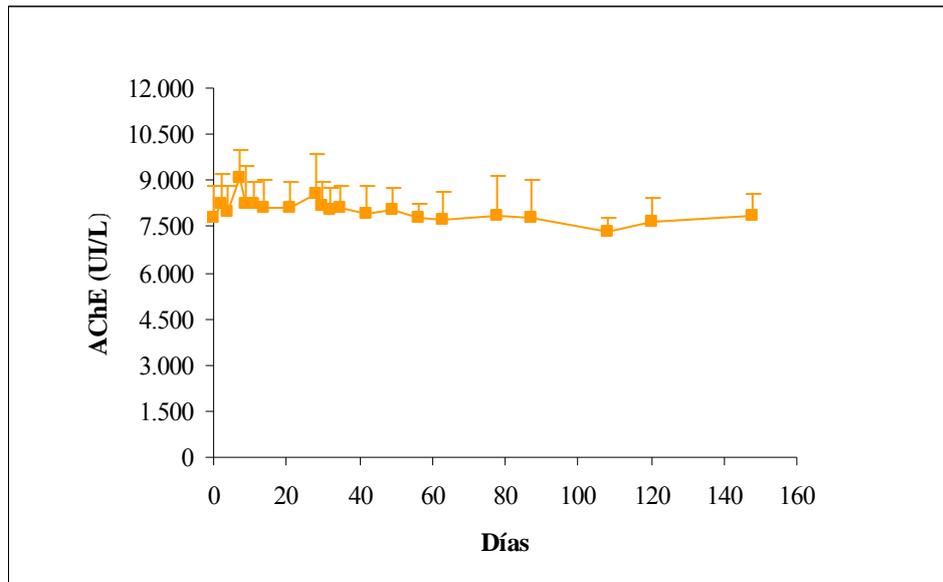


Figura IV.10. Evolución temporal de la actividad enzimática de AChE en animales recién nacidos no expuestos a inhibidores de la colinesterasa.

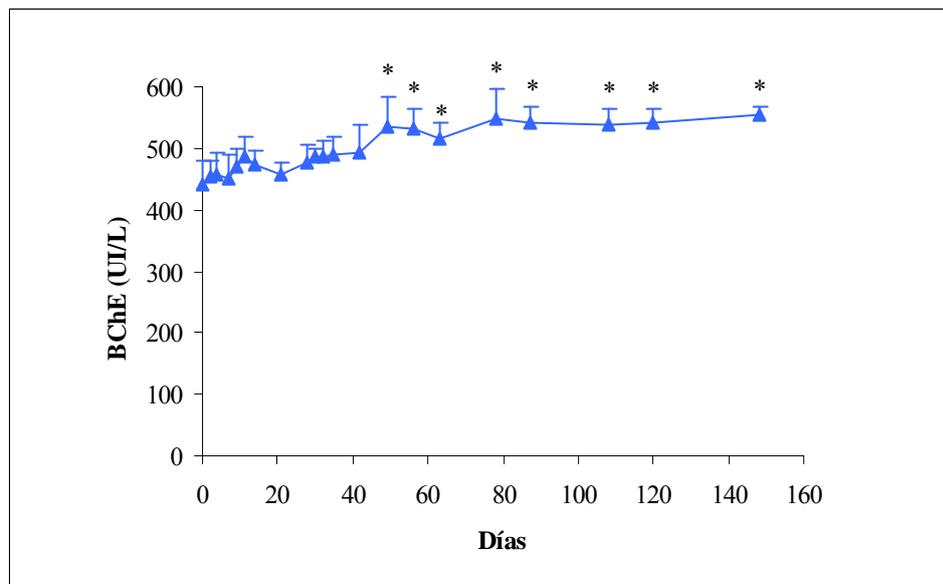


Figura IV.11. Evolución temporal de la actividad enzimática de BChE en animales recién nacidos no expuestos a inhibidores de la colinesterasa. (*): $p < 0,05$ Diferencia con la actividad colinesterásica inicial.

El análisis indica que no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de acetilcolinesterasa durante el tiempo en que los animales fueron muestreados ($p > 0,05$). El coeficiente de variación a lo largo del estudio fue menor al 12% ($10,06 \pm 1,99$). Cuando se analizaron los valores de actividad de butirilcolinesterasa en función del tiempo se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre lo hallado al día 1 de vida y el día 49 en adelante ($p < 0,05$), con un CV menor al 11% ($7,75 \pm 1,81$).

Cuando se comparó la actividad de AChE y de BChE en los terneros testigos a los días 1, 7 y 28 con la que presentaban a esa misma edad los terneros del grupo tratados previo a la aplicación de clorpirifós, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). En tanto que cuando se comparó la actividad de las dos enzimas en los terneros testigos a los días antes indicados con que registraban los toros adultos, puede observarse que tanto para AChE como para BChE se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$) entre ambos grupos (Figuras IV.12 y IV.13).

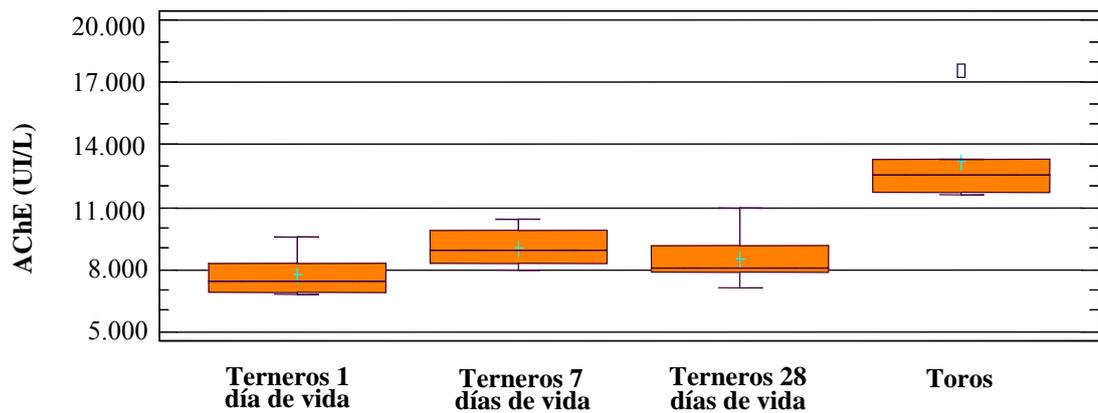


Figura IV.12. Diagrama de cajas representando la actividad basal de la AChE en bovinos machos enteros de diferentes edades.

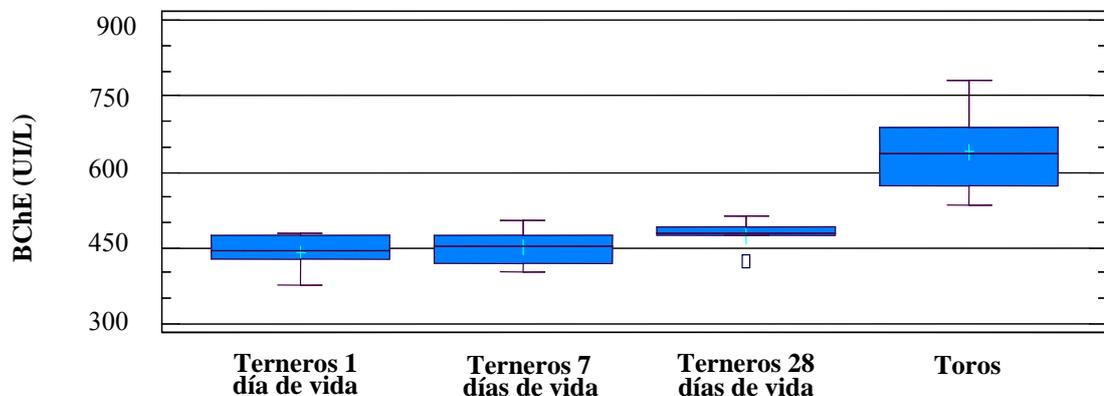


Figura IV.13 Diagrama de cajas representando la actividad basal de la BChE en bovinos machos enteros de diferentes edades.

IV.6.- Influencia del sexo en la actividad colinesterásica

Al evaluar el efecto del sexo en la actividad basal de acetilcolinesterasa encontramos diferencias entre vaquillonas y toros ($p < 0,005$), presentando este último grupo una mayor actividad enzimática (Figura IV.14).

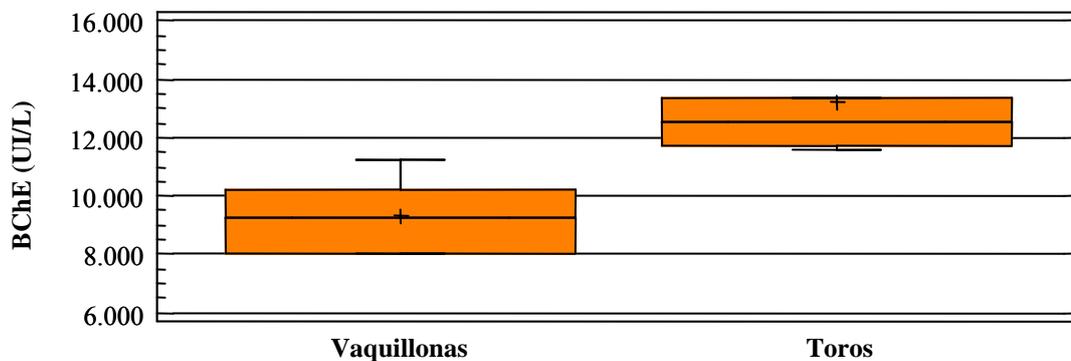


Figura IV.14. Comparación de la actividad basal de acetilcolinesterasa en vaquillonas y toros ($p < 0,005$).

En cambio, la actividad de la butirilcolinesterasa no manifestó diferencias entre machos y hembras ($p > 0,05$) (Figura IV.15).

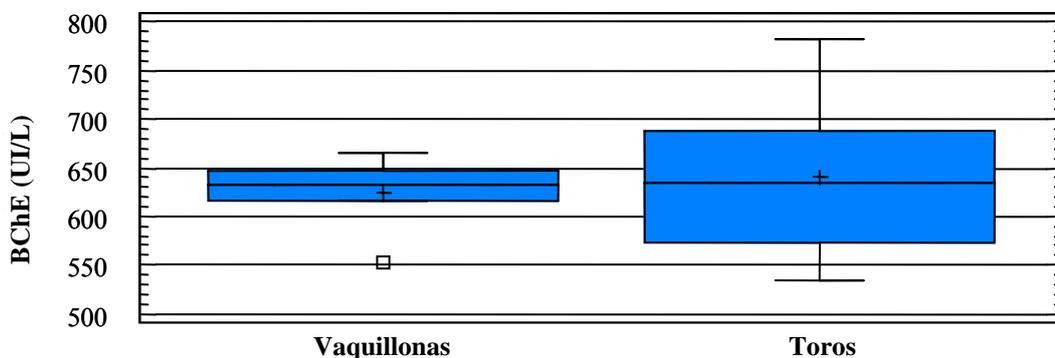


Figura IV.15. Comparación de la actividad basal de butirilcolinesterasa en vaquillonas y toros ($p > 0,05$).

Es importante señalar que la actividad de la enzima acetilcolinesterasa registrada en los toros fue superior a la obtenida en todos los otros grupos de individuos utilizados en el ensayo ($p < 0,005$).

IV.7.- Influencia de la orquiectomía en la actividad colinesterásica

Al evaluar el efecto de la castración en la actividad basal de acetilcolinesterasa encontramos que se presentan diferencias entre toros y novillos ($p < 0,005$), ya que este ultimo grupo presentaba menores niveles de actividad (Figura IV.16)

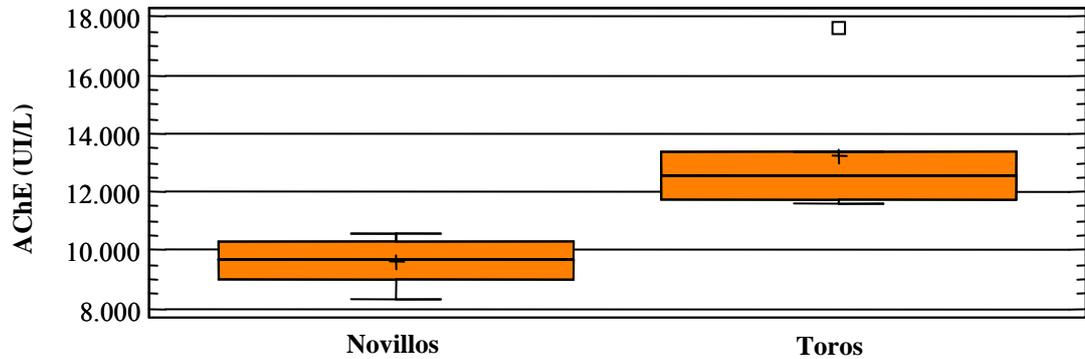


Figura IV.16. Comparación de los valores basales de acetilcolinesterasa en novillos y toros ($p < 0,005$).

Idéntica situación se presentó en la actividad de la enzima butirilcolinesterasa (Figura IV.17), ya que nuevamente los toros presentaron mayor actividad enzimática ($p < 0,005$).

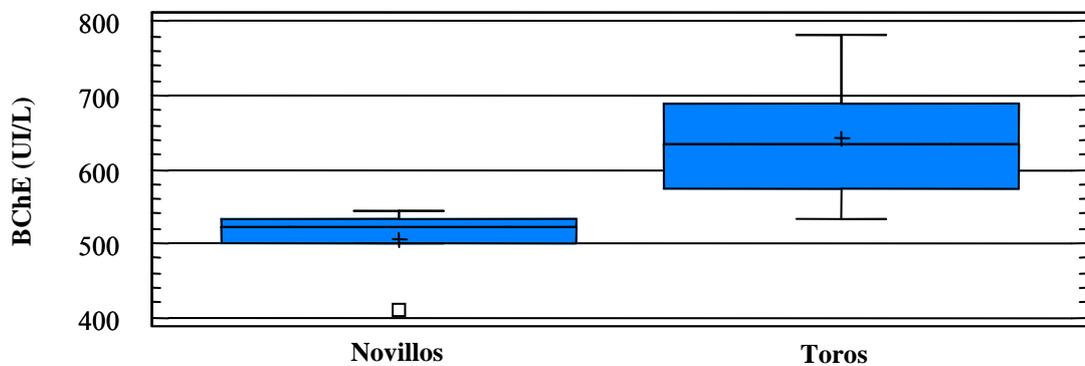


Figura IV.17. Comparación de los valores basales de butirilcolinesterasa en novillos y toros ($p < 0,005$).

Cuando la actividad colinesterásica de los novillos se comparó con la de las vaquillonas, no encontramos diferencias en la actividad de AChE entre ambos grupos; no obstante en el caso de la BChE la actividad enzimática era ligeramente inferior en novillos que en las hembras.

IV.8.- Influencia de la época del año en la actividad colinesterásica.

En las Figuras IV.18 y IV.19 se muestran los valores de actividad basal de AChE y BChE en novillos en dos momentos distintos del año, la fase invernal evaluada en el mes de junio y la fase de verano realizada en diciembre. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en la actividad de las dos enzimas.

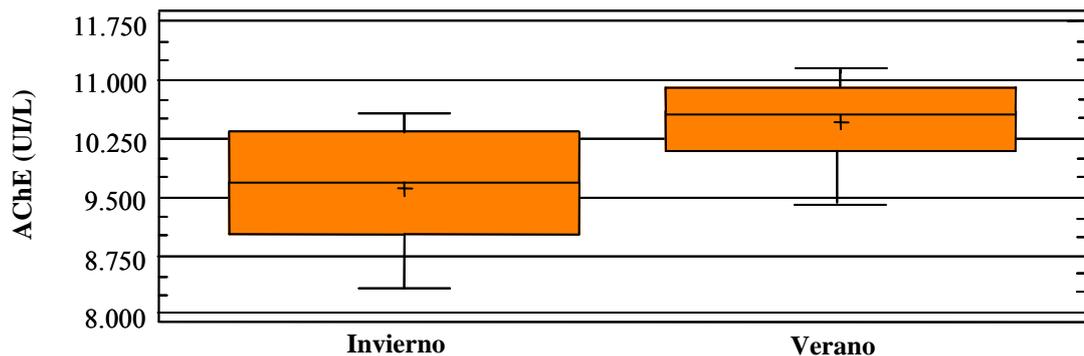


Figura IV.18. Comparación de los valores basales de acetilcolinesterasa en novillos para las fases de invierno y verano.

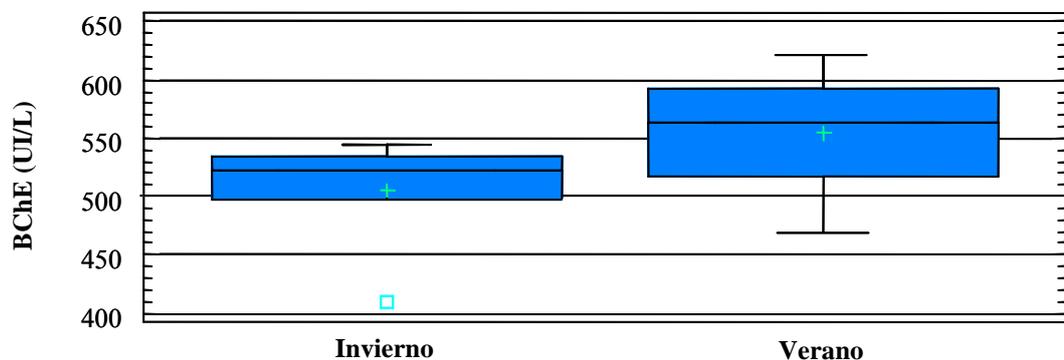


Figura IV.19. Comparación de los valores basales de butirilcolinesterasa en novillos para las fases de invierno y verano.

Es importante señalar que esta comparación se efectuó empleando dos grupos diferentes de animales, ya que luego de la determinación de los valores basales de actividad colinesterásica en invierno, los individuos fueron tratados con clorpirifós, y si bien al momento de ejecutar el ensayo de verano la actividad de las enzimas ya presentaba valores normales, consideramos conveniente emplear un grupo que previamente no haya estado expuesto al clorpirifós, a fin de evitar posibles interferencias.

IV.9.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en bovinos machos enteros de diferentes edades

En la Tabla IV.8 puede observarse como se modifica la actividad de las enzimas AChE y BChE en terneros de 1 día de vida luego de la aplicación de clorpirifós por vía tópica.

Tabla IV.8. Evolución temporal de la actividad de las enzimas AChE y BChE en terneros de 1 día de vida luego de la administración de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica. (*): $p < 0,01$ Diferencia entre actividad colinesterásica basal y la obtenida en los diferentes días post tratamiento; \varnothing : no analizado estadísticamente

Tiempo	AChE (UI/L)	BChE (UI/L)
	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.
Basal	7.507,00 \pm 1.455,64	390,33 \pm 71,85
Día 2	6.451,17 \pm 1.707,57	415,67 \pm 51,55
Día 4	4.109,00 \pm 1.288,82 (*)	402,17 \pm 23,54
Día 7	4.444,40 \pm 788,66 (*)	393,40 \pm 64,23
Día 14	3.275,50 \pm 345,78 (\varnothing)	420,00 \pm 22,63

En la Figura IV.20 puede apreciarse los porcentajes de inhibición en la actividad de las enzimas AChE y BChE en terneros de 1 día de vida luego de la aplicación de clorpirifós.

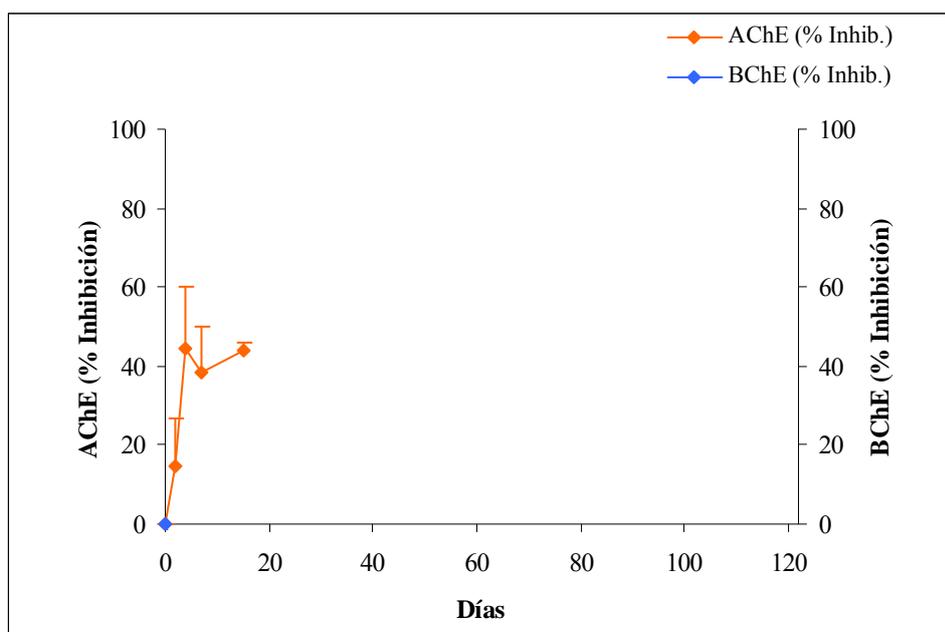


Figura IV.20. Porcentaje de inhibición de las enzimas AChE y BChE en terneros de 1 día de vida luego de la administración de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica.

Desde el segundo día en adelante se evidencia una significativa inhibición de la enzima AChE. Este efecto no se observa para la BChE, ya que comparando el porcentaje de inhibición de BChE basal con la que se presenta a los días dos, cuatro y siete, no se presentan diferencias estadísticamente significativas. Todos los animales que conformaban el grupo murieron entre el sexto y el decimosexto día post tratamiento.

En la Tabla IV.9 y en la Figura IV.21 puede apreciarse como se modifica la actividad de las enzimas AChE y BChE en terneros de 7 días de vida luego del tratamiento con clorpirifós.

Tabla IV.9. Evolución temporal de la actividad de las enzimas AChE y BChE en terneros de 7 días de vida luego de la administración de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica. (*): $p < 0,01$ Diferencia entre la actividad colinesterásica basal y la obtenida a los diferentes días post tratamiento. \varnothing : no analizado estadísticamente.

Tiempo	AChE (UI/L)	BChE (UI/L)
	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.
Basal	10.498,17 \pm 843,63	426,83 \pm 61,41
Día 2	6.578,33 \pm 1.023,13 (*)	405,33 \pm 37,86
Día 4	4.291,17 \pm 805,35 (*)	439,83 \pm 45,38
Día 7	4.649,50 \pm 381,82 (*)	424,33 \pm 60,74
Día 15	3.743,83 \pm 739,01 (*)	384,50 \pm 71,44
Día 21	3.160,00 \pm 1.579,34 (\varnothing)	242,67 \pm 51,19
Día 28	3.790,50 \pm 1.880,20 (\varnothing)	187,50 \pm 2,12
Día 50	5.055,00 \pm 106,07 (\varnothing)	284,00 \pm 39,60
Día 80	4.724,00 \pm 783,47 (\varnothing)	328,50 \pm 9,19
Día 120	5.498,00 \pm 622,25 (\varnothing)	422,00 \pm 90,51

Al igual que en el caso de los terneros de 1 día de vida, se produce una significativa inhibición en la actividad de la AChE desde el segundo día post aplicación. En este grupo solo sobrevivieron dos animales, ya que uno murió a los 14 días y los otros 3 entre los días 20 y 21 post tratamiento. En el caso de la enzima BChE no se presentaron diferencias significativas entre la actividad basal y la registrada hasta el día 15 post tratamiento.

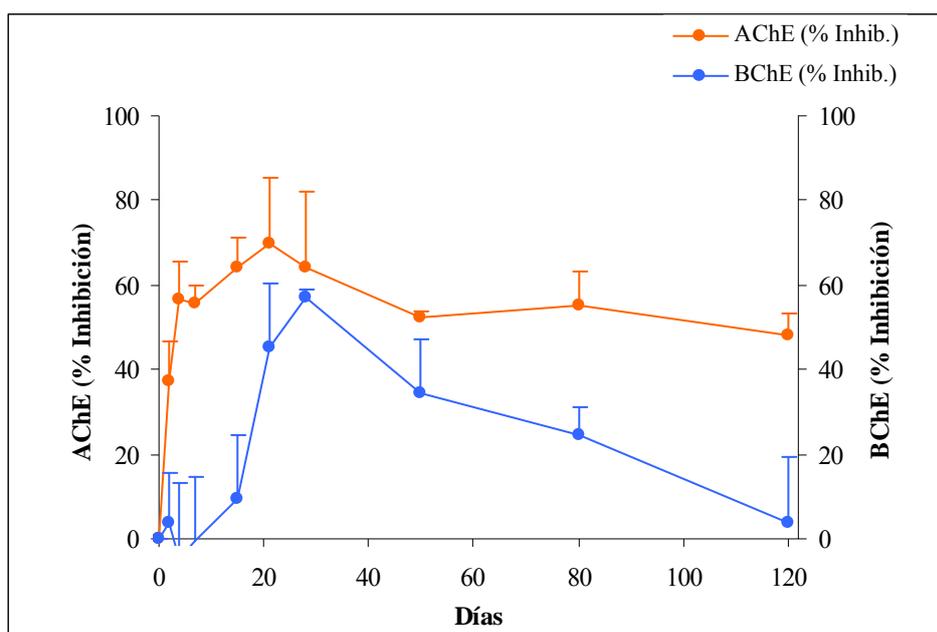


Figura IV.21. Porcentaje de inhibición de las enzimas AChE y BChE en terneros de 7 días de vida luego de la administración de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica.

En la Tabla IV.10 y en la Figura IV.22 puede apreciarse como se modifica la actividad de las enzimas AChE y BChE en terneros de 28 días de vida luego de la aplicación de clorpirifós por vía tópica.

Tabla IV.10. Evolución temporal de la actividad de las enzimas AChE y BChE en terneros de 28 días de vida luego de la administración de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica. (*) $p < 0,01$ Diferencia entre la actividad colinesterásica basal y la obtenida a los diferentes días post tratamiento; \varnothing : no analizado estadísticamente.

Tiempo	AChE (UI/L)	BChE (UI/L)
	Media \pm D.E	Media \pm D.E.
Basal	9.916,17 \pm 1.386,12	463,00 \pm 32,22
Día 2	7.942,83 \pm 1.829,57	428,67 \pm 41,08
Día 4	4.460,50 \pm 622,13 (*)	431,83 \pm 45,07
Día 7	4.618,67 \pm 522,15 (*)	440,33 \pm 63,86
Día 15	4.407,50 \pm 802,47 (\varnothing)	446,00 \pm 50,91 (\varnothing)
Día 21	4.517,00 \pm 530,27 (\varnothing)	385,33 \pm 121,97 (\varnothing)
Día 28	4.071,33 \pm 845,60 (\varnothing)	251,33 \pm 19,66 (\varnothing)
Día 50	3.126,00 (\varnothing)	269,00 (\varnothing)
Día 80	7.599,00 (\varnothing)	454,00 (\varnothing)
Día 120	6.284,00 (\varnothing)	363,00 (\varnothing)

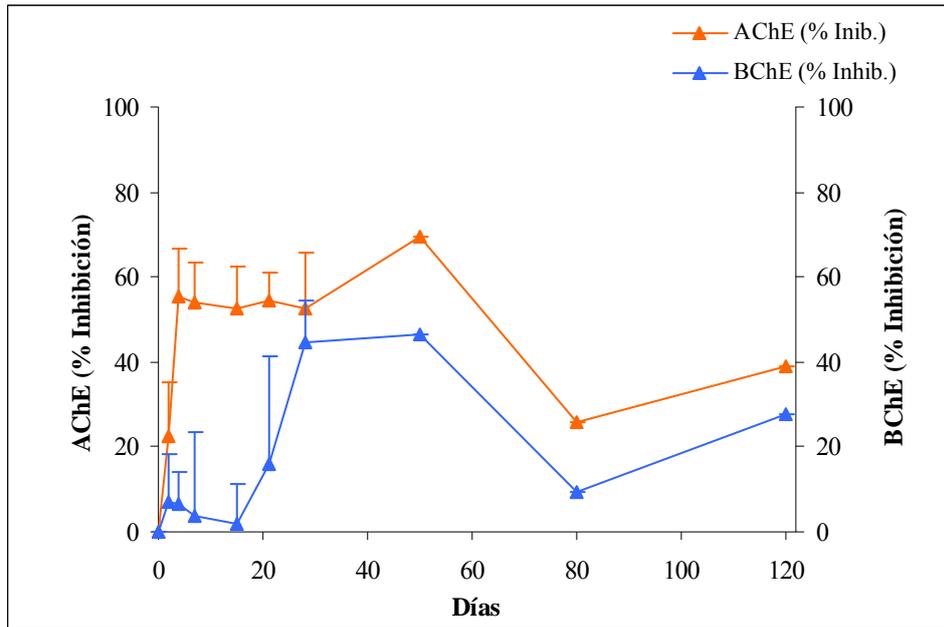


Figura IV.22. Porcentaje de inhibición de las enzimas AChE y BChE en terneros de 28 días de vida luego de la administración de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica.

Analizando la actividad colinesterásica hasta el día 15 post tratamiento encontramos que se presentan diferencias estadísticamente significativas en la actividad de AChE luego de la aplicación de clorpirifós, situación que al igual que en los grupos anteriores no se presenta con BChE. En este grupo murieron cinco de los seis animales entre los días 14 y 34 post aplicación.

La modificación de la actividad de las enzimas AChE y BChE en toros luego de la aplicación de clorpirifós por vía tópica se puede observar en la Tabla IV.11 y en la Figura IV.23. Puede apreciarse que ya desde el segundo día post tratamiento se presenta una marcada inhibición en la actividad de ambas colinesterasas. En el caso de la AChE la máxima inhibición se presentó al día 21 post aplicación, alcanzando un valor del 77,96%. Para la BChE la mayor inhibición se alcanzó al cuarto día post tratamiento con una inhibición del 46,69%. Es de destacar que a pesar de la alta inhibición en la actividad enzimática, ninguno de los animales tratados manifestó signos clínicos compatibles con intoxicación por organofosforados.

Si bien la menor actividad colinesterásica se presentó aún hasta el día 120 post tratamiento, ya en ese momento se hace evidente una tendencia a la recuperación en la actividad enzimática.

Tabla IV.11. Evolución temporal de la actividad de las enzimas AChE y BChE en toros luego de la administración de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópic. (*) $p < 0,05$ Diferencia entre la actividad colinesterásica basal y la obtenida en los diferentes días post tratamiento

Tiempo	AChE (UI/L)	BChE (UI/L)
	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.
Basal	13.220,69 \pm 2.274,18	641,68 \pm 88,08
Día 2	6.505,50 \pm 1.495,25 (*)	450,04 \pm 59,69 (*)
Día 4	6.062,13 \pm 811,51 (*)	340,18 \pm 34,18 (*)
Día 7	4.276,00 \pm 766,47 (*)	375,66 \pm 31,89 (*)
Día 15	6.113,53 \pm 430,19 (*)	396,48 \pm 38,58 (*)
Día 21	2.940,65 \pm 1.289,57 (*)	427,71 \pm 27,51 (*)
Día 28	3.882,30 \pm 461,41 (*)	388,85 \pm 91,85 (*)
Día 50	4.354,31 \pm 1.328,35 (*)	468,67 \pm 33,86 (*)
Día 80	4.948,59 \pm 914,69 (*)	451,71 \pm 73,34 (*)
Día 120	8.605,26 \pm 1.721,57 (*)	553,62 \pm 36,61 (*)

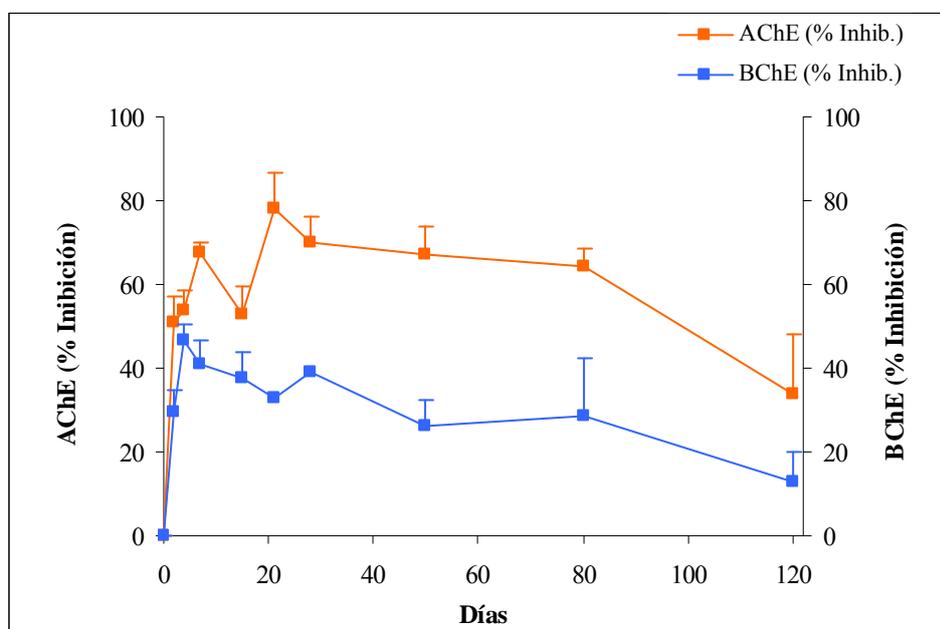


Figura IV.23. Porcentaje de inhibición de las enzimas AChE y BChE en toros luego de la administración de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópic.

IV.10.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en vaquillonas.

La Tabla IV.12 y la Figura IV.24 muestran la alteración de la actividad de las enzimas AChE y BChE en vaquillonas luego de la aplicación de clorpirifós.

Tabla IV.12. Evolución temporal de la actividad de las enzimas AChE y BChE en vaquillonas luego de la administración de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópic. (*) $p < 0,05$ Diferencia entre la actividad colinesterásica basal y la obtenida en los diferentes días post tratamiento

Tiempo	AChE (UI/L)	BChE (UI/L)
	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.
Basal	9.338,39 \pm 1.331,61	624,65 \pm 39,32
Día 2	7.965,00 \pm 1.213,45 (*)	541,70 \pm 32,00 (*)
Día 4	5.193,98 \pm 436,32 (*)	413,83 \pm 28,62 (*)
Día 7	4.236,33 \pm 875,94 (*)	400,95 \pm 34,83 (*)
Día 15	4.356,08 \pm 214,07 (*)	477,54 \pm 20,93 (*)
Día 21	4.566,67 \pm 326,60 (*)	476,59 \pm 50,90 (*)
Día 28	5.126,99 \pm 714,09 (*)	494,89 \pm 60,86 (*)
Día 50	5.808,15 \pm 1.235,16 (*)	503,33 \pm 27,14 (*)
Día 80	6.269,65 \pm 540,48 (*)	511,33 \pm 26,49 (*)
Día 120	8.587,34 \pm 662,10	552,93 \pm 32,90 (*)

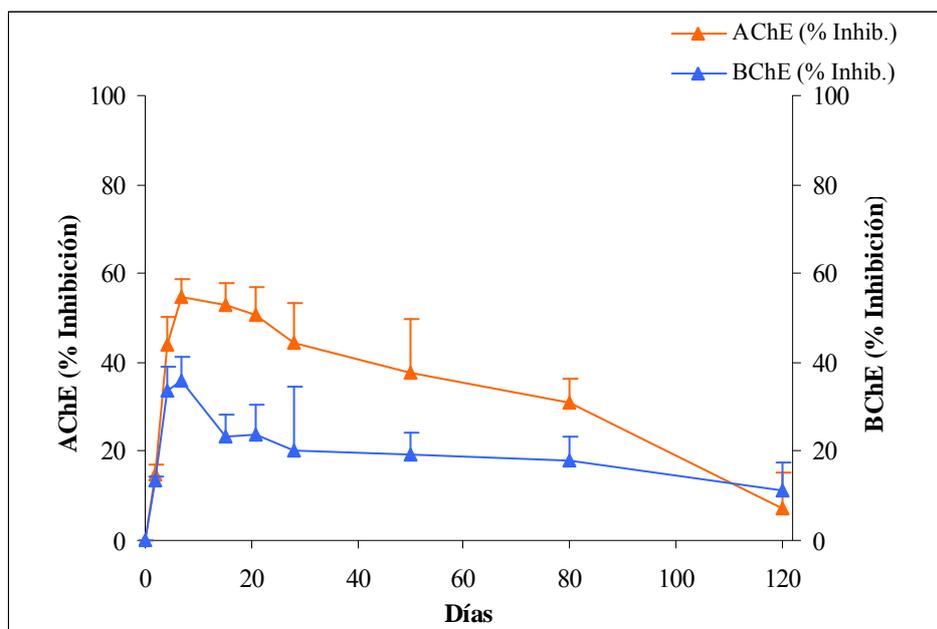


Figura IV.24. Porcentaje de inhibición de las enzimas AChE y BChE en vaquillonas luego de la administración de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópic.

IV.11.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en novillos.

Los resultados obtenidos en el estudio de la actividad de las enzimas AChE y BChE en novillos luego de la administración inyectal de clorpirifós se pueden observar en la Tabla IV.13 y en la Figura IV.25.

Tabla IV.13. Evolución temporal de la actividad de las enzimas AChE y BChE en novillos luego de la administración inyectal de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tóptica. (*) $p < 0,01$ Diferencia entre actividad colinesterásica basal y a los diferentes días post tratamiento

Tiempo	AChE (UI/L)	BChE (UI/L)
	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.
Basal	9.597,00 \pm 845,75	505,17 \pm 49,87
Día 2	9.110,17 \pm 1.530,89	491,33 \pm 49,69
Día 4	7.756,83 \pm 1.739,31 (*)	500,50 \pm 72,07
Día 7	6.642,50 \pm 671,01 (*)	488,50 \pm 54,03
Día 15	5.015,83 \pm 1.005,37 (*)	444,67 \pm 50,90
Día 21	4.725,83 \pm 1.184,39 (*)	349,00 \pm 34,65 (*)
Día 28	5.091,17 \pm 559,92 (*)	285,67 \pm 36,57 (*)
Día 50	4.956,50 \pm 728,81 (*)	342,83 \pm 12,75 (*)
Día 80	7.168,67 \pm 481,31 (*)	409,17 \pm 19,49 (*)
Día 120	8.640,00 \pm 550,84	454,83 \pm 34,74

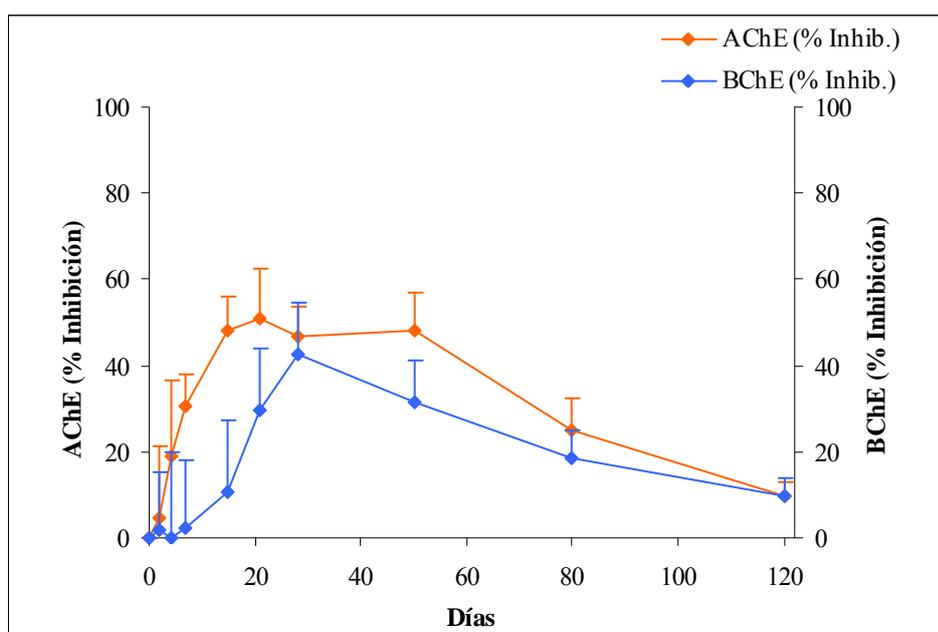


Figura IV.25. Porcentaje de inhibición de las enzimas AChE y BChE en novillos luego de la administración inyectal de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tóptica.

Se presentó una marcada disminución en la actividad de la AChE desde el día 4 ($19,20 \pm 13,96\%$) en adelante hasta el día 50 ($48,04 \pm 8,86\%$). Si bien la actividad de la BChE también registró una importante inhibición ($42,66 \pm 12,01\%$), la misma se evidenció al día 28 post tratamiento. Al igual que en los otros grupos evaluados formados por individuos adultos, ninguno de los animales manifestó signos clínicos compatibles con intoxicación por organofosforados.

En la Tabla IV.14 se presenta la actividad de las enzimas AChE y BChE en los novillos tratados con clorpirifós por vía tópica en época estival, en tanto que la Figura IV.26 recoge el porcentaje de inhibición de ambas enzimas.

Tabla IV.14. Evolución temporal de la actividad de las enzimas AChE y BChE en novillos luego de la administración estival de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica en época estival (*) $p < 0,05$ Diferencia entre la actividad colinesterásica basal y la obtenida en los diferentes días post tratamiento

Tiempo	AChE (UI/L)	BChE (UI/L)
	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.
Basal	10.572,70 \pm 643,02	554,17 \pm 54,44
Día 2	8.628,50 \pm 394,26 (*)	477,00 \pm 45,06 (*)
Día 4	8.455,71 \pm 406,00 (*)	435,17 \pm 51,46 (*)
Día 7	6.813,30 \pm 377,11 (*)	399,33 \pm 40,10 (*)
Día 15	7.330,52 \pm 737,47 (*)	362,67 \pm 35,88 (*)
Día 21	8.342,08 \pm 697,19 (*)	401,83 \pm 27,67 (*)
Día 28	9.814,25 \pm 637,89 (*)	454,83 \pm 41,46 (*)
Día 50	10.348,84 \pm 687,04	546,33 \pm 55,06
Día 80	10.865,14 \pm 712,11	571,28 \pm 64,23
Día 120	10.615,40 \pm 517,29	565,89 \pm 35,19

El porcentaje de inhibición de ambas enzimas no supera el 40% y a partir del día 15 para la acetilcolinesterasa y del 21 para la butirilcolinesterasa se evidencia una tendencia a la recuperación de la actividad enzimática, no observándose diferencias estadísticamente significativas en la actividad a partir del día 50 post tratamiento.

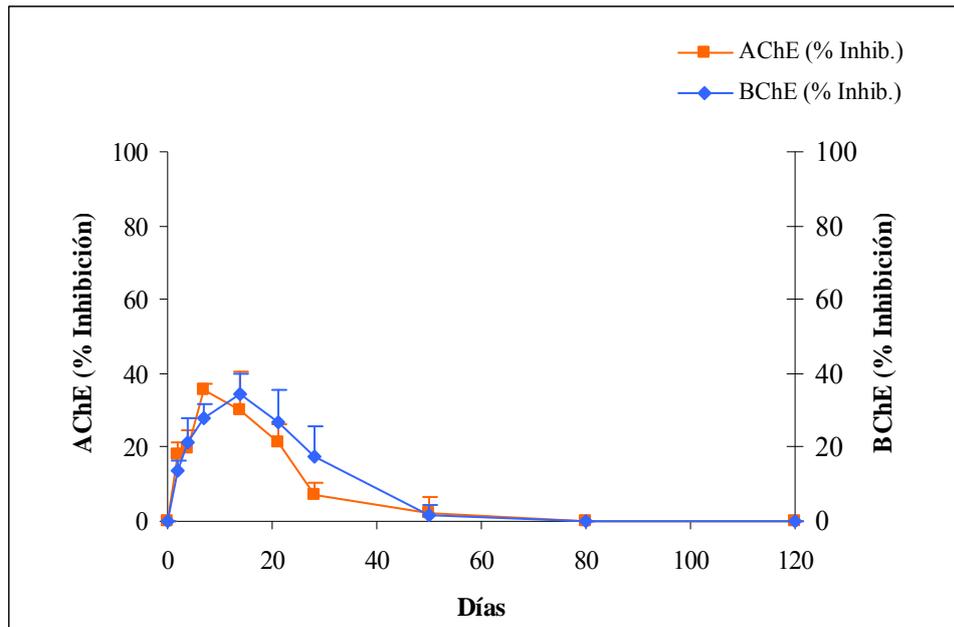


Figura IV.26 Porcentaje de inhibición de las enzimas AChE y BChE en novillos luego de la administración estival de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica.

IV.12.- Comparación en el porcentaje de inhibición de las enzimas colinesterasas luego de la aplicación de clorpirifós a bovinos de diferentes edades.

En las Figuras IV.27 y IV.28 y en Tablas IV.15 y IV.16 pueden apreciarse las diferencias en el grado de inhibición enzimática a los diferentes días post tratamiento que presentaron los animales de diferentes edades.

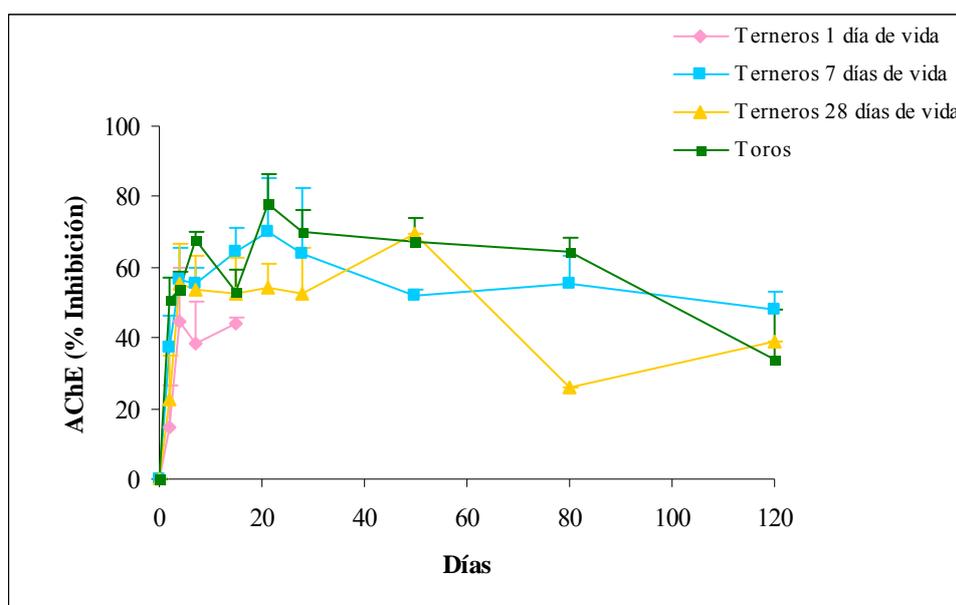


Figura IV.27. Porcentaje de inhibición en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en bovinos machos enteros de diferentes edades luego de la aplicación de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica

Tabla IV.15. Comparación de los porcentajes de inhibición de acetilcolinesterasa en bovinos machos enteros de diferentes edades luego de la aplicación de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica.

Tiempo Días	Ternero 1 día Media ± D.E.	Ternero 7 días Media ± D.E.	Ternero 28 días Media ± D.E.	Toros Media ± D.E.
2	14,43 ± 12,22 (ac)	37,31 ± 9,17 (ad)	22,63 ± 12,34 (e)	51,01 ± 6,07 (cde)
4	44,54 ± 15,50	56,52 ± 9,25	55,21 ± 11,64	53,77 ± 4,94
7	38,34 ± 11,89 (abc)	55,56 ± 4,13 (ad)	53,80 ± 9,52 (be)	67,61 ± 2,59 (cde)
14	44,01 ± 2,03 (ac)	64,30 ± 6,86 (ad)	52,47 ± 10,13	52,92 ± 6,59 (cd)
21	-	70,02 ± 15,14 (e)	54,29 ± 6,75 (e)	77,96 ± 8,74 (e)
28	-	64,09 ± 18,18 (e)	52,51 ± 13,29 (e)	69,94 ± 6,29 (e)
50	-	52,24 ± 1,56 (e)	69,54 (e)	67,36 ± 6,51 (e)
80	-	55,33 ± 7,93 (e)	25,96 (e)	64,35 ± 4,09 (e)
120	-	48,09 ± 5,27 (e)	38,77 0,00 (e)	34,02 ± 14,01 (e)

Diferencia en el porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa a los distintos tiempos de muestreo entre los animales tratados. $p < 0,05$. (a): diferencia entre terneros de 1 y 7 días; (b): diferencia entre terneros de 1 y 28 días; (c): diferencia entre terneros de 1 día y toros; (d): diferencia entre terneros de 7 días y toros; (e): diferencia entre terneros de 28 días y toros. (e): no analizado estadísticamente.

En el caso de la enzima acetilcolinesterasa se encontró que al segundo día post administración la mayor inhibición se presentaba en toros, lo cual se mantuvo prácticamente a lo largo de todo el estudio, ya que sólo en algunos puntos de muestreo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos testados. Es interesante destacar que el grupo que presentó la menor inhibición enzimática fue el de los terneros de 1 día de vida.

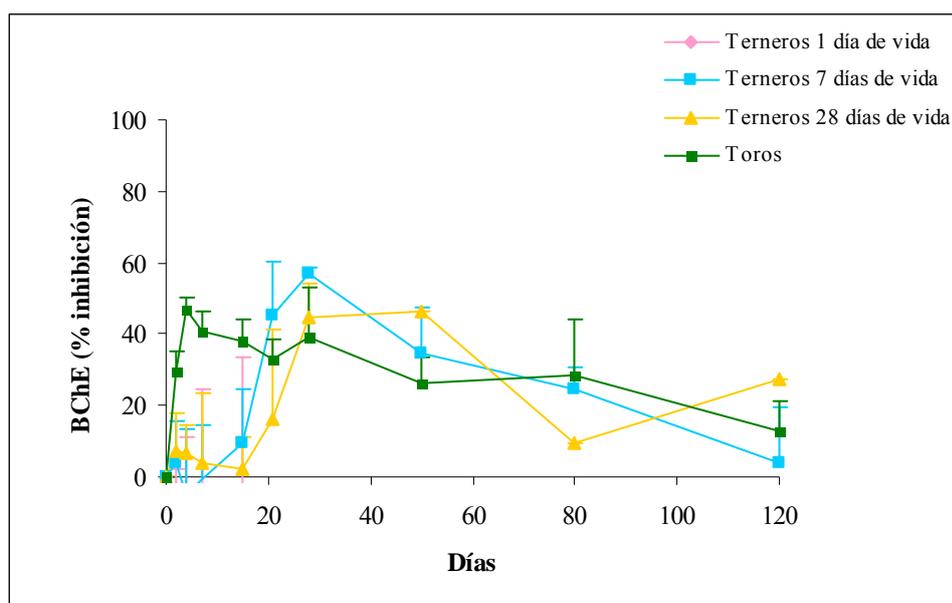


Figura IV.28. Porcentaje de inhibición en la actividad de la enzima butirilcolinesterasa en bovinos machos enteros de diferentes edades luego de la aplicación de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica.

Tabla IV.16. Comparación de los porcentajes de inhibición de acetilcolinesterasa en bovinos machos enteros de diferentes edades luego de la aplicación de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica.

Tiempo Días	Ternero 1 día Media ± D.E.	Ternero 7 días Media ± D.E.	Ternero 28 días Media ± D.E.	Toros Media ± D.E.
2	S.I. (ac)	3,89 ± 11,89 (c)	7,04 ± 11,05 (ad)	29,69 ± 5,25 (bcd)
4	S.I. (b)	S.I. (c)	6,69 ± 7,63 (d)	46,69 ± 3,81 (bcd)
7	S.I. (b)	S.I. (c)	3,89 ± 19,59 (d)	40,95 ± 5,67 (bcd)
14	S.I. (b)	9,36 ± 15,26 (c)	2,03 ± 9,22 (d)	37,72 ± 6,15 (bcd)
21	-	45,33 ± 14,92 (e)	15,99 ± 25,25 (e)	32,72 ± 6,09 (e)
28	-	57,04 ± 1,88 (e)	44,64 ± 9,66 (e)	38,95 ± 14,06 (e)
50	-	34,66 ± 12,66 (e)	46,31 (e)	26,25 ± 7,16 (e)
80	-	24,66 ± 6,25 (e)	9,38 (e)	28,46 ± 15,49 (e)
120	-	3,86 ± 15,42 (e)	27,54 (e)	12,89 ± 8,17 (e)

Diferencia en el porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa a los distintos tiempos de muestreo entre los animales tratados. $p < 0,05$. **(a)**: diferencia entre terneros de 1 y 28 días; **(b)**: diferencia entre terneros de 1 día y toros; **(c)**: diferencia entre terneros de 7 días y toros; **(d)**: diferencia entre terneros de 28 días y toros; **(e)**: no analizado estadísticamente. (S.I.: Sin Inhibición).

Desde el segundo día post administración, la actividad de la BChE presentó una mayor inhibición enzimática en los toros que en los terneros. Esta situación se mantuvo hasta el día 15; si bien hay que señalar que sólo hasta ese día hemos tenido un número suficiente de animales para realizar el estudio estadístico, se puede observar que la respuesta obtenida en los días 21 y 28 en los terneros que sobrevivieron fue semejante a la presentada en los toros.

IV.13.- Comparación en el porcentaje de inhibición de las enzimas colinesterasas luego de la aplicación de clorpirifós a bovinos machos enteros y hembras.

En las Figuras IV.29 y IV.30 puede apreciarse el diferente grado de inhibición enzimática entre machos enteros y hembras para ambas enzimas. Prácticamente en la totalidad de los días muestreados el porcentaje de inhibición de la AChE fue superior en toros que en vaquillonas. Por otra parte, sólo se encontró una mayor inhibición en toros a los días 2, 4 y 14 post administración para la enzima BChE.

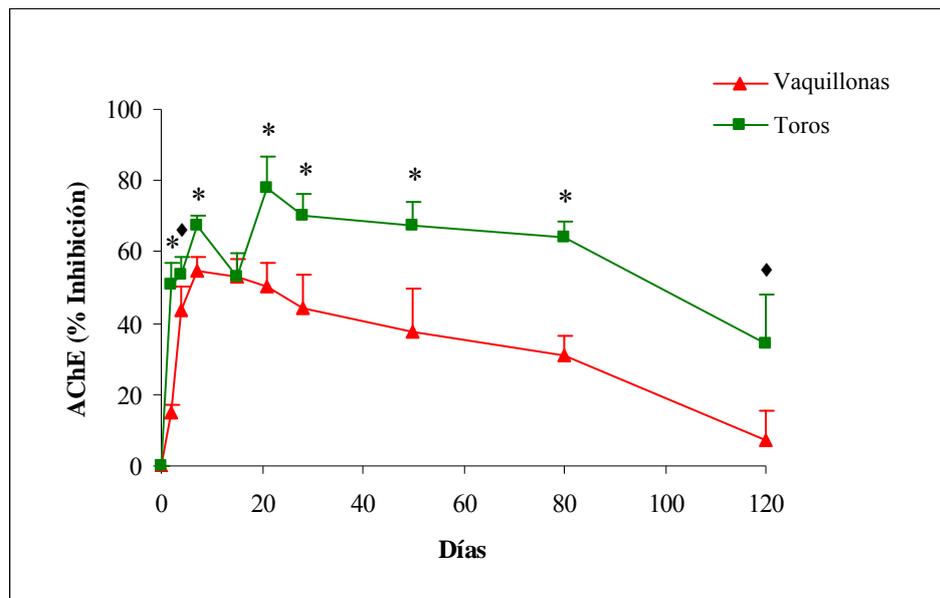


Figura IV.29. Comparación del porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en toros y vaquillonas luego de la aplicación de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica. (*): $P < 0,005$; (♦): $P < 0,01$.

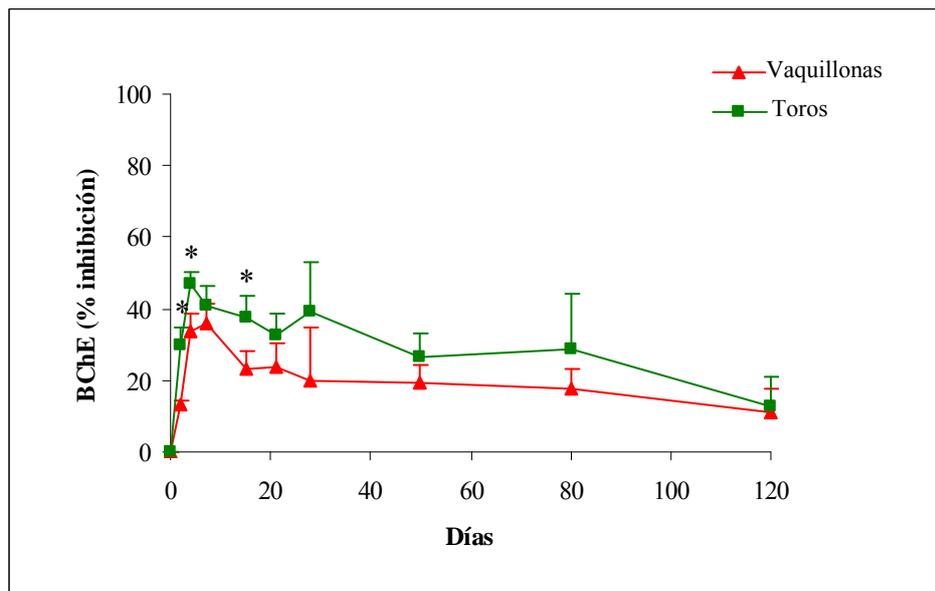


Figura IV.30 Comparación del porcentaje de inhibición de la enzima butirilcolinesterasa en toros y vaquillonas luego de la aplicación de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica. (*) $P < 0,005$.

IV.14.- Comparación en el porcentaje de inhibición de las enzimas colinesterasas luego de la aplicación de clorpirifós a bovinos machos enteros y castrados.

En las Figuras IV.31 y IV.32 se presentan las diferencias en el porcentaje de inhibición enzimática entre toros y novillos. En el caso de AChE, se encontró un mayor porcentaje de inhibición en los toros durante casi todos los días muestreados, mientras que para BChE, solamente en los primeros días se observó una mayor inhibición en los toros.

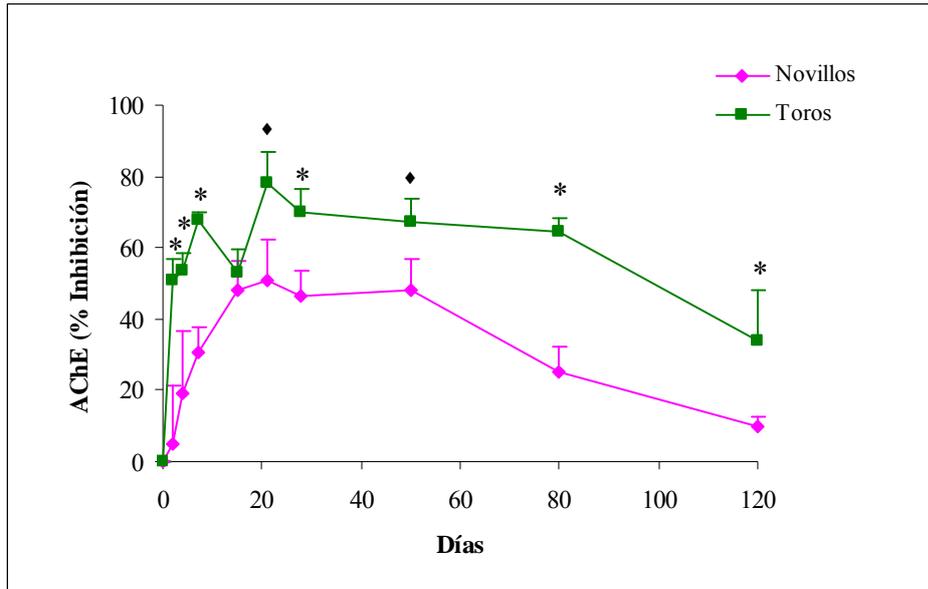


Figura IV.31 Comparación del porcentaje de inhibición de la enzima acetilcolinesterasas en toros y novillos luego de la aplicación de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica. (*) $P < 0,005$ (♦) $P < 0,01$.

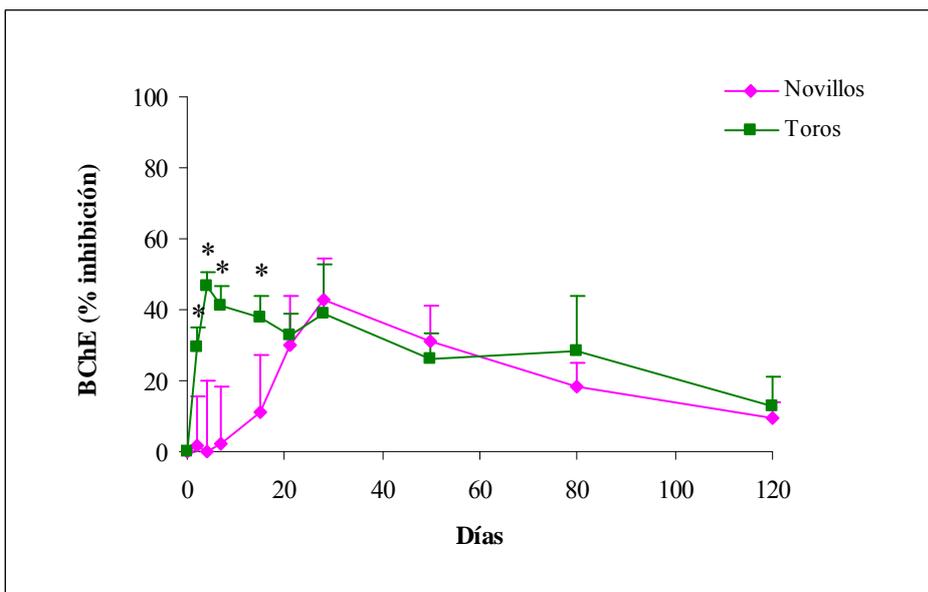


Figura IV.32 Comparación del porcentaje de inhibición de la enzima butirilcolinesterasa en toros y novillos luego de la aplicación de clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica. (*) $P < 0,005$.

IV.15.- Comparación en el porcentaje de inhibición de las enzimas colinesterasas luego de la aplicación de clorpirifós a novillos en invierno o en verano.

En las Figuras IV.33 y IV.34 se presentan las diferencias en el porcentaje de inhibición enzimática entre novillos tratados en invierno y en verano. Para ambas enzimas puede observarse que el porcentaje de inhibición fue menor en verano y que la recuperación de la actividad enzimática fue más rápida en verano que en invierno.

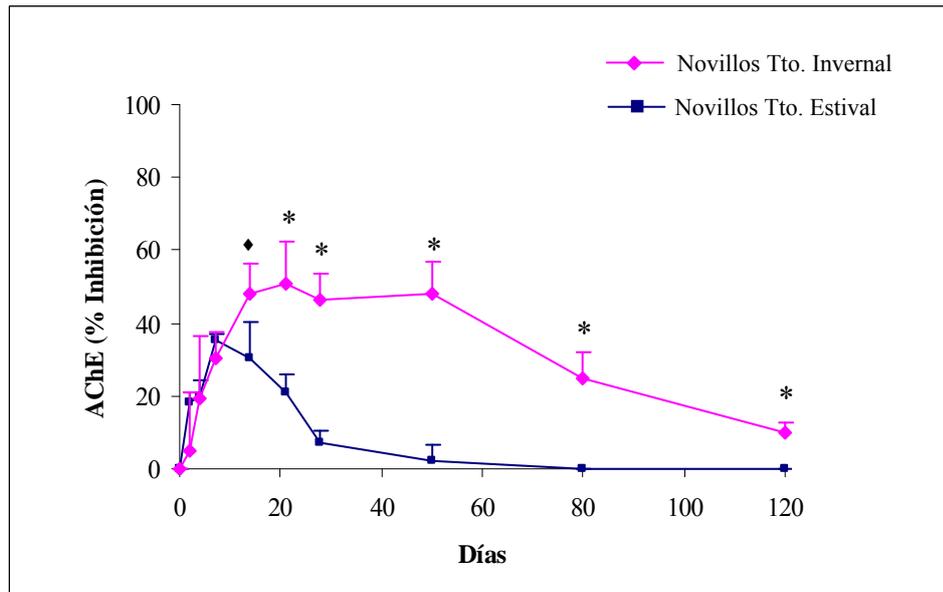


Figura IV.33 Comparación del porcentaje de inhibición de AChE en novillos tratados con clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica en invierno o en verano. (*) $P < 0,005$ (♦) $P < 0,01$.

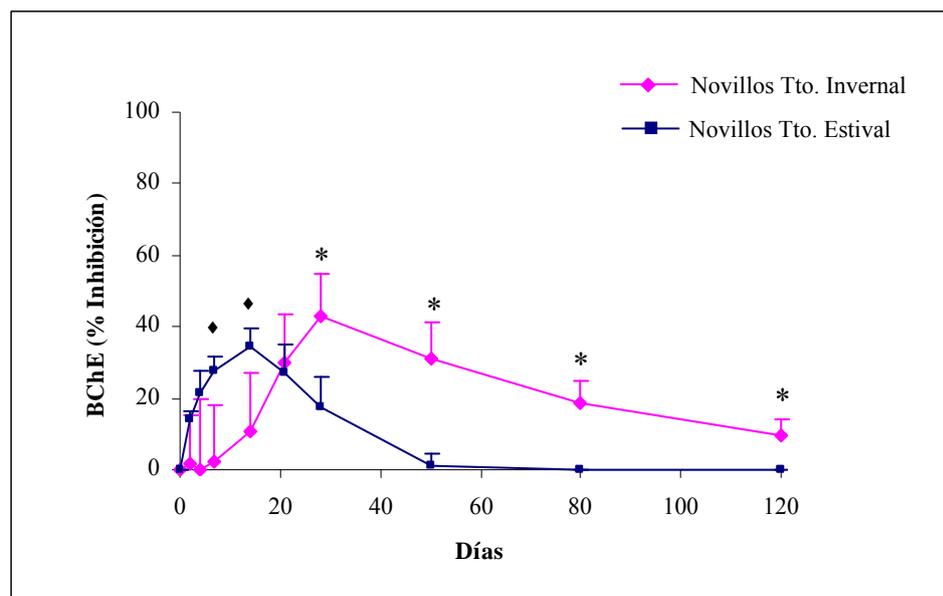


Figura IV.34 Comparación del porcentaje de inhibición de BChE en novillos tratados con clorpirifós (10 mg/kg) por vía tópica en invierno o en verano. (*) $P < 0,005$ (♦) $P < 0,01$.

IV.16.- Farmacocinética del clorpirifós en bovinos de diferentes edades y sexo.

Los valores individuales de concentración plasmática de clorpirifós obtenidos tras la administración de un preparado comercial al 10% (Derramin F®) por vía tópica a la dosis de 10 mg/kg en terneros de 1 día de vida se presentan en la Tabla IV.17, en tanto que en la Figura IV.35 se representa la curva de disposición plasmática en la que las concentraciones del antiparasitario se expresan como media \pm DE.

Tabla IV.17. Concentraciones plasmáticas de clorpirifós ($\mu\text{g/L}$) obtenidas tras su administración a terneros de 1 día de vida por vía tópica a una dosis de 10 mg/kg (ND: No detectado) (MLC: Menor al Límite de Cuantificación).

Tiempo (h)	Número de individuo						Media	D.E.
	1	2	3	4	5	6		
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
0,25	MLC	ND	MLC	MLC	2,6	MLC	2,60	-
0,5	2,6	MLC	ND	4,7	3,4	MLC	3,56	1,06
1	7,5	3	2,6	MLC	2,5	2,5	3,62	2,17
1,5	MLC	3,9	2,8	2,9	4,8	MLC	3,60	0,94
2	2,5	4,6	7,7	MLC	7,4	2,6	4,96	2,51
6	ND	MLC	8,8	6,8	19	3,3	9,48	6,74
10	MLC	4,3	8,1	10,2	15,2	6,5	8,86	4,15
24	MLC	4,5	6,8	16	10,7	6,2	8,84	4,60
36	2,5	5,8	5,4	6,3	6,6	21,0	7,93	6,56
48	MLC	5,5	3,8	5,0	2,6	7,4	4,86	1,81
96	ND	MLC	MLC	MLC	ND	2,6	2,60	-
168	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-

En este estudio preliminar puede apreciarse que desde la primera hora post administración se encontraron concentraciones plasmáticas cuantificables de clorpirifós en todos los animales tratados. Los niveles encontrados fueron sumamente bajos, siendo el valor más elevado 21 $\mu\text{g/L}$, cuantificado en el ternero #6 a las 36 horas post administración.

Es muy significativa la amplia variación individual que presentaron las concentraciones plasmáticas, lo cual es sumamente característico de los procesos de absorción percutánea.

Al cuarto día post administración sólo se encontraron niveles cuantificables de clorpirifós en uno de los terneros, en tanto que al séptimo día ninguno de los animales presentaba concentraciones cuantificables del fármaco.

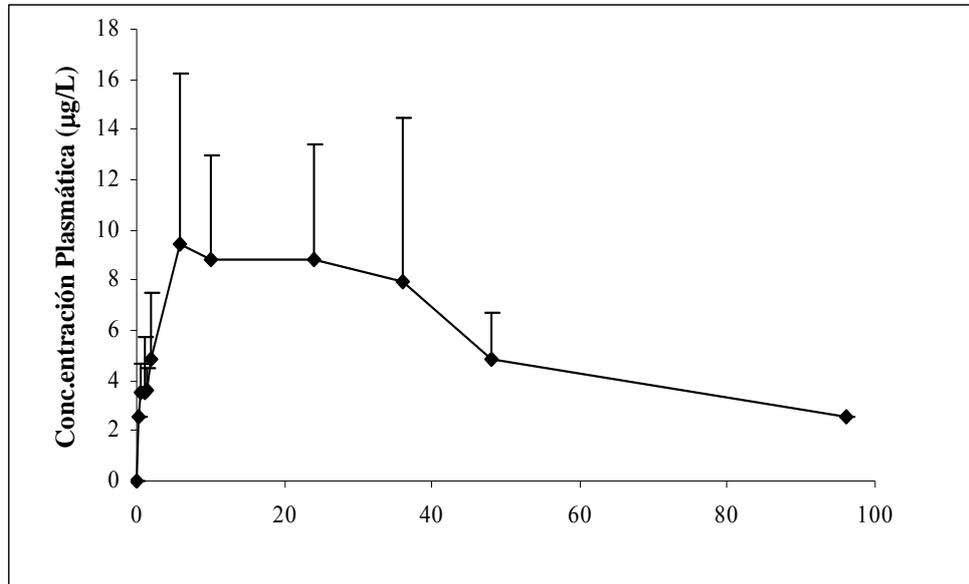


Figura IV.35. Evolución de las concentraciones plasmáticas (media \pm DE) frente al tiempo obtenidas tras la administración de clorpirifós a terneros de 1 día de vida por vía tópica a una dosis de 10 mg/kg.

En la Tabla IV.18 y Figura IV.36 se presentan los valores de concentración plasmática de clorpirifós vs. tiempo halladas en los terneros de 7 días de vida. Al igual que en el caso anterior, las concentraciones plasmáticas cuantificadas fueron sumamente bajas, lo cual queda evidenciado en que la máxima concentración plasmática fue de $8,35 \pm 3,54 \mu\text{g/L}$, pero en este caso la mayoría de los animales presentaron niveles detectables de clorpirifós a las 6 horas post administración, las que se mantenían hasta las 48 horas en cuatro de los individuos y hasta las 96 horas en los dos restantes.

El fármaco ha presentado un lento y continuo proceso de absorción. Ninguno de los terneros poseían concentraciones cuantificables del fármaco al séptimo día post tratamiento.

Tabla IV.18 Concentraciones plasmáticas de clorpirifós obtenidas tras su administración a terneros de 7 días de vida por vía tópica a una dosis de 10 mg/kg

Tiempo (Horas)	Número de individuo						Media	D.E.
	1	2	3	4	5	6		
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
0,25	MLC	MLC	MLC	2,5	MLC	ND	2,50	-
0,5	MLC	MLC	MLC	ND	MLC	ND	MLC	-
1	MLC	MLC	MLC	MLC	MLC	ND	MLC	-
1,5	MLC	MLC	MLC	2,5	4,4	ND	3,45	1,34
2	MLC	MLC	MLC	MLC	5,6	ND	5,60	-
6	4,1	2,7	6,2	6,2	12,5	5	6,12	3,40
10	5	3,2	9,5	9,5	10,2	12,7	8,35	3,54
24	6,2	3,5	8,1	8,7	7	7	6,75	1,82
36	5,8	3	5,8	3,7	9,8	8,1	6,03	2,58
48	3,1	3,3	4,4	5,6	ND	6	4,48	1,31
96	ND	ND	2,5	MLC	3,9	4,7	3,70	1,11
168	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-

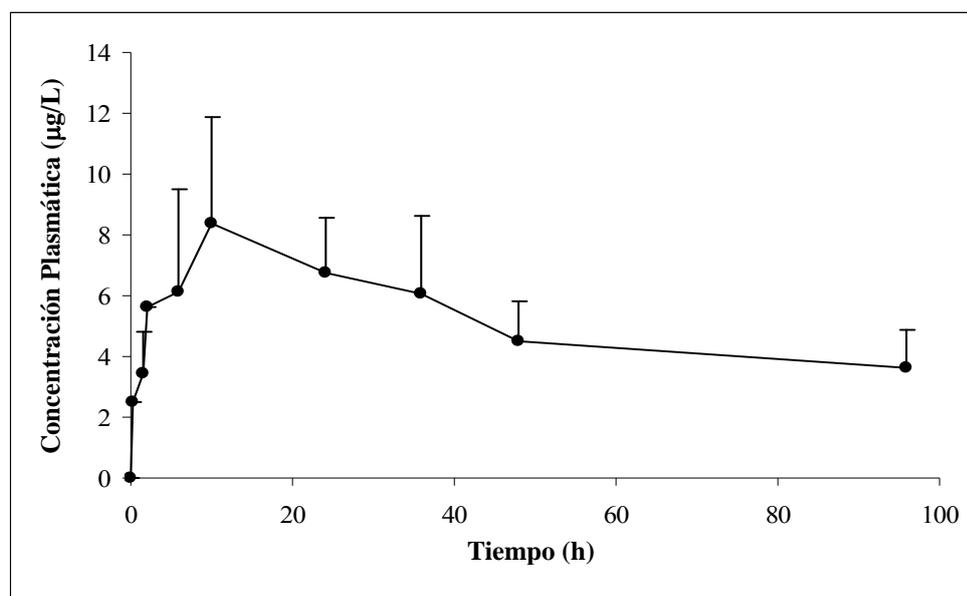


Figura IV.36. Evolución de las concentraciones plasmáticas (media \pm DE) frente al tiempo obtenidas tras la administración de clorpirifós a terneros de 7 días de vida por vía tópica a una dosis de 10 mg/kg.

Los valores de evolución de las concentraciones plasmáticas de clorpirifós en el tiempo, tras la administración por vía tópica en terneros de 28 días de vida se presentan en la Tabla IV.19 y la representación gráfica de las mismas en la Figura IV.37.

Tabla IV.19 Concentraciones plasmáticas de clorpirifós ($\mu\text{g/L}$) obtenidas tras su administración a terneros de 28 días de vida por vía tópica a una dosis de 10 mg/kg

Tiempo (Horas)	Número de individuo						Media	DE
	1	2	3	4	5	6		
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
0,25	5,7	7,4	ND	ND	ND	3,2	5,43	2,11
0,5	2,5	13,5	MLC	7,9	MLC	ND	7,96	5,50
1	MLC	4,8	2,5	MLC	MLC	ND	3,65	1,63
1,5	MLC	5,4	4,2	2,2	MLC	ND	3,93	1,62
2	MLC	5,9	5,5	6,5	ND	ND	5,97	0,50
6	6,7	9	8,2	4,8	4,4	11,5	7,43	2,69
10	7,5	19,4	3,4	9,8	8,9	4,2	8,87	5,75
24	7,9	12,5	10,2	6,5	5,6	3,4	7,68	3,28
36	7,2	7,2	6,2	3,3	MLC	4,3	5,64	1,76
48	4,1	ND	ND	MLC	MLC	MLC	4,10	-
96	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-

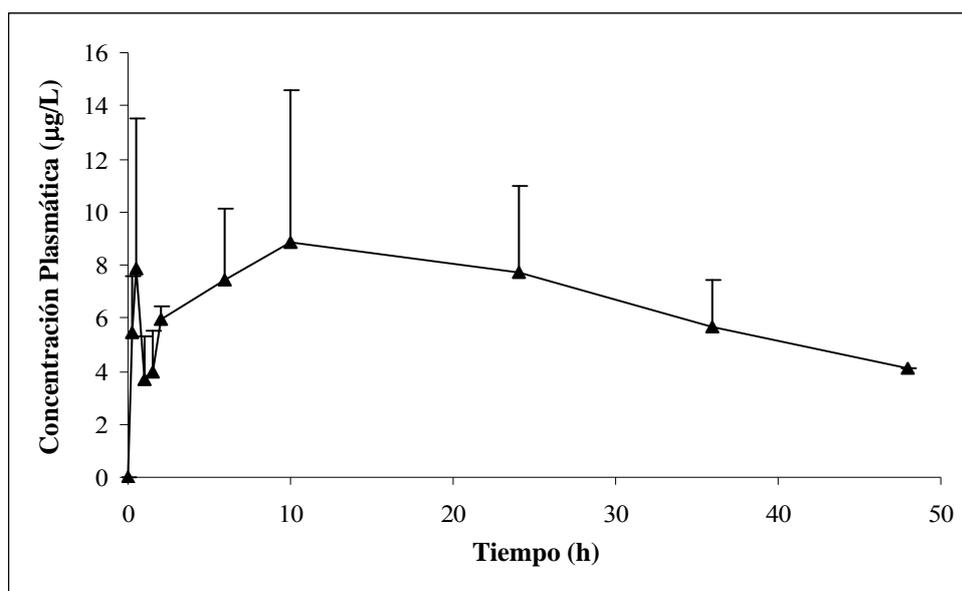


Figura IV.37. Evolución de las concentraciones plasmáticas (media \pm DE) frente al tiempo obtenidas tras la administración de clorpirifós a terneros de 28 días de vida por vía tópica a una dosis de 10 mg/kg

Al igual que en los casos anteriores, se presenta una gran variación individual en la disposición cinética del compuesto, caracterizada por un lento proceso de absorción y bajos niveles de concentración plasmática.

En la Tabla IV.20 se muestran los valores de concentración plasmática de clorpirifós vs. tiempo tras la administración tópica en 6 toros y en la Figura IV.38 se puede apreciar la representación de los niveles de clorpirifós en plasma a lo largo del tiempo, en los individuos tratados.

Tabla IV.20 Concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/L}$) de clorpirifós obtenidas tras su administración a toros por vía tópica a una dosis de 10 mg/kg.

Tiempo (Horas)	Número de individuo						Media:	D.E
	1	2	3	4	5	6		
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
0,25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
0,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
1,5	5	10	3,4	12,7	ND	ND	7,77	4,32
2	9,5	13	ND	ND	ND	ND	11,25	2,47
6	4	6,2	6,1	5,3	ND	ND	5,40	1,02
10	8,5	6	11,1	3	10	2,3	6,81	3,66
24	12	ND	15,5	ND	ND	ND	13,75	2,47
36	2,5	ND	4,5	ND	ND	ND	3,50	1,41
48	5,2	ND	ND	ND	ND	ND	5,20	-
96	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-

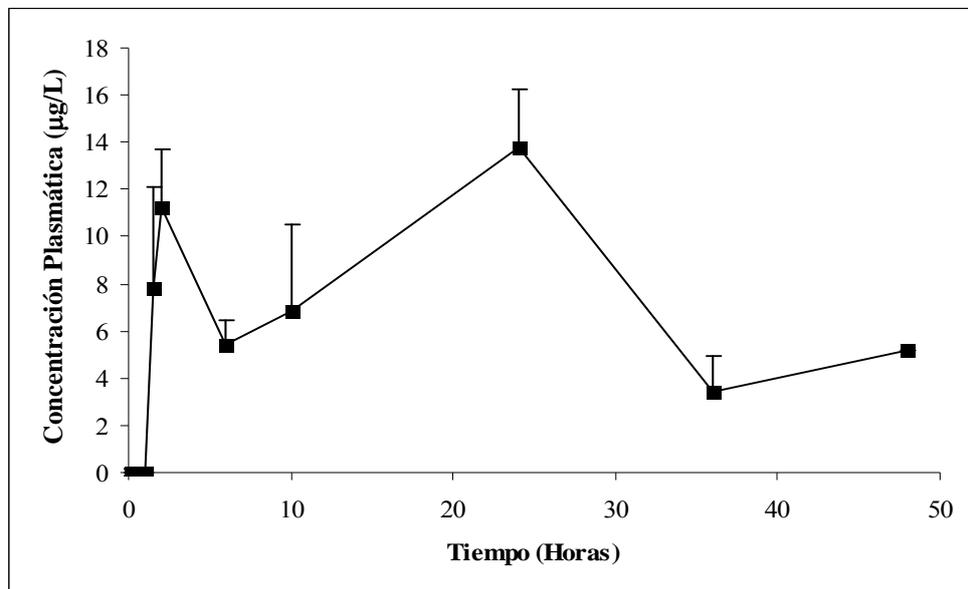


Figura IV.38. Evolución de las concentraciones plasmáticas (media \pm DE) frente al tiempo obtenidas tras la administración de clorpirifós a toros por vía tópica a una dosis de 10 mg/kg.

Como en los casos anteriores, la variación individual en la evolución temporal de las concentraciones de clorpirifós en plasma fue muy alta, siendo característico el hecho de que en todos los animales estas concentraciones fueron sumamente bajas.

Tras la administración de clorpirifós por vía tópica en vaquillonas se obtuvieron las concentraciones plasmáticas que se muestran en la Tabla IV.21 y su representación gráfica en la Figura IV.39

Tabla IV.21 Concentraciones plasmáticas de clorpirifós obtenidas tras su administración a vaquillonas por vía tópica a una dosis de 10 mg/kg

Tiempo (Horas)	Número de individuo						Media	D.E:
	1	2	3	4	5	6		
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
0,25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
0,5	ND	ND	5,1	ND	ND	ND	5,1	-
1	ND	ND	14,1	ND	ND	ND	14,1	-
1,5	ND	ND	10,0	ND	ND	ND	10,0	-
2	ND	8,0	ND	ND	ND	ND	8,0	-
6	8,0	5,0	ND	9,1	ND	6,2	7,08	1,83
10	ND	3,0	ND	7,0	16,7	16,3	10,75	6,84
24	ND	5,4	ND	1,8	17,2	8,0	8,10	6,58
36	ND	6,7	ND	ND	14,6	16,2	12,50	5,09
48	ND	ND	ND	ND	5,6	3,4	4,50	1,56
96	ND	ND	ND	ND	MLC	ND	ND	-

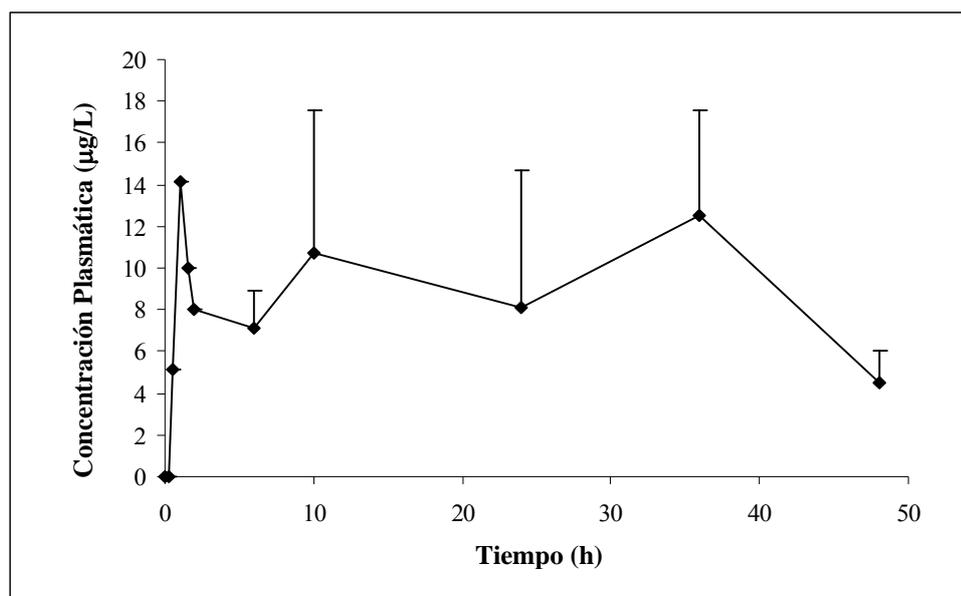


Figura IV.39. Evolución de las concentraciones plasmáticas (media \pm DE) frente al tiempo obtenidas tras la administración de clorpirifós a vaquillonas por vía tópica a una dosis de 10 mg/kg.

Es de destacar que en este grupo se presentaron animales en los cuales sólo registraron concentraciones cuantificables en unos pocos puntos del muestreo. No se identificó la presencia del compuesto en la muestra tomada a los 7 días posteriores al tratamiento, siendo manifiesta la amplia variación individual.

Las concentraciones plasmáticas de clorpirifós obtenidas en cada tiempo de muestreo en novillos tratados por vía tópica se presentan en la Tabla IV.22, en tanto que en la Figura IV.40 se representa la curva correspondiente a la media de las concentraciones plasmáticas para la formulación objeto de este estudio.

Tabla IV.22. Concentraciones plasmáticas de clorpirifós obtenidas tras su administración a novillos por vía tópica a una dosis de 10 mg/kg

Tiempo (Horas)	Número de individuo						Media	D.E.
	1	2	3	4	5	6		
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
0,25	MLC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
0,5	MLC	ND	MLC	ND	3,6	2,8	3,20	0,57
1	14,5	3,2	2,8	2,6	14	6	7,18	5,61
1,5	2,0	3,5	3,0	4,0	3,4	3,5	3,23	0,68
2	2,0	2,5	3,9	3,2	3,1	4,1	3,13	0,80
6	MLC	3,7	2,5	ND	MLC	3,2	3,13	0,60
10	2,4	15	3,5	ND	ND	4	6,23	5,89
24	5,8	3,0	3,7	ND	MLC	5	4,38	1,26
36	3,4	MLC	9	ND	ND	ND	6,20	3,96
48	ND	ND	ND	ND	MLC	ND	ND	-
96	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-

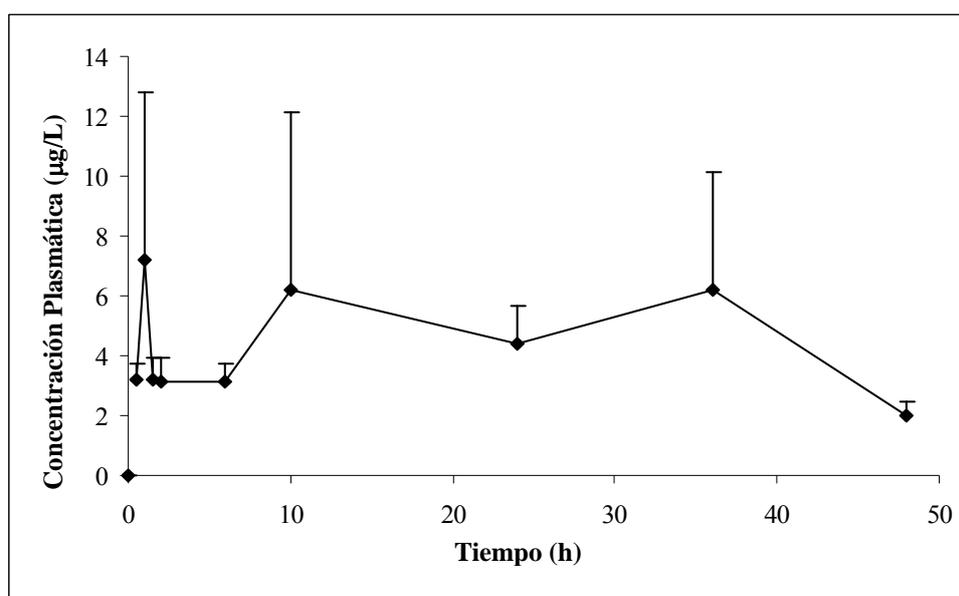


Figura IV.40. Evolución de las concentraciones plasmáticas (media \pm DE) frente al tiempo obtenidas tras la administración de clorpirifós a novillos por vía tópica a una dosis de 10 mg/kg.

El valor más elevado que se ha cuantificado en novillos ha sido de 14,5 µg/L, estando la mayoría de las concentraciones encontradas por debajo de 5 µg/L. La variación encontrada ha sido muy elevada, al igual que lo sucedido en los grupos anteriores.

En Tablas IV.23 a IV.27 que se muestran a continuación se presentan los principales parámetros que caracterizan el comportamiento cinético del clorpirifós en los individuos evaluados en el estudio. La amplia variabilidad encontrada en estos parámetros está evidentemente relacionada con la diversidad observada en las concentraciones plasmáticas, derivado todo ello de la vía de aplicación del antiparasitario.

Tabla IV.23. Parámetros farmacocinéticos que describen la disposición plasmática de clorpirifós luego de su administración tópica en terneros de 1 día de vida a una dosis de 10 mg/kg.

	Terneros 1 día		
	Media ± D.E.	Mediana	Rango
C_{\max} (µg/L)	13,02 ± 5,90	12,40	5,80 - 21,00
t_{\max} (h)	18,17 ± 14,50	15,00	1,00 - 36,00
AUC (µg·h/L)	356,83 ± 211,07	369,85	23,85 - 694,85
$AUMC$ (µg·h ² /L)	13379 ± 8096	12019	1008 - 15997
MRT (h)	25,60 ± 7,30	22,49	18,77 - 40,76

Tabla IV.24. Parámetros farmacocinéticos que describen la disposición plasmática de clorpirifós luego de su administración tópica en terneros de 7 días de vida a una dosis de 10 mg/kg.

	Terneros 7 días		
	Media ± D.E.	Mediana	Rango
C_{\max} (µg/L)	8,98 ± 3,28	9,50	3,50 - 12,70
t_{\max} (h)	14,00 ± 7,21	10,00	6,00 - 24,00
AUC (µg·h/L)	370,15 ± 160,74	381,05	140,90 - 615,30
$AUMC$ (µg·h ² /L)	12873 ± 8055	11790	3691 - 26420
MRT (h)	31,87 ± 7,37	31,24	22,85 - 42,93

Tabla IV.25. Parámetros farmacocinéticos que describen la disposición plasmática de clorpirifós luego de su administración tópica en terneros de 28 días de vida a una dosis de 10 mg/kg.

	Terneros 28 días		
	Media \pm D.E.	Mediana	Rango
C_{\max} ($\mu\text{g/L}$)	11,28 \pm 3,80	10,00	8,90 - 19,40
t_{\max} (h)	14,00 \pm 7,21	10	6,00 - 24,00
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	253,77 \pm 102,08	239,65	136,90 - 441,60
$AUMC$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{L}$)	4726 \pm 2209	4412	1847 - 7593
MRT (h)	18,10 \pm 3,47	16,99	13,49 - 24,47

Tabla IV.26. Parámetros farmacocinéticos que describen la disposición plasmática de clorpirifós luego de su administración tópica en toros a una dosis de 10 mg/kg.

	Toros		
	Media \pm D.E.	Mediana	Rango
C_{\max} ($\mu\text{g/L}$)	10,92 \pm 4,18	12,35	2,30 - 15,50
t_{\max} (h)	11,92 \pm 9,19	10,00	2,00 - 24,00
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	135,82 \pm 147,92	52,30	4,60 - 354,50
$AUMC$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{L}$)	2479 \pm 3233	267	46 - 7143
MRT (h)	11,96 \pm 6,43	10,00	4,71 - 21,56

Tabla IV.27. Parámetros farmacocinéticos que describen la disposición plasmática de clorpirifós luego de su administración tópica en vaquillonas a una dosis de 10 mg/kg.

	Vaquillonas		
	Media \pm D.E.	Mediana	Rango
C_{\max} ($\mu\text{g/L}$)	12,12 \pm 3,88	11,60	8,00 - 17,20
t_{\max} (h)	8,17 \pm 7,67	6,00	1,00 - 24,00
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	231,31 \pm 224,58	143,70	11,46 - 582,70
$AUMC$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{L}$)	5282 \pm 5936	2354	11,76 - 14790
MRT (h)	14,60 \pm 9,37	15,28	1,03 - 25,38

Tabla IV.28. Parámetros farmacocinéticos que describen la disposición plasmática de clorpirifós luego de su administración tópica en novillos a una dosis de 10 mg/kg.

	Novillos		
	Media \pm D.E.	Mediana	Rango
C_{\max} ($\mu\text{g/L}$)	10,42 \pm 4,34	11,50	4,00 - 15,00
t_{\max} (h)	8,42 \pm 12,76	1,25	1,00 - 36,00
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)	96,51 \pm 67,60	114,51	4,10 - 179,80
$AUMC$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^2/\text{L}$)	1591 \pm 1307	1629	5,90 - 3495
MRT (h)	11,74 \pm 8,47	12,03	1,09 - 22,50

No se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos evaluados en la máxima concentración plasmática (C_{\max}); así como tampoco en el tiempo necesario para alcanzarla (t_{\max}).

El AUC fue significativamente menor en los novillos respecto al registrado en los grupos de terneros de 1, 7 y 28 días de vida ($p < 0,05$).

En otro de los parámetros en los cuales se presentaron diferencias significativas entre los grupos es en el caso del área bajo un momento de la curva, el cual fue significativamente inferior ($p < 0,05$) para el grupo de los toros y los novillos, no difiriendo estos grupos entre sí.

En el tiempo medio de residencia se encontraron diferencias ($p < 0,05$) entre los terneros de 1 y 7 días respecto del resto de los individuos, ya que en estos animales de menor edad el MRT fue significativamente superior al resto.

IV.17.- Relación Farmacocinética-Farmacodinámica en bovinos de diferentes edades y sexo.

Tras la evaluación de la posible correlación que se podría establecer entre los principales parámetros farmacocinéticos (C_{\max} , t_{\max} , AUC y MRT) con la actividad inhibitoria máxima sobre las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa únicamente se ha observado una correlación estadísticamente significativa en el grupo de los terneros de un día de edad entre los parámetros farmacocinéticos C_{\max} y AUC y la inhibición máxima de la AChE, obteniéndose una Rho de Spearman igual a 0,943 ($p=0,005$) y 0,829 ($p=0,042$), respectivamente.

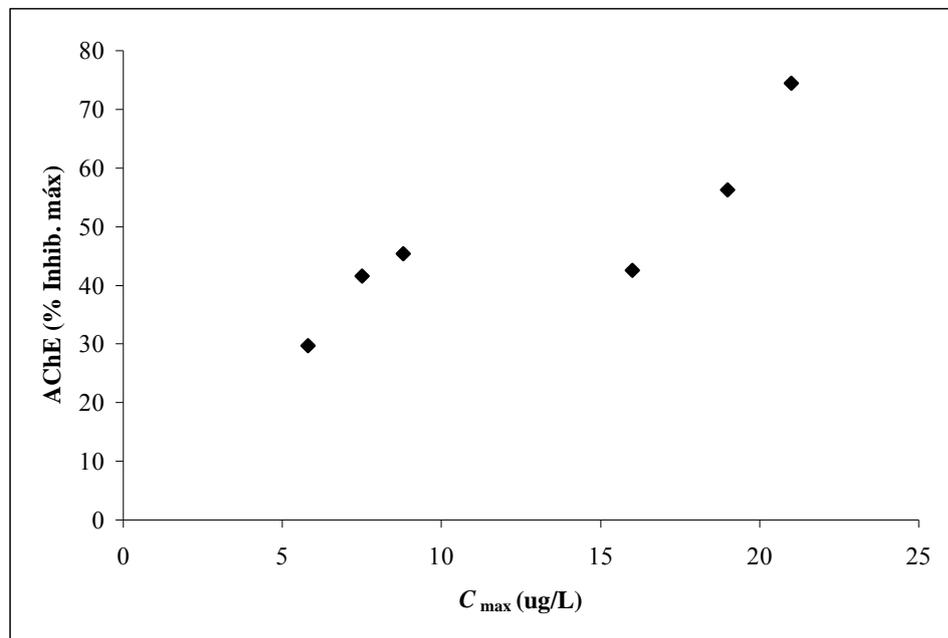


Figura IV.41. Correlación entre los valores obtenidos para el parámetro farmacocinético C_{\max} (µg/L) y el efecto inhibitorio máximo (%) de la actividad de la AChE dentro del grupo de los terneros de 1 día de edad (Rho de Spearman = 0,943, $p=0,005$)

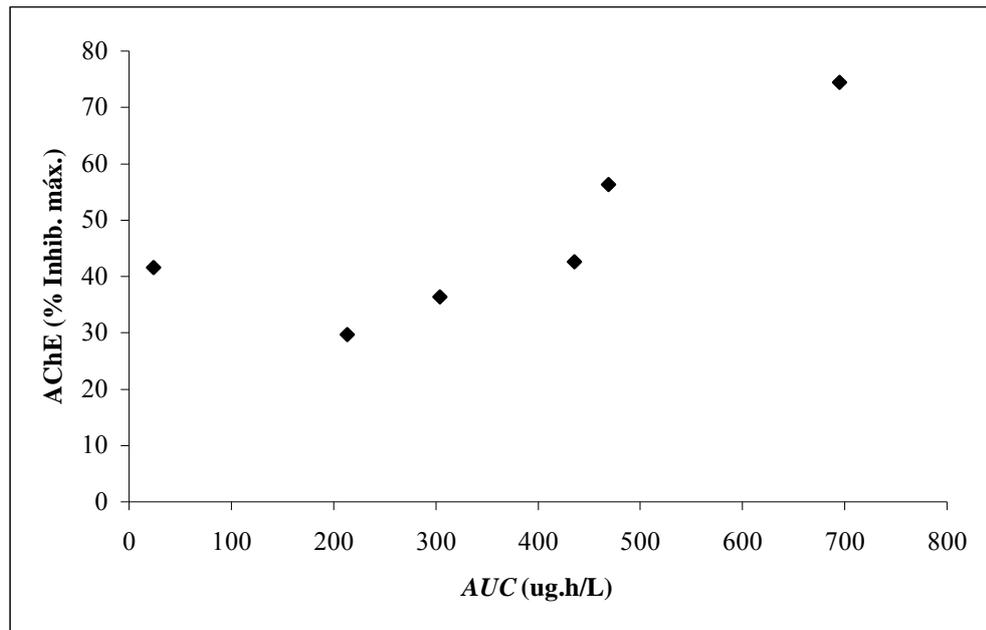


Figura IV.42. Correlación entre los valores obtenidos para el parámetro farmacocinético AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$) y el efecto inhibitorio máximo (%) de la actividad de la AChE dentro del grupo de los terneros de 1 día de edad (Rho de Spearman = 0,829, $p=0,042$).

IV.18. Signos clínicos y hallazgos de necropsia en terneros que manifestaron un cuadro de toxicidad tras la exposición al clorpirifós.

Los principales signos clínicos que presentaron los terneros consistieron en un ligero cuadro de depresión del sensorio, que en la mayoría de los animales se inició entre los días 3 y 4 post aplicación. El cuadro evolucionó con diarrea y deshidratación, seguido por trastornos respiratorios, consistentes en secreción mucopurulenta por ollares, rales pulmonares húmedos, disnea, tos y finalmente decúbito esternal. Dado el carácter irreversible del cuadro clínico, quince de éstos animales fueron sometidos a eutanasia.

Todos los terneros fueron tratados con antibióticos al momento de iniciar la signología digestiva, empleándose, enrofloxacina y eritromicina, además de terapia sintomática consistente en rehidratación oral y parenteral y la aplicación de carbón activado. El cuadro respiratorio fue tratado con penicilina y estreptomina, u amoxicilina, aplicándose además bromhexina y pseudoefedrina.

En algunos animales se presentó un cuadro de timpanismo gaseoso luego del suministro del sustituto lácteo, que obligó en algunos casos a la realización de una punción ruminal para facilitar la evacuación del mismo. Si bien este cuadro no se presentó en todos los animales, si se evidenció en 6 individuos. Datos recogidos de otros animales alimentados con la misma partida de sustituto no presentaron el citado cuadro de timpanismo.

Luego de la eutanasia los animales fueron sometidos a necropsia, por lo que la descripción de las lesiones que se repitieron sistemáticamente en todos los individuos constituye otra importante fuente de información.

En ningún caso se evidenció alteraciones en piel y anexos, así como tampoco a nivel de masas musculares.

En el aparato digestivo, en abomaso las principales lesiones encontradas consistieron en áreas anémicas con edema de submucosa. A nivel intestinal lo más

evidente fue una ligera hiperemia en duodeno con placas de peyer hipertrofiadas y en algunos casos mucosidad con pseudomembrana. A nivel de colon, se denotó hiperemia, congestión y pseudomembranas. Los ganglios mesentéricos en general estaban hipertróficos.

La principal alteración encontrada a nivel hepático fue una ligera congestión, en algunos casos en conjunción con otras áreas pálidas. En uno de los animales se identificó una deformación congénita y en otro individuo se presentó una leve hipertrofia hepática. En todos los individuos examinados, la vesícula biliar no presentó lesiones aparentes.

En pulmones se apreció edema intersticial, con áreas de enfisema, congestión y hepatización roja. Solo en un individuo se presentaron focos de bronconeumonía.

A nivel cardíaco no se encontraron lesiones importantes, sólo en algunos animales se evidenciaron signos de lipomovilización, a causa del estrés al que se vieron sujetos los animales, ya que como se describió previamente, la muerte se producía luego de una evolución desfavorable de 2 a 3 días.

En los riñones no se encontraron alteraciones de significativa importancia, ya que sólo se constató que tanto la médula como la corteza se presentaban zonas anémicas. En glándulas suprarrenales se evidenció hipertrofia de las capas medular y cortical, lo cual también pone en evidencia el estrés pre-muerte que presentaron los individuos.

El examen histopatológico reveló que en general las principales alteraciones halladas consistían en enteritis mononuclear con hiperplasia de nódulos linfocitos, en tanto que en pulmón, bazo, miocardio, riñón, adrenal e hígado se desarrollaba un moderado proceso congestivo sin cambios parenquimatosos. En músculo y glándulas tiroideas no se apreciaron lesiones. En uno de los animales examinados se encontró alveolitis aguda con congestión, edema alveolar y formación inicial de membranas hialinas, los riñones presentaban nefritis glomerular exudativa con importante daño tubular, en tanto que bazo, ganglio y adrenal no mostraron lesiones aparentes.

Discusión

V.- DISCUSIÓN

V.1.- Actividad enzimática basal.

V.1.1.- Participación de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en la actividad colinesterásica total.

La actividad basal de las enzimas acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa en sangre de las distintas categorías de animales utilizadas en los ensayos, así como el porcentaje de contribución de ambas enzimas en la actividad colinesterásica total son mostradas en las Figuras IV.6 y IV.7, respectivamente.

La actividad colinesterásica puede presentar una gran variabilidad debido al elevado número de factores que condicionan su actividad, por lo que estos deben ser tenidos en consideración, ya que el establecimiento de valores basales constituye una pieza clave en la evaluación de la exposición a estos pesticidas. Por un lado, existe una fuerte influencia de la especie, como se ha podido apreciar tras los estudios realizados en 15 especies de mamíferos, 44 especies aviares (Blakley y Yole, 2002) y en 11 especies de peces teleósteos (Chuiko, 2000). Si bien los valores obtenidos en nuestro estudio para los bovinos adultos son muy similares a los descritos por Pardío y col. (2001), debemos tener en consideración que incluso entre especies rumiantes se pueden observar diferencias, así, los bovinos poseen mayores niveles de actividad para esterases plasmáticas que las ovejas o las cabras; en cambio, otros herbívoros como los camellos presentaban una actividad aún menor a la de los rumiantes estudiados (Al-Qarawi y col., 2003). Incluso en animales pertenecientes a la misma Familia, Roy y colaboradores (2005) encontraron diferencias importantes; los autores han relacionado esas discrepancias con el tamaño del animal, ya que los valores más elevados de actividad se observaron en aquellas especies de menor peso corporal. También, en individuos sanos que se encuentran en el mismo estatus fisiológico (edad, peso, sexo) pueden existir variaciones relacionadas con el polimorfismo genético (Brock y Brock, 1993). Todo ello, nos lleva a la necesidad de estudiar diferentes aspectos que pueden afectar la actividad basal de estas enzimas, para poder establecer unos valores de referencia adecuados, algunos de los cuales serán abordados en los siguientes apartados.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que la principal actividad colinesterásica en los bovinos se manifiesta a nivel eritrocitario, ya que cuando se evaluó el promedio de todas las categorías, la actividad de AChE representa el $95,07 \pm 1,21\%$, correspondiendo el resto a la butirilcolinesterasa. Estos resultados están de acuerdo con los observados en bovinos por otros autores; así se han descrito valores de actividad colinesterásica eritrocitaria del 98,9% (Pardío y col., 2001), de 92,86% (Brem y col., 1985) y entre 91 al 96% del total sanguíneo (Abdelsalam y Ford, 1985).

Numerosos estudios demuestran que existen bajos niveles de actividad de colinesterasa plasmática en rumiantes (Silvestri, 1977; Mohammad y Omer, 1982; Osweiler y col., 1985; Mohammad y col., 1997; Al-Jobory y Mohammad, 2005; Mohammad y col., 2007b). Este comportamiento es bastante generalizado dentro algunas especies domésticas; sin embargo, existen algunas excepciones. En gatos la principal actividad colinesterásica en sangre se encuentra en plasma, siendo muy baja la actividad de esta enzima a nivel eritrocitario, en cambio, en caninos hay estudios que indican que entre el 40 al 60% de la actividad colinesterásica se presenta en plasma (Munro y col., 1991; Tecles y Cerón, 2001; Marable y col., 2007). En loros, la actividad de la AChE eritrocitaria sólo representa el 45% (Tully y col., 2003).

Nuestros resultados nos permiten reafirmar que en los bovinos la principal actividad colinesterásica se manifiesta a nivel eritrocitario, tal como sucede en las principales especies de rumiantes con interés zootécnico.

V.1.2.- Variabilidad interindividual en la actividad colinesterásica.

Al evaluar las variaciones registradas dentro de cada grupo utilizado en los diferentes ensayos, podemos concluir que los valores basales de actividad de ambas enzimas presentaron coeficientes de variación que fluctuaron, para la AChE entre el 8,04% en terneros de 28 días y el 17,20% en los toros, y para la BChE entre el 6,29% en vaquillonas y el 18,41% en terneros de 1 día de vida, con lo cual se evidencia que la mayor variabilidad fue independiente del grupo, puesto que para la AChE la mayor variación se presentó en los toros, y para la BChE en los terneros de menor edad.

Si bien estos resultados indican que en algunos grupos hay una amplia variación, este dato no escapa a lo encontrado previamente por otros autores, quienes describieron importantes diferencias en la actividad de las colinesterasas entre individuos de similares características (Rider y col., 1957; Wetstone y LaMotta, 1965; Sidell y Kaminskis, 1975; Lein y col., 1982; Abdelsalam y Ford, 1985; Lepage y col., 1985; Moses y col., 1986; Hzel, 1987; Khan y col., 1988; Brock y Brock, 1990; Munro y col., 1991; Thompson, 1999; Pardío y col., 2001). Así, Munro y colaboradores (1991) encontraron que las diferencias entre los valores más bajos y más altos en la actividad de colinesterasa eran de 30%, 40% y 37% para novillos, vacas y terneros, respectivamente. Otro claro ejemplo de variaciones interindividuales resulta de consignar que los valores que Lein y colaboradores (1982) reportaron como basales son 2 a 3 veces superiores a los que Osweiler y colaboradores (1985) y Palmer (1971) describieron como normales.

Este comportamiento determina que actualmente se considere imprescindible conocer el valor basal para cada animal, cuando se utiliza la actividad colinesterásica como indicador de exposición a un inhibidor de las ChE, y a partir del mismo se establece la inhibición que origina el OF (Meerdink y col., 1989; Munro y col., 1991; Halbrook y col., 1992; Thompson, 1999). Además, esta amplia variabilidad en la actividad de estas enzimas ha influido en el rango establecido para el diagnóstico de exposición a anticolinesterásicos.

De todos modos, es importante también tener en cuenta que además de conocer el valor basal, se debe emplear siempre el mismo método y el mismo laboratorio analítico, ya que Harlin y Ross (1990) encontraron que la diferencia de actividad colinesterásica de una misma muestra analizada por distintas personas dentro de un mismo laboratorio era de hasta un 5%, en tanto que la diferencia interlaboratorios era de hasta el 24%.

V.1.3.- Variabilidad intraindividual temporal en la actividad colinesterásica.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo indican que los animales adultos no han presentado variaciones significativas a lo largo de todo el período de muestreo, tanto en la actividad de BChE como de AChE, tal como lo refleja el análisis estadístico ($p > 0,05$). En el caso de butirilcolinesterasa el CV fue del $3,16 \pm 1,32\%$ y para la acetilcolinesterasa de $7,24 \pm 0,91\%$.

Este comportamiento es muy próximo al determinado previamente por Pardío y colaboradores (2001), ya que no observaron una modificación temporal en la actividad enzimática durante los 5 meses de estudio, obteniendo en ese periodo unos coeficientes de variación del 5,20 y 4,96% para butirilcolinesterasa y acetilcolinesterasa, respectivamente, al evaluar la actividad basal en 10 novillos. En ese mismo sentido, Halbrot y colaboradores (1992) no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad colinesterásica sanguínea determinada mensualmente durante un año en diferentes grupos de ganado lechero (toros, vacas, vaquillonas, novillos y terneros). Otros autores, en estudios de muy corta duración, también han demostrado que la actividad de la AChE eritrocitaria en 5 novillos cruce hereford no se modifica (Khan y col., 1988). Estos trabajos determinaban la actividad colinesterásica mediante el método Ellman.

Diferentes fueron los resultados obtenidos cuando se evaluó el comportamiento de la actividad enzimática en ganado de carne, para lo cual emplearon toros aberdeen angus y vacas, vaquillonas y terneros mestizos. Si bien encontraron que la actividad en los toros no presentaba alteraciones durante los 8 meses de muestreo, en los otros tres grupos la actividad colinesterásica disminuía en otoño y primavera para aumentar en invierno y verano (Halbrot y col., 1992). Cabe señalar que los toros utilizados para este ensayo no sólo eran de una raza distinta al de los otros tres grupos, sino que además provenían de otro establecimiento, lo cual podría explicar las diferencias en el comportamiento enzimático. Esta situación también había sido descrita anteriormente ya que en un trabajo previo, donde se evaluó la actividad enzimática en sangre mediante el método de diferencia de pH en 5 toros holstein durante un período de 90 horas, encontraron que entre el valor máximo y mínimo obtenido para cada animal existía una diferencia de entre el 19 y el 39%, con un valor promedio de 29% (Lein y col., 1982).

Aunque no quedan claras las razones que pueden influir en estas diferencias, sería importante tener en consideración las fases del año en la que se realizaron los estudios y la hora en la que se tomaron las muestras, ya que se ha demostrado en numerosos estudios la influencia de los ritmos circadianos y los cambios estacionales en la actividad de las esterasas (Thompson, 1999); sin embargo, esa información no se encuentra reflejada en todas las publicaciones expuestas en este apartado.

V.1.4.- Influencia de la edad en la actividad colinesterásica

Al evaluar como fluctúa la actividad de las enzimas en animales recién nacidos que no fueron expuestos al plaguicida no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la actividad de acetilcolinesterasa durante el tiempo en que los animales fueron muestreados, en tanto que cuando se analizaron los valores de actividad de butirilcolinesterasa en función del tiempo se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre lo hallado al día 1 de vida y el día 49 en adelante.

Ahora bien, cuando se comparó la actividad de AChE y BChE que presentaban los terneros al primer día de vida, a los 7 y 28 días con la que registraban los toros adultos, pudo observarse que tanto para AChE como para BChE se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Forslund y colaboradores (1983), quienes hallaron diferencias en la actividad colinesterásica cuando comparaban animales menores de 6 meses con los adultos, pero no cuando comparaban la actividad de AChE y BChE en bovinos adultos de entre 2,5 y 7 años de edad (Forslund y Björkman, 1983). Tampoco se obtuvieron diferencias al comparar la actividad colinesterásica en sangre entera entre novillos de más de 3 años de edad con novillos de menos de 2 años, y entre vacas adultas y vaquillonas (Halbrook y col., 1992). Brem y colaboradores (1985) y Abdelsalam y Ford (1985) también indicaron que los bovinos machos adultos presentaban mayor actividad colinesterásica que los terneros.

El hallazgo de que ambas enzimas no se comportan de modo similar, ya que como vimos a partir del día 49 en adelante comienzan a presentarse diferencias en el caso de BChE pero no para AChE, también ha sido descrito previamente, así la actividad de la butirilcolinesterasa era 2 a 3 veces superior en cabritos respecto a las madres, pero esas diferencias no se presentaban cuando se comparaba la actividad de la AChE (Mount, 1984). Es importante consignar que la mayor actividad de BChE plasmática en cabritos, respecto a los adultos también fue descrita por Brem y colaboradores (1985), constituyéndose en una excepción en el caso de los rumiantes de interés zootécnico. En algunas especies de aves paseriformes también se ha observado un comportamiento semejante, ya que la actividad de la BChE se incrementa paulatinamente en las primeras fases de vida, mientras que la tras la eclosión la AChE permanece constante (Mayack y Martín, 2003).

Nuestros resultados indican que la actividad colinesterásica se modifica en función de la edad de los bovinos, siendo notorias estas diferencias cuando se comparan animales menores de dos meses con adultos, ya que cuando se cotejan entre sí adultos mayores de 2 años, estas diferencias desaparecen.

Si bien en nuestro trabajo no se determinó la actividad de la colinesterasa cerebral, es importante resaltar que en estudios desarrollados en ratas, no sólo se evidenciaron diferencias en función de la edad para la AChE y BChE sanguínea, sino que también estas modificaciones se presentaron en la actividad de la AChE cerebral (Kousba y col., 2007), por lo cual sería factible suponer que tales discrepancias también se presenten en los bovinos, con las lógicas implicancias que esto tiene en la funcionalidad del sistema nervioso central.

La menor actividad enzimática en individuos jóvenes está documentada para un gran número de esterasas en diversos territorios orgánicos, tanto en especies mamíferas como aviares (Karanth y Pope, 2000, Thompson, 1999; Timchalk y col., 2006). Este hecho se ha relacionado con los procesos de maduración enzimática; así los animales precociales, que pueden alimentarse por sí mismos desde el nacimiento, sufren un incremento en la actividad de estas enzimas en la fase de embrión hasta la eclosión, de

modo que tras el nacimiento ya poseen los valores de adulto; sin embargo, este comportamiento no acontece en los animales altriciales (Thompson, 1999).

Abdelasalam y Ford (1985) observaron que la contribución de la AChE y la BChE a la actividad hemática total varía con la edad; en animales jóvenes la actividad en plasma llega a representar el 9% frente a un 4,7% en adultos, sin embargo en nuestro estudio las modificaciones que acontecen con la edad no alteran de forma importante la aportación de cada una de las enzimas a la actividad colinesterásica total (Figura IV.7).

V.1.5.- Influencia del sexo en la actividad colinesterásica

Al evaluar la influencia del sexo en la actividad colinesterásica se observó que existían diferencias en los niveles basales de la enzima acetilcolinesterasa, pero no en los de butirilcolinesterasa. Los toros evaluados en nuestro estudio llegan a tener un 30% más de actividad AChE que las hembras, este hecho debe tenerse en consideración como recomiendan Maul y Farris (2004), ya que puede suponer una fuente de error sustancial ya que algunos autores consideran que una inhibición del 20% puede ser relacionada como una evidencia de exposición a organofosforados.

Este comportamiento es semejante al reportado por Halbrook y colaboradores (1992) cuando compararon la actividad colinesterásica en sangre entera de vacas adultas, vaquillonas y toros, tanto en animales de raza de carne como de leche, ya que en todos los casos la mayor actividad colinesterásica se presentó en los toros. Un dato interesante a reseñar de ese trabajo fue el comportamiento de una de las vacas, la cual presentó un valor extremo, incluido dentro del rango considerado normal para los machos. Esta hembra, además de la elevada actividad colinesterásica, poseía características fenotípicas y etológicas masculinas, pudiéndose corroborar tras la realización de la necropsia que presentaba alteraciones histológicas tanto a nivel del ovario como en hipófisis, por lo que fue excluida del estudio. Es importante hacer hincapié en el hecho de que en el citado estudio la actividad colinesterásica se determinó en sangre entera y no se discriminó entre actividad plasmática y eritrocitaria, por lo que es posible que la alta actividad que se presenta en los glóbulos rojos enmascare cualquier otra posible diferencia entre los grupos de animales evaluados en el ensayo.

Este mismo comportamiento también se ha observado en caprinos, donde la actividad colinesterásica en eritrocitos era inferior en las hembras que en los machos enteros (Mohammad y col., 2005).

De todos modos, no todos los trabajos son coincidentes. En contraste con los resultados anteriores, Haufe (1965) encontró una mayor actividad de colinesterasa en la sangre de las vacas comparada con la que presentaban los toros y los novillos. Es importante consignar que en este trabajo se utilizaron un número muy bajo de animales, ya que el grupo experimental se componía de 2 vacas, 3 toros y un novillo.

Por otro lado, Mohammad y colaboradores (2005), al comparar la actividad colinesterásica entre bovinos machos y hembras, por un método potenciométrico, encontraron que la actividad de BChE era ligeramente superior en las hembras que en los machos, en tanto que no encontraron diferencias en la actividad de AChE. Hay que señalar que para la realización de este trabajo se muestrearon animales en la planta frigorífica, por lo que los animales utilizados en el ensayo no sólo eran de diferentes razas y condición corporal, sino que además provenían de diversos establecimientos, donde cada uno aplicaba su práctica de manejo, y no era posible discriminar si los animales habían sido tratados previamente con algún inhibidor de colinesterasa.

En otro estudio desarrollado por Ecobichon y Comeau (1973) encontraron que la actividad de la BChE plasmática en equinos, porcinos, caprinos, caninos, felinos, ratones, conejos y humanos no presentaba diferencias en función del sexo, situación que si se presentaba en ratas, donde la actividad en hembras era de entre 4 a 10 veces superior a la de los machos. Esta característica de estos roedores ha sido confirmada por Overstreet y colaboradores, (1979) y corroborada años más tarde por Chanda y colaboradores (1997). Otro aspecto que refuerza la influencia del sexo en la actividad de estas enzimas es que tras la ovariectomía se origina una reducción en la actividad colinesterásica plasmática (Overstreet y col., 1981).

Como hemos podido observar, existe una gran diversidad en los resultados obtenidos en los diferentes estudios que han abordado la influencia del sexo sobre la

actividad colinesterásica; aunque podemos señalar que existe una referencia generalizada al sexo como fuente de variación en la actividad de estas enzimas tanto en especies mamíferas como aviares. Buscando la razón de estas discrepancias, Maul y Farris (2004) indican que podrían estar relacionadas con las diferencias fisiológicas que se producen entre sexos, las cuales son más pronunciadas en los individuos que están en fase reproductora. Estos autores han confirmado que la misma especie sólo presenta diferencias ligadas al sexo cuando se encuentran en fase de cría.

En nuestro estudio, al comparar la actividad acetilcolinesterásica entre vaquillonas y machos castrados, no se encontraron diferencias entre ambos grupos. Nuestros resultados son diferentes a los obtenidos por Robbins y colaboradores (1958) y por Abdelsalam y Ford (1985), quienes encontraron una mayor actividad de colinesterasa eritrocitaria en novillos que en vacas. Es importante hacer notar que en este caso la comparación se efectuó empleando vacas de más de 2 años de edad, mientras que en nuestro estudio se emplearon vaquillonas de aproximadamente 18 meses. Sin embargo, cuando compararon la actividad de la enzima ChE en plasma, al igual que en nuestros resultados, encontraron que era ligeramente inferior en novillos que en vacas.

V.1.6.- Influencia de la orquiectomía en la actividad colinesterásica.

En nuestro trabajo hemos podido apreciar la influencia ejercida por la orquiectomía en la actividad basal de las enzimas evaluadas, ya que la actividad de la AChE y de la BChE fue superior en los machos enteros respecto a los castrados. Este efecto también ha sido descrito por Halbrook y colaboradores (1992) en ganado lechero, observando una disminución de actividad de la colinesterasa sanguínea ($p > 0.001$) de 3,50 a 2,50 $\mu\text{mol/mL/min}$ para animales enteros y castrados respectivamente. Este comportamiento podría ser hormono-dependiente; ya que previamente se había demostrado que la administración subcutánea de propionato de testosterona en toros provoca un incremento en la actividad de la colinesterasa sanguínea, la cual ya de por sí era superior a la que presentaba el grupo de novillos (Haas y col., 1983), lo que apoya nuestros resultados.

Sin embargo, el efecto de la castración puede tener unos efectos variables. Los resultados obtenidos en roedores son heterogéneos; algunos autores observan que en roedores machos no se encontraron diferencias en la actividad colinesterásica en eritrocitos y plasma entre individuos controles, gonadectomizados o tratados con testosterona (Agarwal y col., 1982). Sin embargo, también se ha observado que la actividad de la AChE puede llegar a reducir su actividad hasta un 40% en machos castrados (Godinho y col., 1987a), y este efecto puede ser revertido por el tratamiento con testosterona (Godinho y col., 1987b; Miranda y col., 1987). La relación de los niveles de colinesterasas con la actividad de las hormonas sexuales también se ha demostrado en ratas hembras, ya que la ovariectomía también origina modificaciones en los niveles de esterases plasmáticas en roedores (Overstreet y col., 1981).

V.1.7.- Influencia de la época del año en la actividad colinesterásica.

No hemos observado diferencias en la actividad de las enzimas colinesterásicas en novillos, determinada en dos épocas distintas del año. Debemos indicar que las condiciones climatológicas durante las dos fases del estudio estuvieron dentro de la media histórica para la provincia de Santa Fe.

Se han descrito resultados semejantes en animales de raza lechera, donde no encontraron diferencias en la actividad de estas enzimas en vacas, vaquillonas, toros y novillos en los que la actividad enzimática era evaluada mensualmente durante el período de un año. Es importante señalar que estos mismos autores realizaron este estudio también con bovinos de razas de carne, donde encontraron que en vacas, vaquillonas y terneros, la actividad enzimática presentaba una disminución en otoño y primavera, con un incremento en invierno y verano (Halbrook y col, 1992). Las razones de tales diferencias son desconocidas, pero hay que señalar que también se han descrito diferencias en los perfiles de ciertas enzimas (lactato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa) y hormonas (hormona de crecimiento e insulina) entre bovinos de raza de leche y de carne (Arai y col, 2003; Shingu y col., 2002; Kawashima y col., 2007). Estas diferencias fisiológicas entre estos dos tipos productivos podrían también afectar la actividad enzimática que evaluamos en nuestro estudio.

V.2.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en bovinos.

De la observación de los porcentajes de inhibición de las enzimas colinesterasas luego de la aplicación de clorpirifós, lo primero que puede evidenciarse es que en todos los grupos que hemos tratado se observa una importante inhibición de la actividad acetilcolinesterásica, ya que en los primeros 7 días post tratamiento supera el 30%, lo cual es coincidente con lo reportado por otros autores, no sólo para los bovinos, sino también en otras especies animales (Palmer y col., 1980; Lein y col, 1982; Haas y col., 1983; Scarratt y Blodgett, 1986; Pearson y col., 1986; Moser y col., 1998; Hooser y col., 1988; Mattsson y col., 2000; Timchalk y col., 2007).

Esta situación también se ha evidenciado para otros organofosforados, así la aplicación tópica de coumafós a novillos produjo una importante inhibición de ambas colinesterasas desde las 24 horas (Pardío y col., 2001) y en caninos desde las 6 horas post tratamiento (Tecles y col., 2000); esto también aconteció con la aplicación tópica de famfur en bovinos (Watson y Black, 1981); de malathión en bovinos, ovinos y caprinos y de diazinón en estas dos últimas especies, ya que la aplicación de este OF no modificó la actividad colinesterásica en bovinos tratados por vía tópica (Mohammad y col., 2007b). Los autores atribuyen esta última diferencia a que los organofosforados utilizados en el estudio se aplicaron a dosis terapéuticas y no tóxicas específicas para cada compuesto en cada especie concreta, a los métodos de aplicación de los fármacos y a la diferente susceptibilidad de la colinesterasa plasmática y eritrocitaria a estos anticolinesterásicos.

En nuestro estudio, ya desde el segundo día post exposición, la enzima que presentó mayor disminución en su actividad fue la AChE, llegando a presentar una inhibición del 77,96% en el caso de los toros a los 21 días post tratamiento, en tanto que el mayor porcentaje de inhibición de la enzima BChE, que también se presentó en toros, fue de 46,69% y se registró al cuarto día post tratamiento. En cambio, en seres humanos se ha observado que la administración tópica de clorpirifós (0,5 mg/kg) reduce la actividad de BChE en un 85% respecto a la de los controles, sin que los individuos presenten signos clínicos y sin que se observe modificación alguna en la actividad de AChE (Nolan y col., 1984); además se ha

visto que las personas encargadas de efectuar fumigaciones ambientales con clorpirifós presentaban valores inferiores de actividad de BChE que la población no expuesta, no encontrándose modificaciones en la actividad de AChE eritrocitaria, ni tampoco ningún signo clínico atribuible al contacto con el OF (Dyer y col., 2001). En base a esto, se podría concluir que la determinación de la actividad de BChE en plasma humano constituye una buena herramienta para evaluar la exposición a clorpirifós, pero no para corroborar un episodio de intoxicación (Chen y col., 1999). Recordemos que los seres humanos tienen en plasma tanto BChE como AChE, aunque esta última en muy baja proporción; de todos modos cuando se evalúa la actividad colinesterásica en sangre total la que predomina es la AChE debido a su amplia presencia en eritrocitos (Sidell y Kaminskis, 1975).

Marable y col. (2007) describen en cánidos que la BChE es más sensible a la inhibición por clorpirifós que la AChE, lo cual es coincidente con los resultados obtenidos cuando se determinó esta sensibilidad *in vitro* (Amitai y col., 1998). De todos modos hay que señalar que en el perro se presenta entre un 40 a un 60% de la actividad de ChE en eritrocitos, y el resto en plasma (Munro y col., 1991; Tecles y col., 2000).

Esta mayor sensibilidad de la enzima plasmática también se ha evidenciado en cánidos tratados con otros OF, ya que cuando estos animales fueron medicados con coumafós por vía tópica se encontró que la BChE es más sensible a la inhibición que la AChE en sangre entera, porque se inhibe en primer término y en mayor proporción (Tecles y col., 2000).

Un comportamiento más cercano al observado en nuestro trabajo es el descrito en el plasma de ratas tratadas por vía oral con clorpirifós, donde se inhiben prácticamente en la misma proporción tanto la AChE como la BChE (Ashry y col., 2002); recordemos que en esta especie ambas enzimas se encuentran presentes en el plasma en proporciones importantes (Chen y col., 1999; Çokuğraş, 2003).

Debido a esta diversidad en la respuesta, no se puede establecer un patrón de correlación entre el principal tipo de enzima hallada en la sangre de los animales y la enzima que presente el mayor grado de inhibición luego de la aplicación del organofosforado.

En rumiantes, Mohammad y colaboradores (2007b) sugieren que es preferible el uso de la determinación de la colinesterasa eritrocitaria frente a la plasmática debido a que alcanzan valores más elevados de inhibición tras la exposición a organofosforados. En su estudio, realizado con diversos anticolinesterásicos aplicados a dosis terapéuticas como en nuestra investigación, se aprecian valores máximos cercanos al 40% y al 20% para la AChE y la BChE, respectivamente. Aunque en nuestro trabajo, la afectación de la actividad enzimática, tanto en intensidad como en tiempo, fue mayor para la colinesterasa eritrocitaria, la alteración de la enzima plasmática también fue muy elevada.

Por un lado, podríamos sugerir que cualquiera de las dos enzimas podrían ser una buena alternativa para evaluar la exposición a estos compuestos. Sin embargo, por otro lado, el hecho de que la AChE haya sido la enzima que mayor y más rápida inhibición presentó en los bovinos empleados en nuestro ensayo no constituye un dato menor, puesto que es mucho más importante evaluar la actividad de la AChE que de la BChE, en primera instancia, porque el mecanismo de acción por el cual el clorpirifós ejerce su toxicidad es mediante la inhibición de la AChE en la sinápsis nerviosas y en segundo término porque en bovinos la mayor actividad colinesterásica en sangre periférica se presenta en la AChE eritrocitaria (van Gemert y col., 2001). Si bien el clorpirifós es capaz de inhibir la BChE plasmática, ésta enzima no participa de forma tan importante en la neurotransmisión, por lo tanto su inhibición prácticamente no genera efectos tóxicos, y al igual que en el caso de los humanos, su determinación es de utilidad a fin de constatar exposición a un compuesto organofosforado (Chen y col., 1999).

La dosis empleada puede generar un comportamiento diferencial en el porcentaje de inhibición colinesterásica en los distintos tejidos. Por ejemplo, en ratas se encontraron diferencias en el porcentaje de inhibición en eritrocitos, plasma, corazón y encéfalo, ya que cuando se aplicó por vía oral a dosis altas (5 mg/kg), las enzimas se inhibían de forma marcada sin importar la localización; a dosis intermedias (1 mg/kg) la mayor inhibición se presentó en eritrocitos y plasma, luego en corazón y en menor cuantía en encéfalo. A dosis bajas (0,3 mg/kg), sólo se inhibieron las enzimas en glóbulos rojos y plasma (Mattson y col., 2000). Además, en otro estudio realizado en este roedor por van Gemert y colaboradores (2001) se comprobó que el tratamiento con

clorpirifós por vía oral a una dosis de 10 mg/kg, causó una inhibición de la actividad de la AChE del 92% en eritrocitos, del 56% en corazón, del 41% en cerebro y del 39% en retina, sin que los animales presenten alteraciones en el comportamiento. Este mayor porcentaje de inhibición de AChE eritrocitaria se mantenía también cuando los animales eran tratados con dosis de 30 mg/kg, las cuales si generaban signos nerviosos.

Sin embargo, el efecto inhibitorio en perros no tuvo una dependencia tan clara de la dosis usada cuando se les administró clorpirifós por vía oral en la comida durante 4 semanas. Tras la determinación de la actividad de AChE y BChE en diferentes territorios orgánicos (eritrocitos, plasma, cerebro, aurícula y ventrículo derecho, diafragma y ganglios del sistema nervioso), se demostró que la actividad de BChE en plasma, cerebro y otros tejidos periféricos era igualmente inhibida sin importancia de la dosis, al igual que la AChE eritrocitaria; sin embargo, la AChE en cerebro y otros tejidos periféricos prácticamente no modificaba su actividad (Marable y col., 2007). Según estos autores, este comportamiento sugiere, que la AChE eritrocitaria es mucho más sensible que la AChE cerebral a la inhibición por clorpirifós en perros; pero también podrían existir razones de tipo cinético que justificaran estos hechos.

Por todo lo expuesto anteriormente, podemos justificar la elección llevada a cabo en nuestro estudio, al seleccionar la determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa y de la butirilcolinesterasa en sangre como indicadores de exposición a organofosforados; ya que, independientemente de la dosis aplicada, su actividad siempre disminuye ante la exposición a un compuesto inhibidor de las colinesterasas.

También es importante destacar el prolongado período de tiempo que resultaron inhibidas las enzimas, fundamentalmente la AChE, que incluso a los 120 días post tratamiento presentaba una inhibición del $34,02 \pm 14,01\%$ en los toros. Lo acontecido en los terneros merece una consideración especial, puesto que en ellos la AChE también presentaba una importante inhibición hasta el día 120 post tratamiento, pero hay que aclarar que el número de individuos muestreado no es representativo, ya que sólo se pudieron examinar 3 animales hasta esa fecha. En lo referente a la BChE, si bien en los toros también poseía una menor actividad enzimática a los 120 días respecto a los valores basales, los porcentajes de inhibición ($12,89 \pm 8,17\%$) eran menores que los de la AChE.

Aunque son muy pocos los trabajos que estudian la actividad colinesterásica en bovinos expuestos a clorpirifós, encontramos que, en un artículo en el que se describe un episodio de intoxicación en toros tratados por vía tópica con dosis de 20 mg/kg de un preparado comercial a base de clorpirifós, la actividad colinesterásica en sangre a los 4 días post tratamiento se encontraba disminuida entre un 75 y 85% respecto a la actividad que presentaban los otros animales del rodeo no expuestos al clorpirifós. A las 5 semanas la actividad colinesterásica se incrementaba, ya que solamente era entre un 30 y un 55% menor que el valor que presentaban los otros animales de la cabaña (Scarratt y Blodgett, 1986). Haas y colaboradores (1983) describen resultados similares, ya que en los toros tratados con clorpirifós (20 mg/kg) por vía tópica a los 30 días post tratamiento la actividad colinesterásica sólo representaba un 35% del valor basal. Recordemos que en nuestros toros la actividad promedio de AChE a los 4 días era de $53,77 \pm 4,94\%$ y a los 28 días $69,94 \pm 6,29\%$, siempre comparada con el valor basal previo a la exposición. Si bien los porcentajes de inhibición enzimática fueron similares a reportados por otros autores, en nuestro estudio se requirió un mayor período de tiempo para producirse la mayor inhibición, lo cual podría estar ocasionado por la forma farmacéutica empleada.

En la misma línea se encuentra el comportamiento observado en llamas, cuando se administra clorpirifós (25 mg/kg) por vía tópica. La actividad de la BChE descendió en promedio al 38 y 62% del valor basal al quinto y octavo día post aplicación, siendo necesarios entre 36 a 48 días para que la actividad colinesterásica recupere el 90% de la actividad basal (Pearson y col., 1986).

Una situación parecida se presenta con otros OF, así la aplicación tópica de famfur en bovinos provocó una importante inhibición en las colinesterasas sanguíneas, requiriéndose por lo menos 42 días para que retornen a los valores previos al tratamiento (Watson y Black, 1981). En otro estudio desarrollado en búfalos se comprobó que la administración oral de fosfamidón inhibe la actividad de AChE y BChE ya a las 12 horas post administración en un 66%, recuperando su valor normal a los 28 días (Awal y col., 1988).

En los felinos, el clorpirifós administrado por vía oral también origina una inhibición colinesterásica significativa, recuperándose lentamente la actividad a partir del séptimo día post tratamiento, para no encontrarse diferencias en la actividad desde el día 28 en adelante. Además, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la AChE y de la BChE entre los gatos que presentaron signos clínicos de toxicidad respecto a los que no tuvieron signología (Hooser y col, 1988).

La aplicación de clorpirifós en dosis altas (279 mg/kg) por vía subcutánea en ratas también provocó una prolongada e intensa inhibición de la actividad colinesterásica a nivel de corteza cerebral, 94-96% a los 2 semanas post tratamiento, manteniéndose inhibida en forma significativa hasta las 6 semanas. Es importante señalar que a pesar la gran inhibición colinesterásica, los animales presentaron muy pocos signos clínicos y el grado de inhibición de la ChE en el plasma siempre fue mucho menor a la registrada en la corteza (Pope y col., 1992).

Por su parte, Bushnell y colaboradores (1993) también ratifican estos resultados, ya que al administrar clorpirifós por vía subcutánea en ratas a dosis más bajas que las usadas en el estudio anterior (60 o 125 mg/kg), encontraron que a los 4 días el porcentaje de inhibición de ChE en la sangre entera fue de entre el 60 al 75%, dependiendo de la dosis. La actividad retornaba lentamente a la normalidad, no encontrándose diferencias respecto al grupo control al día 53 cuando se empleó la dosis de 60 mg/kg y al día 74 cuando se administró la dosis más alta. Estos autores atribuyeron la prolongada inhibición colinesterásica al hecho de que el fármaco fue formulado en una base oleosa, la cual podría liberar lentamente el clorpirifós a la circulación general. Además en ratas, el clorpirifós se metaboliza rápidamente a clorpirifós-oxón tras su administración oral, siendo el aclaramiento del metabolito mucho más lento, por lo que presenta una semivida de eliminación de entre 12 a 18 h (Abdel Rahman y col., 1993).

Abu-Qare y Abu-Donia (2001) indican que luego de la aplicación tópica de clorpirifós en ratas (30 mg/kg) la actividad de BChE en el plasma alcanzaba el 58% del valor basal a las 96 horas post aplicación, después de haber disminuido hasta

aproximadamente el 40% a las 24 h posteriores al tratamiento. También se observó en el plasma de ratas tratadas por vía oral con clorpirifós (50 mg/kg) un alto porcentaje de inhibición (90% tanto para la AChE como la BChE) al inicio del tratamiento; mientras que en la muestra tomada a las 94 h post administración el porcentaje de inhibición de ambas enzimas era superior al 70%. Lamentablemente el estudio no contempló la prolongación del tiempo de muestreo, posiblemente también en este caso la inhibición de la actividad colinesterásica sería prolongada (Ashry y col., 2002).

Todos estos trabajos justifican la necesidad de desarrollar un protocolo de muestreo extendido en el tiempo a fin de poder evaluar correctamente la actividad de las enzimas colinesterásicas en animales tratados con OF por vía tópica; ya que como hemos expuesto en los párrafos anteriores, es necesario un periodo de tiempo relativamente largo (3-4 meses) para recuperar la actividad colinesterásica basal tras una aplicación *pour-on*.

En nuestro caso, la prolongada inhibición podría ser atribuida al efecto reservorio que se presenta luego de la aplicación tópica del fármaco, tal como fue demostrado en el trabajo desarrollado por Griffin y colaboradores (2000), quienes concluyen que en humanos entre el 56 y el 66% del clorpirifós aplicado por vía tópica se mantiene sobre la superficie cutánea durante 24 horas, y que una alta proporción del fármaco es retenido en el estrato córneo de la piel y desde allí es liberado a la circulación general por un prolongado período de tiempo. Estos resultados fueron también corroborados por Meuling y colaboradores (2005), quienes demostraron que a pesar de efectuar el lavado de la superficie cutánea 4 h después de haber realizado un tratamiento con clorpirifós, continúan encontrando la presencia del metabolito TCP en orina a las 120 h post tratamiento, lo cual podría obedecer a que el fármaco madre se retiene entre las capas de la epidermis. Otro factor que podría justificarlo es la permanencia de los metabolitos, si es que en rumiantes se observara el mismo comportamiento que en humanos, dado que en esta especie la semivida de eliminación de los metabolitos dialquilo fosfato, es decir dietilfosfato y dietiltiofosfato, fue de 15,5 h tras la aplicación oral de clorpirifós frente a 30 h tras la administración tópica, lo que reforzaría la hipótesis del “efecto reservorio” de la piel (Griffin y col., 1999).

V.2.1.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en bovinos de diferentes edades

Al observar los porcentajes de inhibición en la actividad colinesterásica que presentaron los animales de diferentes edades luego de la aplicación de clorpirifós por vía tópica puede evidenciarse que en todos los grupos se presentó una marcada inhibición en la acetilcolinesterasa desde el segundo día en adelante. El mayor porcentaje de inhibición de la enzima AChE ($77,96 \pm 8,74\%$) se observó en los toros a los 21 días post tratamiento, en tanto que la mayor inhibición de la BChE se alcanzó al cuarto día ($46,69 \pm 3,81\%$), también en el grupo de los toros. Esta mayor inhibición en los adultos podría ser atribuida, tal como lo hicieron Dalvi y colaboradores (2004), a la mayor actividad basal de la enzima en este grupo etario y por ende a la mayor cantidad de sitios disponibles para la unión con el clorpirifós-oxón.

Es de destacar que a pesar de la alta inhibición en la actividad de ambas enzimas, ninguno de los toros manifestó signos clínicos compatibles con intoxicación por organofosforados. Si bien en este grupo la actividad colinesterásica presentó valores menores a los basales aún al día 120 post tratamiento; en ese último muestreo, ya se hace evidente la tendencia alcista en la actividad colinesterásica.

Lamentablemente, la mayoría de los terneros tratados presentaron signos de intoxicación y murieron entre los 6 y 21 días post tratamiento, por lo que no contamos con los datos de todo el periodo de muestreo para todos los animales de estos tres grupos. Sólo hemos tenido un número suficiente de animales para realizar el estudio estadístico hasta el día 15 post tratamiento. Hasta este tiempo de muestreo no se evidenciaron inhibiciones significativas en la actividad de la BChE, aunque si se afectó la respuesta de la AChE originando una inhibición $<60\%$. Desde el día 21 en adelante los terneros que sobrevivieron presentaron una disminución en la actividad de la AChE que incluso se aproximó al valor registrado en los adultos ($\approx 70\%$).

En los terneros que se vieron afectados por la exposición al clorpirifós, los primeros signos clínicos comenzaron a presentarse entre el tercer y cuarto día post aplicación, iniciándose con un ligero cuadro de depresión que evolucionaba con diarrea

y deshidratación. Los que superaron el cuadro digestivo, manifestaron problemas respiratorios, consistentes en secreción mucopurulenta por ollares, rales pulmonares húmedos, disnea, tos y finalmente decúbito esternal. Estos signos clínicos son similares a los descritos en otros casos de intoxicación por clorpirifós (Palmer y col., 1980; Lein y col., 1982; Haas y col., 1983; Scarratt y Blodgett, 1986; Meerdink, 1989).

Fueron muy llamativos los cuadros de timpanismo gaseoso que presentaron 6 animales luego del suministro del sustituto lácteo, y que obligó en algunos casos a la realización de una punción ruminal para facilitar la evacuación del mismo. Cuadros similares de timpanismo post prandial son sumamente raros en terneros, salvo en aquellos afectados por patologías previas; sin embargo, esta situación ya ha sido descrita previamente por otros autores en toros intoxicados por clorpirifós, circunstancia en la que es muy característico el cuadro de meteorismo asociado al éstasis ruminal (Lein y col., 1982; Haas y col., 1983; Pearson y col., 1986; Scarratt y Blodgett, 1986).

Las lesiones halladas en la necropsia, tanto macroscópicas como microscópicas, son coincidentes con las que describe la literatura, ya que los cambios patológicos asociados al envenenamiento agudo por insecticidas organofosforados son generalmente mínimos e inespecíficos, y las principales alteraciones encontradas, como gastroenteritis hemorrágica, edema pulmonar y degeneraciones en hígado y riñón, son consecuencia de la hiperactividad del sistema nervioso autónomo parasimpático (Buck y col., 1981; Hooser y col., 1988; Meerdink, 1989; Humpreys, 1990).

En un trabajo previo, desarrollado por Palmer y colaboradores (1980) se evaluó el efecto de la edad en la sensibilidad a padecer episodios de intoxicación por clorpirifós, utilizando terneros de entre una y dos semanas de edad tratados con un baño por aspersion con 4 litros de una emulsión de clorpirifós a diferentes concentraciones (0,02; 0,06 y 0,12%) y por otro lado terneros de entre 4 y 6 meses de edad tratados con el mismo volumen de preparado farmacológico, pero a concentraciones de 0,25%; 0,5; 0,9 y 2,3%. Los animales más jóvenes fueron los más sensibles, lo cual se demuestra por los signos de toxicidad que presentaron aquellos individuos tratados con la emulsión del 0,12%, que incluso ocasionó la muerte a uno de ellos, y la completa ausencia de

signos de toxicidad en el grupo de mayor edad que fue expuesto a una concentración de plaguicida 7,5 veces más alta. En lo que respecta al grado de actividad enzimática, en este caso se determinó la ChE en sangre entera por un método electrométrico; el mayor porcentaje de inhibición se registró en los individuos de 1 a 2 semanas tratados con una concentración de clorpirifós de 0,12%. En estos individuos la actividad colinesterásica fluctuó entre el 3 y el 11% del valor basal. En los que fueron tratados con la menor concentración (0,02%), la actividad estuvo entre el 15 y el 41% del valor basal. Independientemente de la edad de los individuos, el efecto máximo de inhibición se registró entre 2 y 4 días posteriores a la aplicación. Si bien las dosis empleadas en nuestro estudio fueron casi la mitad de las empleadas por Palmer, la mayor toxicidad evidenciada en nuestro caso podría deberse a la forma medicamentosa empleada, ya que en nuestro caso fue una solución oleosa y en la otra una emulsión acuosa.

Una situación similar también fue descrita en cerdos, donde la aplicación de clorpirifós en forma de spray al 2,5% en lechones de 3 y 6 horas de vida les ocasionó una severa intoxicación. A las 12 h post exposición los animales presentaron debilidad, letargia, ataxia, decúbito lateral, movimientos de pedaleo, tremor muscular, disnea, sialorrea y diarrea. Todos estos animales fueron sometidos a eutanasia debido a la severidad del cuadro clínico. Cuando el mismo esquema de dosificación se aplicó a cerdos de 24 y 36 horas de vida, los resultados fueron ligeramente diferentes, ya que si bien todos los lechones de 24 horas de vida manifestaron signos de toxicidad, 2 de los cinco individuos tratados se recuperaron, en tanto que sólo uno de los 3 cerdos de 36 horas de vida presentó signos de intoxicación, de la cual se recuperó unas horas más tarde (Scheidt y col., 1987). La alta sensibilidad de los cerdos neonatos al clorpirifós también fue reportada por Long y colaboradores (1986), quienes encontraron que los cerdos expuestos poseían una menor actividad de colinesterasa tanto en sangre como en sistema nervioso central.

Varios investigadores han demostrado que las ratas jóvenes son mucho más sensibles a la exposición del clorpirifós que los animales adultos (Pope y col., 1991; Whitney y col., 1995; Atterberry y col., 1997; Moser y col., 1998), situación que ha sido también comprobada para otros organofosforados (Singh y Rishi, 2005).

Cuando se evaluó en ratas adultas y neonatos la relación existente entre la dosis que provoca el 50% de inhibición en la actividad de la AChE cerebral y la dosis más alta que se puede tolerar sin que se presente toxicidad, se encontró que la menor dosis que produce el efecto letal genera un mayor porcentaje de inhibición de AChE en las ratas adultas comparada con la se presenta en los neonatos, ya que la dosis necesaria para producir el efecto letal en las ratas adultas era 6 veces más alta que la requerida para ocasionar este efecto en los neonatos, en tanto que la dosis que provoca el 50% de inhibición de la AChE cerebral en neonatos es sólo dos veces menor a la que conduce a este efecto en adultos (Pope y Liu, 1997). Estos resultados son sumamente importantes ya que podrían justificar en parte el comportamiento observado en nuestro estudio, puesto que en los animales jóvenes la inhibición colinesterásica fue menor que en los adultos, pero los episodios de intoxicación acontecieron sólo en los neonatos.

Un dato interesante surgió de comparar la inhibición colinesterásica entre roedores neonatos y adultos expuestos al clorpirifós en dos esquemas distintos de tratamiento. En uno de ellos las ratas eran expuestas a pequeñas dosis de clorpirifós por periodos prolongados de tiempo y en el otro se trataban con dosis altas pero en forma aguda. En este estudio nuevamente se comprobó que las ratas jóvenes eran más sensibles que las adultas, pero lo llamativo fue que cuando el tratamiento era prolongado, la mayor inhibición colinesterásica se presentaba en las ratas adultas (Zhao y col., 2005). Dado que en nuestro caso el preparado fue aplicado por vía tópica, y como ya se mencionó anteriormente, la piel puede comportarse como un reservorio del fármaco desde donde se va liberando lentamente simulando a una administración prolongada, se podría inferir que la mayor inhibición colinesterásica que se presentó en los bovinos adultos podría obedecer en parte a la misma circunstancia que la descrita en ratas.

Respecto de los posibles mecanismos que se han postulado para explicar estas diferencias en la susceptibilidad a padecer un cuadro de intoxicación luego de la aplicación de clorpirifós, las mismas podrían obedecer a diferencias farmacodinámicas o farmacocinéticas debidas a las diferencias anatómo-fisiológicas que acontecen en la evolución del individuo, tal como se detalla a continuación.

Por un lado, se ha descrito que los niveles de la enzima AChE pueden variar en todos los tejidos o en algunos en particular en función de la edad del individuo, ya que los niveles más importantes de colinesterasas se presentan en ratas adultas respecto a las jóvenes. Además de las modificaciones que se producen en las colinesterasas sanguíneas, como hemos abordado especialmente en el apartado V.1.4., el efecto que originan a nivel central posee una gran importancia para justificar la toxicidad que ocasionan estos compuestos. Así, Atterberry y colaboradores (1997) determinaron que la actividad de la AChE en la corteza cerebral se incrementaba cuatro veces a lo largo de los primeros 80 días de vida, en tanto que no encontraban diferencias a nivel medular. Mortensen y colaboradores (1998) también detectaron una menor actividad de AChE cerebral en las ratas de 4 días y 11 días de vida comparada con los adultos, ya que a ese tiempo la actividad de la enzima representaba el 54 y 81% de la actividad de los adultos, respectivamente.

De todos modos, hay que tener en cuenta que si bien la mayoría de los estudios de determinación de la actividad colinesterásica cerebral se efectúan empleando animales de laboratorio, fundamentalmente ratas, el tiempo de desarrollo cerebral es diferente del que presentan las especies superiores, así según un trabajo desarrollado por Bayer y colaboradores (1993) se establece que el desarrollo cerebral de un feto humano de entre 3,5 a 4 semanas de gestación es equivalente al que presenta una rata de 1,6 semanas de gestación; en tanto, el desarrollo cerebral de una rata de 3 semanas de vida es equivalente al que presenta un humano recién nacido.

Si bien no hay datos que valoren la actividad de AChE cerebral en humanos, la actividad de AChE en eritrocitos es casi dos veces más alta en individuos de 1 año de vida respecto a los neonatos (Ecobichon y Stephens, 1973). En otro estudio se encontró que la actividad de AChE en eritrocitos humanos era menor en individuos de entre 1 y 8 semanas de vida respecto a los adultos (Karlsen y col., 1981).

Como hemos mencionado anteriormente, existen numerosos trabajos que encuentran valores de actividad basal menores en animales jóvenes que en los adultos, no sólo en sangre sino también en SNC (Ecobichon y Stephens, 1973; Karlsen y col., 1981; Atterberry y col. 1997; Mortensen y col., 1998). Entonces, posiblemente, si la

menor actividad encontrada en nuestro trabajo en las colinesterasas sanguíneas estuviera relacionada con un menor valor en SNC, podría este ser un factor predisponente para que los neonatos desarrollen mas fácilmente un cuadro de toxicidad luego de ser expuestos al OF.

Al margen de estas diferencias en los niveles de las enzimas colinesterásicas, hay que destacar que si bien en algunos estudios se había indicado que la divergencia en la toxicidad del clorpirifós entre animales jóvenes y adultos no era ocasionada por diferencias en la sensibilidad de la AChE a la inhibición (Mortensen y col., 1996; Mortensen y col, 1998; Karanth y Pope, 2003, Vidair, 2004), otros investigadores han reportado cambios en la constante de inhibición (k_i) que vincula la unión de clorpirifós-oxón (CPO) con la AChE cerebral en función de la edad de los individuos. Dos posibles causas de estas diferencias podrían ser, por un lado la presencia de proteínas en el homogenizado de cerebro que actúen modificando la afinidad *in vitro* del CPO por la AChE, o bien modificaciones en los sitios de unión periféricos de la AChE en función de la edad (Kousba y col., 2007).

La alternativa de que el CPO interactúe con proteínas secundarias que modifiquen la afinidad del CPO por la AChE es factible, en tal sentido Murphy (1982) sugirió que la menor toxicidad que presentaban las ratas adultas podía deberse en parte a la alta unión de los oxones en tejidos no críticos y, por otro parte, a las diferencias en las tasas de detoxificación diferencial en función de la edad. Del mismo modo, Mortensen y colaboradores (1998) demostraron que la concentración de proteínas cerebrales se incrementaba de un 7 a un 11,5% entre los días 4 a 90 post nacimiento.

El hecho de que las diferencias en la toxicidad del CPO estén asociadas a la participación del sitio de unión periférico de la molécula de AChE es también posible, ya que, por ejemplo, se ha comprobado que este sitio modifica la inhibición de la ChE en función de la concentración de CPO (Kousba y col., 2004). De todos modos, son necesarios nuevos estudios a fin de poder confirmar fehacientemente este postulado (Kousba y col., 2007).

Aunque la bibliografía consultada no sugiere posibles diferencias en la tasa de reactivación espontánea de la colinesterasa luego de ser fosforilada, existen reportes que indican que la síntesis de proteína cerebral es más rápida en la etapa post natal temprana para luego declinar a medida que avanza la edad. En base a esto, algunos autores indican que la diferencia en la tasa de recuperación en la actividad colinesterásica en función de la edad dependería en realidad de diferencias en la tasas de biosíntesis de nuevas moléculas (Chakraborti y col., 1993). En ratas preñadas, tratadas por vía tópica con clorpirifós a una dosis de 50 mg/kg, se produce un similar porcentaje de inhibición de la AChE y BChE cerebral y plasmática en el feto y en la madre, pero en el feto la recuperación de la actividad enzimática es más rápida. Esto fue atribuido a que la velocidad de síntesis de nueva enzima es superior en el feto (Ashry y col., 2002), lo cual también es coincidente con lo descrito por Moser y Padilla, (1998), Abu-Qare y colaboradores (2001) y Abu-Qare y Abou-Donia, (2001).

Otra de las posibles explicaciones se sustenta en principios de farmacocinética, ya que la vía de ingreso del compuesto es un factor crítico en determinar la extensión de la inhibición de las colinesterasas y de la presencia o no de intoxicación. Luego de la aplicación tópica, la velocidad de ingreso del fármaco al plasma es baja, lo cual determina que sea poca la cantidad de fármaco presente en sangre, donde las enzimas plasmáticas pueden ya ir metabolizándolo en CPO (Sultatos y col., 1985).

Relacionando los conceptos anteriores con nuestros resultados, podemos indicar que el CPF posee una absorción más rápida en animales jóvenes que en adultos ya que a los 15 minutos post administración se detectó la presencia del fármaco en algunos terneros, mientras que en los machos adultos, la primera concentración cuantificable de clorpirifós se registró a los 90 minutos post aplicación. Estas diferencias en el tiempo de latencia podrían estar causadas por la diferente permeabilidad cutánea que se presenta entre jóvenes y adultos (Kielhorn y col., 2006).

Al comparar los grupos no se observaron diferencias en el tiempo necesario para alcanzar la máxima concentración plasmática ($t_{m\acute{a}x}$) ni tampoco en el valor de la máxima concentración plasmática ($C_{m\acute{a}x}$), la cual fue sumamente baja ($<15 \mu\text{g/L}$) en todos los animales, presentando además una gran variación individual. Este comportamiento es

muy semejante a lo descrito luego de la aplicación tópica de clorpirifós en humanos (Nolan y col., 1984).

Moser y col., 1998, argumentaron que la edad podía influir en la distribución del CPF en el SNC, lo que justificaría la diferente toxicidad observada entre los distintos grupos etarios. Los autores indicaron que los animales jóvenes podrían tener una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo cual permitiría al clorpirifós alcanzar el SNC rápidamente, antes de ser detoxificado por las enzimas sanguíneas y por tanto inhibir a las colinesterasas. Ellos observaron que en ratas adultas la inhibición de la ChE sanguínea era casi completa mientras que la inhibición de la ChE en SNC era prácticamente insignificante; sin embargo, en ratas jóvenes se encontró que los valores de actividad que presentaban eran prácticamente similares.

La permeabilidad de la barrera hematoencefálica disminuye en la mayoría de los mamíferos a partir del primer día de vida, por lo tanto se podría inferir que el clorpirifós o su metabolito oxón, alcanzan una mayor concentración en el sistema nervioso central de los neonatos que en el de los adultos, y por lo tanto producen una mayor inhibición enzimática. De todos modos es importante señalar que al ser el clorpirifós un compuesto sumamente liposoluble esas diferencias de permeabilidad se reducen, aunque continuarían presentándose, tal como se ha reportado para otros fármacos muy liposolubles como la morfina y el pentobarbital (Nouws, 1992).

Otro factor que también podría estar participando es la expresión diferencial entre adultos y jóvenes de bombas de expulsión, como la glicoproteína P. En ratas, la expresión de esta glicoproteína es dependiente de la edad, así se ha podido observar que se incrementan sus niveles de actividad hacia el día 6 en riñones, al día 20 en pulmón e hígado y al día 30 post nacimiento en corazón y cerebro (Rosati y col., 2003). De este modo, la mayor expresión de la glicoproteína P en el cerebro de los animales adultos podría facilitar la eliminación de diferentes xenobióticos del sistema nervioso, e impediría que se concentre en el SNC. Este mecanismo se ha descrito para la ivermectina, la cipermetrina y el endosulfán, sin embargo parece que no afecta al clorpirifós, dado que el verapamil, fármaco inhibidor de esta proteína de eflujo, es capaz de incrementar la toxicidad de los tres primeros pero no afecta a nuestro compuesto

(Buss y col., 2002). Sin embargo, Lanning y colaboradores (1996) también observan que el clorpirifós no está implicado en este proceso pero si su metabolito; ellos describen que el clorpirifós-oxón puede interactuar con la glicoproteína P, de forma que apoya la hipótesis de que esta proteína juega un papel importante en la desintoxicación de estos insecticidas en los tejidos de los mamíferos.

Si bien no hemos encontrado diferencias en función de la edad en la máxima concentración plasmática, en el tiempo requerido para alcanzarla y en el área bajo la curva, si se presentaron diferencias en el tiempo medio de residencia del fármaco, el cual fue superior en los terneros ($25,60 \pm 7,30$; $31,87 \pm 7,37$ y $18,10 \pm 3,47$ h para animales de 1, 7 y 28 días de vida) respecto a los adultos ($11,96 \pm 6,43$ h), y por lo tanto podría también explicar la mayor toxicidad que presentó este grupo.

Son varios los autores que han encontrado diferencias en el metabolismo entre ratas jóvenes y adultas. Así algunos reportan que las jóvenes tienen una menor capacidad metabólica, específicamente en lo referido a la actividad del sistema microsomal hepático P450 (Macleod y col., 1972; Imaoka y col., 1991), en tanto que particularmente referido a los organofosforados se ha descrito una menor activación en oxones en las ratas jóvenes (Atterberry y col., 1997; Benke y Murphy, 1975, Ma y Chambers, 1994; Sultatos 1991; Timchalk y col., 2007). Por ello, se ha desestimado la sugerencia realizada por algunos autores, que habían propuesto el incremento de la activación del OF por desulfuración oxidativa mediada por citocromo P450 como un posible factor que contribuye a determinar la mayor susceptibilidad de los individuos jóvenes. Concretamente, Aterberry y colaboradores (1997) rechazaron esta posibilidad, ya que encontraron que la activación oxidativa del clorpirifós y el parathión se incrementaba en aproximadamente 14 veces a lo largo de los primeros 80 días de vida. Por ello, la teoría que cobra más fuerza para explicar estas diferencias en la sensibilidad al clorpirifós radica en las diferencias en la desactivación de los organofosforados.

Mattson y colaboradores (2000) demostraron que, luego de la administración diaria de clorpirifós a ratas desde el sexto día de gestación en adelante, la sangre fetal de los conceptos de 20 días de gestación presentaba aproximadamente la mitad de la

concentración de clorpirifós que tenía la sangre materna, pero llamativamente se detectaba la presencia de clorpirifós-oxón, metabolito que no era detectado en la sangre de las ratas adultas. Esta situación fue atribuida a la menor capacidad de detoxificación del oxón por parte de los fetos. De todos modos, a pesar de los altos niveles de oxón en los fetos, no encontraron diferencias en el porcentaje de inhibición de la AChE cerebral con el que presentaban las madres (Mattson y col., 2000).

Un elemento que también contribuye a explicar las diferencias que existen entre jóvenes y adultos en la sensibilidad al clorpirifós es la tasa de detoxificación diferencial mediada por carboxilestereasa y esterasas tipo A. Así se ha demostrado que las ratas jóvenes presentan una menor actividad de esterasas tipo A (Mortensen y col, 1996; Li y col., 1997; Padilla y col., 2000).

Es interesante resaltar que en su estudio, Moser y colaboradores (1998), encontraron que las ratas de 27 días de vida eran aproximadamente dos veces más sensibles al clorpirifós que las adultas, siendo los niveles de esterasas tipo A prácticamente similares; mientras que la actividad de carboxilestereasa era entre un 50 a un 60% inferior en las jóvenes. Los autores sugirieron que posiblemente el principal determinante en la toxicidad diferencial entre jóvenes y adultos podría obedecer a la diferente actividad de la CbE. Esta hipótesis fue también corroborada en base a los resultados obtenidos por Karanth y Pope (2000) en ratas, quienes no sólo encontraron una mayor actividad de CbE en hígado y sangre de adultos, sino también a nivel pulmonar, donde la enzima contribuye de manera significativa a la detoxificación frente a grandes exposiciones a organofosforados, tal como lo indican Gaustad y colaboradores, (1991).

En esta misma línea, Moser (2000) argumenta que estos dos sistemas críticos de detoxificación, como son la hidrólisis mediada por esterasas tipo A y la unión a CbE, están menos desarrolladas en jóvenes; por lo que la maduración de estos procesos lleva consigo una disminución de la sensibilidad a la exposición aguda a clorpirifós y otros OF. Esta explicación toxicocinética apoya los resultados obtenidos por este autor, ya que justificaría el desplazamiento a la derecha de las curvas dosis-respuesta realizadas

para evaluar los cambios en el comportamiento neurológico en ratas de diferentes edades, sin embargo no obtuvo la misma respuesta en todos los aspectos evaluados, ya que existían comportamientos del animal expuesto a clorpirifós no dependientes de la edad. Por todo ello, Moser considera que no podría ser la única explicación de las diferencias observadas.

Este comportamiento no tiene porque ser extensivo a todos los organofosforados, ya que Padilla y colaboradores (2000) observaron que el metamidofós, a diferencia del clorpirifós, no produce un mayor efecto tóxico en los animales jóvenes; la hipótesis de los autores es que esta mayor sensibilidad observada en edades tempranas podría estar relacionada con el hecho de que este OF no se detoxique vía esterasas tipo A o carboxilesterasas.

Es importante resaltar que así como se describen diferencias entre jóvenes y adultos, también se presentan diferencias en la actividad de la CbE entre ratas adultas (3 meses) y gerontes (24 meses), ya que en este último grupo etario la actividad de la enzima es menor, no así en el caso de las esterasas tipo A donde la actividad es similar entre los individuos de 3 y 24 meses, por lo que cuando el organofosforado es aplicado a dosis bajas no se presenta una mayor toxicidad en las ratas de gerontes ya que las esterasas tipo A serían capaces de neutralizar al OF, hecho que no sucede cuando la dosis es más alta, puesto que se hace evidente la menor actividad enzimática de las carboxiesterasas (Karanth y Pope, 2000).

En trabajos preliminares desarrollados en seres humanos, Pope y colaboradores (2005) no encontraron diferencias en la expresión hepática de la CbE en función de la edad, comparando para ello la actividad de la enzima entre el grupo de individuos jóvenes (2 a 24 meses) y los adultos (20 a 36 años); de todos modos los autores señalan que son necesarios realizar nuevos estudios a fin de corroborar fehacientemente sus resultados, puesto que los microsomas empleados en el estudio provenían solamente de 5 individuos menores de 24 meses, y que a su vez estuvieron sometidos a tratamientos con corticoides.

En los bovinos, la principal localización de la carboxilesterasa es a nivel hepático, siendo muy bajos los niveles de esta enzima en sangre (Abdelsalam y Ford, 1985). Si bien no encontramos datos que describan diferencias en la actividad de la enzima en función de la edad del bovino, en base a que la funcionalidad hepática se desarrolla en forma gradual, se requirieron entre 3 a 12 semanas para que se el metabolismo oxidativo sea completo (Nouws, 1992), por ello se podría inferir que la menor detoxificación sería uno de los causantes de la mayor sensibilidad que presentan los jóvenes.

En base a lo expuesto en los párrafos anteriores se podría indicar que a pesar de que las concentraciones plasmáticas alcanzadas tras la aplicación de clorpirifós fueron muy bajas e irregulares, éstas han sido capaces de producir una importante inhibición enzimática, que además se ha extendido en el tiempo, debido fundamentalmente a la larga permanencia observada tras la administración tópica, que ha podido actuar como “efecto reservorio”. La mayor sensibilidad observada en los terneros podría tener una base multifactorial, relacionada con los menores valores basales de actividad colinesterásica, la menor actividad detoxificante, y posiblemente una mayor velocidad de ingreso al sistema nervioso central que presentan los individuos jóvenes; aunque la mayor capacidad para regenerar la enzima que presentan los animales de menor edad podría ser un factor determinante en la falta de correlación entre el efecto inhibitorio de la actividad colinesterásica y la toxicidad observada en los terneros.

V.2.2.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en bovinos machos enteros y vaquillonas.

La administración de clorpirifós *pour-on* origina un efecto inhibitorio máximo de $77,96 \pm 8,74$ y $54,90 \pm 3,89\%$ para los toros y de $46,69 \pm 3,81$ y $35,70 \pm 5,62\%$ para las vaquillonas sobre la actividad de la AChE y la BChE, respectivamente. Puede observarse una mayor sensibilidad de la AChE a este anticolinesterásico en los machos que en las hembras, ya que en la mayoría de los días muestreados esta enzima presenta una actividad mayor en las vaquillonas que en los toros; en cambio, este efecto sólo se observa en los primeros días de estudio para la esterasa plasmática. Tal como se describió anteriormente la mayor inhibición de la AChE obedecería a la mayor sensibilidad de esta enzima respecto a la BChE (Amitai y col., 1998). El retorno a los valores basales en la actividad de AChE fue más lento en los machos que en las hembras, así a los 120 días post tratamiento la inhibición de la enzima fue de $34,02 \pm 14,01\%$ en machos y de $7,21 \pm 8,04\%$ en hembras.

La mayor sensibilidad de los toros frente a este organofosforado, ya fue descrita por primera vez hace varios años por Haas y colaboradores (1983) y por Scarratt y Blodgett (1986). Podemos destacar dos episodios de intoxicación, ambos producidos a dosis terapéuticas, tanto en 185 machos reproductores de un centro de inseminación donde no sólo se llegó a producir una severa toxicosis sino que tuvo efecto letal, como en una granja donde sólo los machos manifestaron una importante intoxicación, sin que se observara este problema en ninguna de las vacas tratadas. Actualmente, la información sobre este hecho se basa en estudios llevados a cabo en roedores, que como hemos podido apreciar poseen un comportamiento muy diferente y todavía no se ha establecido el o los mecanismos responsables de este comportamiento en bovinos.

En nuestro estudio, hemos utilizado una dosis menor que la empleada en los trabajos mencionados en el párrafo anterior y, como aconteció con los otros grupos de animales adultos evaluados, ningún toro presentó signos compatibles con los de intoxicación por OF. Debemos destacar que aunque no hubo manifestaciones de toxicidad, existía un alto porcentaje de inhibición en la actividad colinesterásica, el cual incluso llegó a ser ligeramente superior al 50%, valor que la mayoría de los autores

considera como punto de corte para correlacionar signos clínicos con exposición a compuestos inhibidores de las colinesterasas (Chen y col., 1999); aunque Pardío y colaboradores (2007) describieron que tras la aplicación de coumafós también se presenta una significativa disminución en la actividad colinesterásica sin que los bovinos tratados presenten signos clínicos de intoxicación, y atribuyeron a que esta situación podría deberse a un fenómeno de tolerancia relacionado a cambios en los receptores colinérgicos postsinápticos.

Estas diferencias en la sensibilidad a la aplicación del clorpirifós ligadas al sexo también fueron descritas en otras especies animales, aunque los resultados son muy diversos. Son bastante abundantes los trabajos realizados en ratas, y en este roedor se produce el efecto contrario, ya que son las hembras las que poseen esta mayor sensibilidad. Así, Gaines (1969) encontró que este compuesto era casi dos veces más tóxico para las hembras que para las ratas machos. Por su parte Mattsson y colaboradores (1996) también indicaron que las hembras eran más sensibles que los machos. Moser y Padilla (1998) si bien no encontraron diferencias en la susceptibilidad a padecer un episodio de intoxicación, si describieron que los machos se recuperaban con más facilidad que las hembras. Estas diferencias fueron atribuidas por Dalvi y colaboradores (2004) a la mayor actividad basal de la enzima (Chanda y col., 1997) y por ende a la mayor cantidad de sitios disponibles para la unión con el clorpirifós-oxon. Hay que señalar que en principio esta hipótesis también podría ser aplicable a nuestros resultados, puesto que los que presentaron una mayor actividad basal y una inhibición más elevada y de mayor duración en la AChE eran los machos.

De todos modos, debemos indicar que en el mismo estudio en el que se encontraron diferencias ligadas al sexo en los valores basales de la actividad colinesterásica en plasma, no se describieron diferencias en el sistema nervioso central (Chanda y col., 1997). De igual manera, Dalvi y colaboradores (2004) no encontraron diferencias significativas en la disminución de la actividad de la AChE cerebral entre ratas machos y hembras tratadas con clorpirifós, lo cual fue atribuido a que tampoco se presentaban diferencias en los valores basales de esta enzima en cerebro en función del sexo de las ratas.

Todos estos hallazgos nos indican que serían necesarios estudios más amplios en los que se evalúe la fluctuación de la actividad colinesterásica en los diferentes tejidos de los bovinos, ya que las diferencias encontradas en otras especies podrían también observarse en la especie evaluada en nuestro estudio.

Un hecho que podría influir en nuestros resultados estaría relacionado con el metabolismo de este compuesto, bien mediante modificaciones en la desulfuración oxidativa o bien a nivel de esterasas. Una vez que el clorpirifós ha ingresado al organismo, es metabolizado a clorpirifós-oxón y dado que este metabolito es mucho más potente que el fármaco madre para inhibir la colinesterasa, se podría inferir que la mayor inhibición registrada en los toros podría ser causada por una mayor conversión metabólica. Previamente, algunos autores (Sultatos, 1991; Ma y Chambers, 1994) habían observado que en ratas la activación mediada por CYP era mayor en machos que en hembras, lo que podría explicar nuestros resultados; sin embargo, Dalvi y colaboradores (2004) encontraron en microsomas hepáticos de ratas una mayor capacidad para activar al clorpirifós mediada por la isoenzima CYP1A1 en hembras que en machos lo cual justificaría la mayor inhibición enzimática reportada en hembras para estos roedores, como expusimos anteriormente.

En estudios desarrollados con microsomas hepáticos humanos, se demostró que las hembras presentan una mayor desarilación y desulfuración de clorpirifós en microsomas hepáticos humanos que en machos; aunque debemos señalar que este estudio se realizó en microsomas obtenidos sólo de una muestra poblacional de 10 individuos de cada sexo (Tang y col., 2001).

En bovinos, también se han descrito diferencias en el comportamiento farmacocinético de diversos compuestos en función del sexo del individuo (Capece y col., 2000; Janus y Antoszek, 2000), lo cual puede ser atribuido a la diferente actividad metabólica del citocromo P450, ya que se ha demostrado que en bovinos de raza piamontesa la actividad de la enzima CYP3A era mayor en machos que en hembras, aunque en el mismo estudio no encontraron diferencias entre machos y hembras de bovinos de la raza limousine (Dacasto y col., 2004). Sin embargo, bajo nuestro

conocimiento, no existe ningún trabajo publicado que evalúe la influencia del sexo en los niveles de CPO en bovinos.

En animales de laboratorio se han encontrado diferencias en la actividad de la carboxilesterasa en función del sexo, ya que la actividad de CbE en microsomas hepáticos de las ratas es aproximadamente la mitad de la que presentan los machos, en tanto que no se presentan diferencias en la actividad de CbE a nivel plasmático (Morgan y col., 1994; Moser y col., 1998).

Las razones que hemos expuesto anteriormente podrían condicionar un diferente comportamiento toxicocinético relacionado con la eliminación del CPF del organismo. Los resultados obtenidos en la evaluación cinética de este compuesto no nos posibilitan una justificación, debido a la elevada variabilidad observada en las concentraciones plasmáticas. Tal como ya se describió anteriormente para los toros, las vaquillonas también se presenta una gran fluctuación individual en las concentraciones plasmáticas de clorpirifós y por tanto en los parámetros farmacocinéticos calculados. Este comportamiento es esperable en una administración *pour-on*, ya que es sumamente característico en una absorción percutánea (Baggot, 2001). Si bien nosotros no encontramos diferencias en los parámetros farmacocinéticos entre machos y hembras, las discrepancias en la tasa de conversión a clorpirifós-oxón podrían tener lugar y no ser percibidas por la baja concentración de clorpirifós encontrada en plasma, ya que los valores de AUC fueron de $135,82 \pm 147,92$ y $231,31 \pm 224,58$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$) y los de C_{max} $10,92 \pm 4,18$ y $12,12 \pm 3,88$ ($\mu\text{g/L}$), para toros y vaquillonas, respectivamente.

Estas diferencias metabólicas entre hembras y machos podrían ser los principales determinantes de la mayor inhibición en la actividad colinesterásica presentada en el grupo de machos enteros.

V.2.3.- Efecto de la aplicación de clorpirifós sobre la actividad colinesterásica en bovinos machos enteros y orquiectomizados.

La inhibición enzimática que produce la aplicación de clorpirifós a machos enteros y a novillos difiere entre ambos grupos, ya que la actividad de la AChE en todos los días evaluados en nuestro estudio presentó un mayor porcentaje de inhibición en los toros en tanto que para la enzima BChE, solamente en los primeros días post tratamiento se observó una mayor inhibición en los animales enteros respecto a los orquiectomizados, y a partir de ese momento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En los novillos, las enzimas AChE y BChE recuperaron la actividad que presentaban previo a la aplicación de clorpirifós en el día 120 post tratamiento. Esto marca una clara diferencia con lo que aconteció en el grupo de los machos enteros, ya que en éstos en esa fecha todavía seguía inhibida la actividad de la AChE ($\approx 35\%$) y de la BChE ($\approx 14\%$), aunque con una clara tendencia a la recuperación de la actividad. Es importante señalar que el comportamiento que presentaron ambas enzimas en los novillos es similar al que aconteció en el grupo de las vaquillonas.

No hubo diferencias en el tiempo en el cual se alcanzó la máxima inhibición de la actividad de la AChE, ya que en ambos grupos fue a los 21 días post tratamiento, pero sí en el de la BChE, ya que en los toros el efecto máximo de inhibición se presentó a los 4 días y en los novillos a los 28 días.

Estos resultados muestran que los machos enteros fueron más sensibles al efecto del clorpirifós que los novillos, lo cual concuerda con lo especificado por varios autores que indican que la aplicación del clorpirifós a dosis terapéuticas (20 mg/kg) o ligeramente superiores a la misma pueden inducir fácilmente un episodio de toxicidad en los toros, ya sea de razas de carne como de leche, pero no en los novillos (Lein y col., 1982; Haas y col., 1983; Pearson y col, 1986; Scarratt y Blodgett, 1986). De todos modos, hay que señalar de nuevo que en nuestro estudio ninguno de los animales adultos manifestó signos clínicos compatibles con intoxicación por clorpirifós.

La mayor inhibición de la AChE en el grupo de los toros ($77,96 \pm 8,74\%$) respecto a los novillos ($50,88 \pm 11,57\%$) podría atribuirse a las diferencias en los valores basales de la enzima, tal como lo hacen Dalvi y colaboradores (2004) quienes atribuyen la diferencia en el porcentaje de inhibición a la distinta actividad enzimática basal que presentaban, siendo mayor el efecto en aquel sexo que presentaba mayor actividad, como sucede en nuestro trabajo tanto en las comparaciones dependientes del sexo como dependientes de la castración. Además, también se ha observado con otro anticolinesterásico, la rivastigmina, una clara influencia del sexo del animal en la respuesta al fármaco; aboliéndose esta diferencia tras la orquitectomía (Wang y col., 2000). Cuando nosotros nos basamos en estos trabajos para justificar los resultados obtenidos en nuestro estudio, debemos tener presente que los roedores presentan un comportamiento contrario al observado en bovinos en la actividad basal de las enzimas dependiendo del sexo, pero observan una correlación entre mayor actividad basal y mayor porcentaje de inhibición con los consiguientes efectos.

Las diferencias observadas entre machos enteros y orquitectomizados se podrían sustentar en las variaciones que pueden acontecer en la actividad metabólica tras la castración, ya que se ha comprobado que la orquitectomía en ratas induce una reducción en la actividad del citocromo P450, alcanzando niveles semejantes al que presentan las hembras, habiéndose comprobado que la aplicación de testosterona a estos animales produce un incremento en la actividad enzimática, retornando a los valores previos a la castración (Kyerematen y col., 1988).

También se describió en roedores, que la castración induce una menor expresión del CYP2J5 a nivel renal (Ma y col., 2004). Estos hallazgos podrían justificar los resultados obtenidos por Murphy y Dubois (1958), quienes observaron que en ratas el OF guthión era metabolizado a un potente inhibidor de la ChE en una proporción dos a tres veces más alta en los machos enteros respecto a la que se presentaba en las hembras, comprobando también que la orquitectomía inducía una disminución en el metabolismo del guthión, hasta un valor semejante al de las hembras.

Otro factor, que han argumentado otros autores con el objetivo de justificar diferencias entre este tipo de animales, se basa en los cambios en la piel que podrían influir en los procesos de absorción. Si bien no podríamos pensar en una mayor velocidad de absorción en los toros, ya que la piel de los mismos es más gruesa (Magnusson y col., 2001), sería preciso considerar de que manera influye el grosor de la epidermis en el efecto de reservorio, ya que en estudios *in vitro* se ha observado que existen diferencias al valorar la absorción transdérmica dependiendo si emplean preparados de piel completa o sólo con algunas capas de la misma, lo cual radica precisamente en el efecto de reservorio que se presenta cuando se emplea el preparado de piel completa (Poet, 2000).

Pequeñas diferencias en el efecto reservorio ejercido por la piel, lo que originaría que el fármaco ingrese más lentamente a la circulación general, más las diferencias metabólicas antes descritas podrían determinar una mayor producción de oxón, y dado que este compuesto es casi 1000 veces más potente que el compuesto original, podrían justificar el mayor grado de inhibición enzimática observado en el grupo de los machos enteros. Sin embargo, no hemos encontrado diferencias en los perfiles plasmáticos de clorpirifós entre ambos grupos ($C_{m\acute{a}x} = 10,92 \pm 4,18$ y $10,42 \pm 4,34$ $\mu\text{g/L}$; $\text{AUC} = 135,82 \pm 147,92$ y $96,51 \pm 67,60$ $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ y $\text{MRT} = 11,96 \pm 6,43$ y $11,74 \pm 8,47$ h, para toros y novillos, respectivamente); pero hay que tener en cuenta, como comentamos en el apartado anterior, que esto podría obedecer a la alta variación interindividual en la cantidad de analito encontrado, sumado al hecho de que éstas concentraciones plasmáticas fueron sumamente bajas.

V.2.4.- Comparación en el porcentaje de inhibición de las enzimas colinesterasas en novillos tratados con clorpirifós en invierno o verano.

El porcentaje de inhibición de las colinesterasas evaluadas en nuestro estudio mostró variaciones dependiendo de la fase del año en la que era aplicado el CPF; obteniéndose un valor máximo del $42,66 \pm 12,01\%$ y de $50,88 \pm 11,57\%$ en los tratados en invierno y del $37,57 \pm 6,53\%$ y del $37,66 \pm 6,29\%$ en los tratados en verano, para la BChE y la AChE, respectivamente. El porcentaje de inhibición de las enzimas colinesterásicas fue en ambos casos superior al que se describió en novillos tratados con clorpirifós (Dursban®) en dosis de 16 mL, ya que en estos animales el mayor porcentaje de inhibición en la colinesterasa sanguínea fue de aproximadamente del 25%, aunque los autores no especifican la época del año en la que se llevo a cabo el estudio (Haas y col., 1983).

En primer lugar debemos resaltar que no existían diferencias previas en el nivel de actividad fisiológica de estas estererasas; ya que los valores basales de ambas enzimas en los dos grupos eran similares (9597 ± 845 y 505 ± 49 UI/L para AChE y BChE en invierno y 10573 ± 643 y $554 \pm 54,44$ UI/L para AChE y BChE en verano), por lo que en las diferencias encontradas en la inhibición producida por CPF podrían tener un mayor peso fenómenos de índole farmacocinético.

También puede apreciarse que no sólo el porcentaje de inhibición de ambas enzimas fue menor en verano que en invierno, sino que además los novillos tratados en invierno no se aprecia una inhibición en la actividad de la BChE hasta los 21 días post tratamiento, situación que no acontece en los tratados en verano, ya que a los dos días ya se hace notoria la inhibición. Además, en el grupo de animales tratados en la época estival la recuperación de la actividad colinesterásica aconteció en un menor período de tiempo, ya que la actividad de las enzimas AChE y BChE no presenta diferencias respecto a los valores basales a los 50 días post tratamiento para los individuos medicados en verano; mientras que para los tratados en invierno fueron necesarios 120 días para que se recupere la actividad enzimática.

Esta diferencia en los ritmos de presentación del efecto inhibitorio del CPF podría estar relacionado con las modificaciones que acontecen en la perfusión sanguínea y en el estado de hidratación de la piel cuando se eleva la temperatura ambiental, ya que ambos factores incrementan la velocidad de absorción de los fármacos aplicados sobre la piel (Kielhorn y col., 2006). Así por ejemplo se describe que la absorción tópica de o-ethyl metilfosfonotionato, un compuesto organofosforado conocido como agente VX, se incrementaba 8 veces en los sujetos expuestos durante 3 h a temperaturas de 46° C respecto a la que presentaban lo expuestos a temperaturas ambientales de -18 °C durante el mismo período de tiempo (Craig y col., 1977). Previamente Funckes y colaboradores (1963) habían demostrado que la absorción dérmica del parathión en humanos se incrementaba en un 17% cuando la temperatura ambiental se elevaba de 21 a 28 °C y en un 227% cuando llegaba a los 40,5 °C. Esta mayor absorción también fue corroborada con un trabajo desarrollado *in vitro* usando un modelo con piel de porcino, donde se constató que la absorción del parathión se incrementaba cuando la temperatura ambiental pasaba de 37 a 42 °C (Chang y col., 1994).

Donde se pudo valorar específicamente el efecto de la época del año en la absorción de los fármacos fue en un ensayo realizado en humanos, a los cuales se les aplicó clonidina mediante un sistema terapéutico transdérmico en verano y en invierno, obteniéndose entre un 150 y 200% de incremento en la concentración plasmática de clonidina en los individuos tratados en verano respecto a los tratados en invierno (Fujimura y col., 1996).

También podemos indicar que los resultados que hemos obtenidos para el CPF son semejantes a lo observado por Taylor y colaboradores (1983) para el levamisol. Ellos postulan que tras la aplicación tópica de este antiparasitario, el fármaco aplicado en verano se absorbe más rápidamente a la circulación general y por lo tanto es metabolizado a mayor velocidad y de esta manera desaparece antes del organismo, por lo que la actividad enzimática se recupera con mayor celeridad. Ellos consideran que al alterarse la conformación del estrato corneo y al haber más secreciones también se contribuye a que desaparezca el efecto reservoiro. Este efecto de la temperatura

alterando la organización de la bicapa lipídica y produciendo lo que denominan como fluidificación de la membrana, también fue descrito por Krill y colaboradores (1992).

Si bien en nuestro trabajo no se ha efectuado un estudio farmacocinético en los novillos tratados en verano, se podría inferir en base a nuestros resultados y los aportados por Taylor y colaboradores (1983), que estas cinéticas podrían influir en la respuesta observada.

Finalmente debemos destacar dos factores de índole meteorológico que pueden modificar la biodisponibilidad de los fármacos aplicados por vía tópica, como son la mayor exposición solar, tanto en horas de exposición como en intensidad, además de una mayor frecuencia e intensidad de lluvias, lo cual incrementa la tasa de lavado del fármaco, y por lo tanto también hace que disminuya la permanencia en el organismo (Forsyth y col., 1983). Si bien el clorpirifós es un compuesto estable frente a la radiación ultravioleta, es sensible a la temperatura, así a pH 7 la semivida de eliminación en una solución acuosa pasa de 100 días a 15 °C, a 35 días cuando la temperatura es de 25 °C y a 12 días a con temperaturas de 35 °C, lo cual podría contribuir notablemente en la disminución de la disponibilidad del fármaco.

V.3.- Evaluación global del comportamiento farmacocinético del clorpirifós tras administración *pour-on*.

El análisis de los resultados obtenidos en el estudio cinético preliminar del clorpirifós, en el que se ha tratado de evaluar las influencias de la edad, el sexo y la orquiectomía, ha presentado una serie de dificultades; entre ellas queremos destacar el escaso número de trabajos encontrados, realizados la mayor parte de ellos en humanos y roedores, y en muchos casos sin que se haya establecido un estudio farmacocinético descriptivo. Únicamente hemos podido utilizar como referencia en rumiantes un trabajo desarrollado en ganado caprino, pero realizado tras administración oral. Por otro lado, sólo uno de los estudios se ha llevado a cabo mediante administración tópica, pero ha sido realizado en seres humanos. A pesar de estas limitaciones, hemos querido establecer una comparación de los resultados observados en nuestro estudio con los pocos trabajos que, bajo nuestro conocimiento, están presentes en la literatura.

El primer hallazgo importante obtenido tras el análisis farmacocinético consiste en las bajas concentraciones plasmáticas de clorpirifós encontradas en todos los animales ($< 18 \mu\text{g/L}$), lo cual coincide con lo descrito en seres humanos, ya que se constató que la administración por vía tópica de 5 mg/kg originaba unas concentraciones plasmáticas de CPF inferiores a $30 \mu\text{g/L}$ (Nolan y col., 1984).

Este mismo comportamiento también se ha observado cuando el clorpirifós se administraba por vía oral tanto en humanos a una dosis de $0,5 \text{ mg/kg}$ (Nolan y col., 1984) como en roedores. Hunter y colaboradores (1999) indican la dificultad de encontrar clorpirifós en los diferentes tejidos estudiados, incluso en sangre, así, tras la administración de clorpirifós por vía oral a ratas (7 mg/kg), durante los días 14 a 18 de gestación, no se detectó su presencia ni la del metabolito clorpirifós-oxón en encéfalo e hígado entre las 2 y 48 h posteriores al último tratamiento, en tanto que si se detectó 3,5,6-TCP, el cuál presento una semivida de eliminación que osciló ente 12 a 15 h. En otro estudio realizado en ratas hembras, en el cual se administró clorpirifós (5 mg/kg) por vía oral diariamente desde el día 6 de gestación hasta el décimo día post parto, solamente se detectó la presencia de clorpirifós ($108,8 \mu\text{g/L}$) en las muestras tomadas 4 h post administración, ya que en el segundo muestreo, que era efectuado 26 horas post

exposición, no se pudo determinar la presencia del fármaco. Cabe señalar que en este estudio en ninguna de las muestras, e independientemente de la dosis ensayada, fue factible determinar la presencia de clorpirifós-oxón, pero sí del metabolito 3,5,6-TCP (Mattson y col., 2000). Estos mismos autores también describieron que la administración de clorpirifós en ratas por vía oral en dosis única de 0,5 mg/kg no generaba concentraciones cuantificables de oxón (límite de cuantificación: 0,7 µg/L), en tanto que cuando se incrementaba a 10 mg/kg se encontraba en los muestreos efectuados entre la primera y décimo segunda hora post administración, con un rango de concentraciones que fluctuaron entre 1 y 100 µg/mL. Timchalk y colaboradores (2002) obtuvieron unos resultados similares, sólo lograron detectar el metabolito oxón en sangre después administrar 100 mg/kg de clorpirifós, pero en una proporción de 50 a 140 veces inferior al fármaco madre.

A la hora de comparar nuestros resultados con el único estudio realizado en rumiantes, debemos tener en consideración que el clorpirifós fue administrado por vía oral a una dosis de 150 mg/kg, cantidad que sería sumamente alta en otra especie, pero no así en un rumiante (Koritz, 1983). En ese estudio desarrollado en caprinos la máxima concentración plasmática de clorpirifós (3,70 µg/mL) fue superior a la obtenida por nosotros (< 0,018 µg/mL), siendo preciso señalar que esta diferencia en los valores alcanzados es dependiente tanto de la vía de administración, como de la dosis empleada, la cual fue quince veces más elevada en el trabajo realizado en las cabras (Koley y col., 1997).

La velocidad de absorción, tanto en el trabajo realizado por Koley y colaboradores (1997) como en el nuestro, fue lenta y variable. El t_{max} también presentó una gran variación individual, siendo el promedio del tiempo requerido $12,44 \pm 3,40$ h, con un rango de entre 1 y 36 horas. Nosotros observamos que tras la administración tópica, el CPF presentó un tiempo de latencia entre la aplicación del preparado y la detección del fármaco en sangre muy variable en todos los grupos (entre 0,25 y 10 h), siendo importante resaltar que en términos generales en el caso de los terneros el fármaco se detectó con mayor celeridad que en los animales adultos, apareciendo de forma más uniforme en todos los animales, lo cual refleja diferencias en la tasa de

absorción en función de la edad, lo cual podría deberse en parte a la mayor permeabilidad que presenta la piel de los individuos jóvenes (Kielhorn y col., 2006). Tras la administración oral, el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima fue de 12 h, aunque ya desde las 3 horas post administración en las cabras se detectó la presencia del fármaco en sangre (Koley y col., 1997), el retraso y la variabilidad obtenida en el ganado caprino podría estar condicionada por el gran número de factores que pueden retrasar la absorción tras la administración oral en un rumiante, como son adsorción a la celulosa, quelación, retención en la fase sólida del rumen, atrapamiento iónico, o alteración por la microflora ruminal (Koritz, 1983)

El *AUC*, parámetro que permite evaluar la biodisponibilidad del fármaco, presentó también una gran variación individual, con un promedio para todos los grupos de $240 \pm 194 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ y un rango de 4,1 a $694 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, siendo en todos los animales mucho más bajo que el reportado Koley y colaboradores (1997) en cabras ($AUC = 316 \text{ mg}\cdot\text{h/L}$). Estas diferencias podrían estar relacionadas con la vía de administración y con la dosis empleada. Evidentemente, al ser este parámetro directamente dependiente de la dosis utilizada y del aclaramiento es lógico que al administrar una dosis quince veces más elevada los valores de *AUC* pudieran multiplicarse por valores semejantes, sin embargo, el área obtenida en nuestro estudio es aproximadamente unas mil veces menor, este hecho podría estar claramente relacionado con una menor biodisponibilidad tras la administración en piel frente a la administración oral, a pesar de los numerosos factores que pueden reducir este proceso. Otro factor a tener en cuenta es que se presente un diferente aclaramiento entre estas especies, ya que se han descrito diferencias en el metabolismo oxidativo entre bovinos y caprinos (Sztóková y col., 2004). Sin embargo, Mattsson y colaboradores (2000) han obtenido valores similares a los encontrados en nuestro estudio en roedores tras la administración de clorpirifós por vía oral en ratas en dosis de 5 y 10 mg/kg ($AUC = 153$ y $375 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, respectivamente), aunque hay que señalar que ese estudio sólo se tomaron muestras sanguíneas hasta las 12 horas post tratamiento.

La mayor permanencia del clorpirifós en la sangre de nuestros bovinos adultos (48 h), comparada con lo descrito en cabras (24 h) (Koley y col.1997), posiblemente

puede estar condicionada además por la elevada liposolubilidad del clorpirifós, lo que facilita su distribución por la superficie cutánea, actuando esta última como un sitio de depósito desde el cual el fármaco se libera lentamente a la circulación sistémica (Griffin y col., 2000; Meuling y col., 2005), ya que se ha demostrado que en seres humanos entre el 56 y el 66% del clorpirifós aplicado por vía tópica se mantiene sobre la superficie cutánea durante 24 h y que a pesar de efectuar el lavado de la superficie cutánea 4 horas después de haber realizado un tratamiento continúan encontrando la presencia del metabolito 3,5,6-TCP en orina a las 120 h post tratamiento, siendo la semivida de eliminación de los metabolitos dialquilfosfato de 30 h tras la administración tópica, comparada con las 15,5 h que presenta tras la aplicación oral, lo cual demuestra que la piel actuaría como reservorio de fármaco, desde el que se liberaría gradualmente, en función de la tasa de transporte transcutáneo y del recambio epidérmico.

Si bien no hemos encontrado diferencias en función de la edad en la máxima concentración plasmática, en el tiempo requerido para alcanzarla y en el área bajo la curva, si se presentaron diferencias en el tiempo medio de residencia del fármaco, el cual fue superior en los terneros ($25,60 \pm 7,30$; $31,87 \pm 7,37$ y $18,10 \pm 3,47$ h para animales de 1, 7 y 28 días de vida) respecto a los adultos ($11,96 \pm 6,43$ h), y por lo tanto podría también explicar la mayor toxicidad que presentó este grupo. Por su parte, no se encontraron diferencias en los tiempos de residencia entre toros ($11,96 \pm 6,43$ h), vaquillonas ($14,60 \pm 9,37$ h) y novillos ($11,74 \pm 8,47$ h), así como en los demás parámetros farmacocinéticos determinados.

La variación interindividual que presentaron los distintos parámetros farmacocinéticos es característica de los procesos de absorción cutánea, debido a los factores inherentes a la conformación y funcionalidad de la piel; pero además existe otro factor que puede causar estas variaciones, el lamido. Por los hábitos higiénicos de estos animales, al ser aplicado el fármaco a lo largo de la columna vertebral desde la unión de las escápulas hasta la base de la cola, es factible que el lamido de su propio pelaje o el de los animales próximos pueda modificar la cantidad de fármaco que ingresa al organismo (Bousquet - Melou y col., 2004)

En cuanto a la distribución del fármaco, al ser un compuesto tan liposoluble se distribuye muy bien por los diferentes compartimentos tisulares alcanzando altas concentraciones en el sistema nervioso. En este caso, hay que señalar que la barrera hematoencefálica en los animales jóvenes presenta una mayor permeabilidad, lo cual permitiría al clorpirifós y sus metabolitos alcanzar el SNC más fácilmente que en los adultos (Moser y col., 1998).

El clorpirifós es rápidamente metabolizado y eliminado en el organismo, lo cual se corrobora en nuestro estudio por el hecho de que solamente se detecta el compuesto hasta las 48 h. En estudios desarrollados en humanos, donde el fármaco se administró por vía oral y luego por vía tópica, se determinó que las concentraciones sanguíneas de 3,5,6-TCP a las 24 h posteriores de la dosificación oral eran de 0,063 $\mu\text{g/mL}$, no detectándose el clorpirifós-oxón (Nolan y col., 1984). Estos autores también demostraron que aproximadamente el 70% de la dosis era eliminada como 3,5,6-TCP por heces, en tanto que la concentración de este metabolito se reducía a solamente un 3% de la dosis cuando la aplicación se efectuaba por vía tópica, lo cual pone en evidencia la baja absorción del compuesto luego de ser aplicado por esta vía, la cual fue estimada en aproximadamente un 1,35%.

Estos resultados sugieren que la determinación de clorpirifós en sangre para corroborar la exposición al mismo por vía cutánea sólo es de utilidad en las primeras 48 horas, lo cual es coincidente a lo reportado por otros autores, como Griffin y colaboradores (1999), quienes recomiendan identificar la presencia de los metabolitos dialquifosfatos en sangre entre las 17 y 24 horas post administración o hasta las 96 h en orina.

Si bien en nuestro estudio no se ha determinado la presencia de los metabolitos del clorpirifós, en trabajos previos se ha demostrado que existen diferencias en el metabolismo de este compuesto entre animales jóvenes y adultos (Mortensen y col, 1996; Li y col., 1997, Moser y col.1998, Karanth y Pope, 2000) así como también entre machos y hembras (Sultatos, 1991; Ma y Chambers, 1994, Dalvi y col., 2004), los que posiblemente actuaron como determinantes para justificar las diferencias en los porcentajes de inhibición encontrados entre los distintos grupos de animales empleados en el estudio.

Finalmente queremos expresar que a pesar de que no se encontraron otras diferencias significativas en el comportamiento farmacocinético del clorpirifos, si se presentaron diferencias en la inhibición de las enzimas colinesterásicas en función de la edad, el sexo y la época del año en el que se efectuó el tratamiento, lo cual podría estar influenciado por factores cinéticos enmascarados por la rápida metabolización y transformación en el metabolito activo oxón o por factores farmacodinámicos. El presente estudio representa un aporte para comprender la necesidad de ajustar adecuadamente el régimen posológico a la categoría animal a tratar, a fin de evitar episodios de intoxicación así como la generación de residuos que afecten al consumidor como al ambiente.

Conclusiones

VI - CONCLUSIONES

A partir del trabajo realizado y a la luz de los resultados obtenidos, se llegó a las siguientes conclusiones:

1.- La actividad basal de las dos enzimas colinesterásicas se modificó en función de la edad de animales, siendo inferior en los terneros respecto a los toros. En relación al sexo, se encontraron diferencias en la actividad acetilcolinesterásica, la cual fue más alta en los toros que en las vaquillonas y en los novillos. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la actividad de las dos enzimas colinesterásicas entre las dos estaciones del año estudiadas.

2.- La administración de clorpirifós *pour - on* a la dosis de 10 mg/kg origina una importante inhibición colinesterásica, tanto en eritrocitos como en plasma, siendo esta inhibición prolongada en el tiempo en todos los grupos evaluados.

3.- La edad influye en la inhibición originada por el clorpirifós en ambas colinesterasas; siendo el grupo de los toros el que presentó el mayor porcentaje de inhibición en las dos enzimas colinesterásicas, a pesar de ser los terneros los únicos que manifestaron cuadros de intoxicación.

4.- El efecto inhibitorio originado por la administración de clorpirifós es dependiente del sexo del individuo tratado, ya que los machos enteros presentaron una mayor inhibición en la actividad acetilcolinesterásica que las hembras durante todo el período de muestreo, en tanto que sólo se encontraron diferencias en el porcentaje de inhibición de la enzima butirilcolinesterasa durante los primeros días post tratamiento, siendo también superior en los machos enteros.

5.- La orquiectomía modifica la respuesta inhibitoria de las colinesterasas ante la exposición al clorpirifós, puesto que se observó que los machos enteros presentaron durante todo el ensayo una mayor inhibición en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa que los machos castrados, mientras que la mayor inhibición de la enzima butirilcolinesterasa que presentaron los machos enteros sólo se evidenció en los primeros días posteriores a la aplicación del fármaco.

6.- La época del año modificó considerablemente los porcentajes de inhibición de las dos enzimas así como también el período de tiempo durante el cual estuvieron inhibidas, ya que los novillos tratados en invierno presentaron una mayor inhibición que los que fueron tratados en verano, lo cual puede estar determinado por razones ambientales, cinéticas o dinámicas.

7.- El estudio cinético realizado tras la administración *pour-on* de clorpirifós muestra que este fármaco presentó concentraciones plasmáticas sumamente bajas con una amplia variación individual. Si bien sólo en el grupo de animales de 1 día de vida se encontró una correlación positiva entre los parámetros cinéticos C_{max} y AUC y la inhibición máxima de la enzima acetilcolinesterasa es posible que factores cinéticos enmascarados por la rápida metabolización y transformación en el metabolito activo oxón justifiquen las diferencias encontradas en la inhibición colinesterásica y en los episodios de toxicidad observados.

8.- El presente estudio representa un aporte para comprender la necesidad de ajustar estrictamente el régimen posológico a la categoría animal a tratar, a fin de evitar episodios de intoxicación así como la generación de residuos que afecten al consumidor como al ambiente.

Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

Aardema, H., Meertens, J.H.; Ligtenberg, J.J.; Peters-Polman, O.M.; Tulleken, J.E. y Zijlstra, J.G. (2008). *Organophosphorus pesticide poisoning: cases and developments*. Neth. J. Med. 66: 149-153.

Aasmoe, L. y Aarbakke, J. (1999). *Sex dependent induction of alcohol dehydrogenase activity in rats*. Biochem. Pharmacol. 57: 1067-1072.

Abdel-Rahman, A.A.; Wilmarth, K.; Blumenthal, G.; Abou-Donia, S.; Ali, R.A.; Abdel Monen, A.E. y Abou-Donia, M. (1993). *Placental transfer, metabolism, and pharmacokinetics of a single oral dose of [14C] chlorpyrifos in Sprague-Dawley rats*. Toxicologist 13: 617.

Abdelsalam, E.B. y Ford, E.J. (1985). *Normal esterase activity in the plasma whole blood and tissues of cattle*. Zbl. Vet. Med. A 32: 518-525.

Abu-Qare, A.W. y Abou-Donia, M.B. (2001). *Inhibition and recovery of maternal and fetal cholinesterase enzyme activity following a single cutaneous dose of methyl parathion and diazinon, alone and in combination, in pregnant rats*. J. Appl. Toxicol. 21: 307-316.

Abu-Qare, A.W.; Abdel-Rahman, A.; Brownie, C.; Kishk, A.M. y Abou-Donia, M.B. (2001). *Inhibition of cholinesterase enzymes following a single dermal dose of chlorpyrifos and methyl parathion, alone and in combination, in pregnant rats*. J Toxicol. Environ. Health A. 63: 173-189.

Adamson, P.J.; Wilson, W.D.; Baggot, J.D.; Hietala, S.K. y Mihalyi, J.E. (1991). *Influence of age on the disposition kinetics of chloramphenicol in equine neonates*. Am. J. Vet. Res. 52: 426-431.

Agarwal, D.K.; Misra, D.; Agarwal, S.; Seth, P.K. y Kohli, J.D. (1982). *Influence of sex hormones on parathion toxicity in rats: antiacetylcholinesterase activity of parathion and paraoxon in plasma, erythrocytes, and brain*. J. Toxicol. Environ. Health. 9: 451-959.

Aldridge, W.N. (1953). *Serum esterases. I. (1953). Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination*. Biochem, J. 53: 110-117.

Aldridge, J. E.; Seidler, F. J.; Meyer, A.; Thillai, I. y Slotkin, T. A. (2003). *Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: effects during different critical periods*. Environ. Health Perspect. 111, 1736-1743.

Al-Jobory, M. y Mohammad, F. (2005). *Validation of an electrometric blood cholinesterase measurement in goats*. J. Vet. Sci. 6(4):299-303.

Al-Qarawi, A.A. y Ali, B.H. (2003). *Variations in the normal activity of esterases in plasma and liver of camels (Camelus dromedarius), cattle (Bos indicus), sheep (Ovis aries) and goats (Capra hircus)*. J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med. 50: 201-203.

Amitai, G.; Moorad, D.; Adani, R. y Doctor, B.P. (1998). *Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by chlorpyrifos-oxon*. Biochem. Pharmacol. 56: 293-299.

Anderson, G. (2002). *Sex differences in drug metabolism: Cytochrome P-450 and uridine diphosphate glucuronosyl transferase*. J. Gend. Specif. Med. 5: 25-33.

Aquirre, C.; Rodriguez-Sasiain, J.M.; Navajas, P. y Calvo, R. (1988). *Plasma protein binding of penbutolol in pregnancy*. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 13: 23-26.

Arai, T.; Inoue, A.; Takeguchi, A.; Mizutani, H.; Shimoo, M.; Sako, T.; Yoshimura, I.; y Kimura, N. (2003). *Comparison of enzyme activities in plasma and leukocytes in dairy and beef cattle*. J. Vet. Med. Sci. 65(11): 1241-1243.

Ashry, K.M.; Abu-Qare, A.W.; Saleem, F.R.; Hussein, Y.A.; Hamza, S.M.; Kishk, A.M. y Abou-Donia, M.B. (2002). *Inhibition and recovery of maternal and fetal cholinesterase enzymes following a single oral dose of chlorpyrifos in rats*. Arch. Toxicol. 76:30-39.

Atack, J.R.; Perry, E.K.; Bonham, J.R.; Candy, J.M. y Perry, R.H. (1986). *Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system*. J. Neurochem. 47: 263-277.

Atterberry, T.T.; Burnett, W.T. y Chambers, J.E. (1997). *Age-related differences in parathion and chlorpyrifos toxicity in male rats: target and nontarget esterase sensitivity and cytochrome P450-mediated metabolism*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 147: 411-418.

Awal, M.A.; Malik, J.K.; Sandhu, H.S. (1988). *Measurement by spectrophotometer of blood cholinesterases inactivation following single oral doses of phosphamidon in Bubalus bubalis*. Vet. Hum. Toxicol. 30: 444-446.

Aygun, D.; Doganay, Z.; Altintop, L.; Guven, H.; Onar, M.; Deniz, T. y Sunter, T. (2002). *Serum acetylcholinesterase and prognosis of acute organophosphate poisoning*. J. Toxicol. 40: 903-910,

Baggot, J. D.(1977). *Principles of drug disposition in domestic animals: the basis of veterinary clinical pharmacology*. W.B Saunders, Philadelphia. United State of America. p

Baggot, J.D. (1992). *Clinical pharmacokinetics in veterinary medicine*. CLIN. Pharmacokinet. 22: 254-273.

Baggot, J.D. (2001). *The physiological basis of veterinary clinical pharmacology*. Blackwell Sciences Ltd. London.United Kingdom. pp. 288.

- Baggot, J.D. y Brown, S.A. (1998) *Basis for selection of the dosage form*. En: *Development and formulation of veterinary dosage forms*. 2nd ed. (Eds: Hardee, G.E. y Baggot, J.D.). Marcel Dekker, New York pp 7-144.
- Bajgar, J.; Kuca, K.; Jun, D.; Bartosova, L. y Fusek, J. (2007). *Cholinesterase reactivators: the fate and effects in the organism poisoned with organophosphates/nerve agents*. *Curr. Drug. Metab.* 8: 803-809.
- Baraona, E.; Abittan, C.S.; Dohmen, K.; Moretti, M.; Pozzato, G.; Chayes, Z.W.; Schaefer, C. y Lieber, C.S. (2001). *Gender differences in pharmacokinetics of alcohol*. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25: 502-507.
- Barry, B.W. (2001). *Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery*. *Eur. J. Pharm. Sci.* 14: 101-114.
- Bayer, S.; Altman, J.; Russo, R. y Zhang, X. (1993). *Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat*. *Neurotoxicology* 14, 83-144.
- Beatty, K.L. y Sohn, M.L. (1986). *Effect of three insecticides on growth rates of soil fungi*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 533-539.
- Beierle, I.; Meibohm, B. y Derendorf, H. (1999). *Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics*. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 37: 529-547.
- Bell, J.U. y Van Petten, G.R. (1976). *Characterization of maternal and fetal ovine plasma cholinesterase*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 35: 147-155.
- Benke, G. y Murphy, S. (1975). *The influence of age on the toxicity and metabolism of methyl parathion and parathion in male and female rats*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 31: 254-269.
- Beveridge, J.M. y Lucas, C.C. (1941). *A note on serum cholinesterase variability in male and female rats*. *Science* 93: 356-357.
- Bigbee, J.W.; Sharma, K.V.; Chan, E.L. y Böglér, o. (2000). *Evidence for direct role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth in primary dorsal root ganglion neurons*. *Brain. Res.* 861: 354-362.
- Blakley, B.R. y Yole M.J. (2002). *Species differences associated with normal brain cholinesterase activity in animals and birds*. *Vet. Human. Toxicol.* 44: 129-132.
- Boreham, S. y Birch, P. (1990). *Changes in the macro-invertebrate benthos of a rural Essex clay stream following pollution by the pesticide Dursban*. *London Naturalist.* 69: 79-84.

- Bousquet-Melou A.; Mercadier, S.; Alvinerie, M. y Toutain, P.L. (2004). *Endectocide exchanges between grazing cattle after pour-on administration of doramectin, ivermectin and moxidectin*. Int. J. Parasitol. 34, 1299-1307.
- Branson, K. y Booth, N. (1995). Injectable Anesthetics. En. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. (ed.: Adams, R.). The Iowa State University Press/Ames. P. 209-267.
- Brem, J.; Acosta, O.; Mancebo, O. y Roux, J. (1985). *Valores normales de la colinesterasa en sangre total y suero de ruminantes domésticos*. Vet. Arg. 2: 640-648.
- Brines J, Hernández R, Peris A, Fons J. (1997). *Tratamiento antibiótico en el recién nacido*. En *Tratamiento antimicrobiano*. (Ed. Drobnic L.). EMISA. Madrid. p 85-104.
- Brinkman-Van der Linden, C.M.; Havenaar, E.C.; Van Ommen, C.R.; Van Kamp, G.J.; Gooren, L.J. y Van Dijk, W. (1996). *Oral estrogen treatment induces a decrease in expression of sialyl Lewis x on alpha 1-acid glycoprotein in females and male-to-female transsexuals*. Glycobiology,6:407-412.
- Britto, L.R.; Alves, A.S.; Lindstrom, J.M. y Torrão, A.S. (2001). *Differential localization of acetylcholinesterase in relation to pre- and postsynaptic nicotinic receptors in the chick brain*. Brain. Res. 898: 158-161.
- Brock, A. y Brock, V. (1990). *Plasma cholinesterase activity in a healthy population group with no occupational exposure to known cholinesterase inhibitors: relative influence of some factors related to normal inter- and intra-individual variations*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 50(4): 401-408.
- Brock, A. y Brock, V. (1993). *Factors affecting inter-individual variation in human plasma cholinesterase activity: body weight, sex, genetic polymorphism and age*. Arch. Environ. Contamin. Toxicol. 24: 93-99.
- Bronaugh, R.L. y Maibach, H.I. (1999) *Percutaneous Absorption*, 3ª Edición. Marcel Dekker, New York.
- Bronaugh, R.L.; Stewart, R.F. y Congdon, E.R. (1983). *Differences in the permeability of rat skin related to sex and body site*. J. Soc. Cosmet. Chem. 34: 27-35.
- Brust, R.A.; Miyazaki, S. y Hodgson, G.C. (1971). *Effect of Dursban in the drinking water of chicks*. J. Econ. Entomol. 64: 1179-1183.
- Buck, W. B.; Osweiler, G. D.; Van Gelder, G. A. (1981). *Toxicología Veterinaria Clínica y Diagnóstica*. Editorial Acribia. Zaragoza. España. pp 475.
- Burrows, G.E.; Barto, P.B.; Martin, B. y Tripp, M.L. (1983). *Comparative pharmacokinetics of antibiotics in newborn calves: chloramphenicol, lincomycin, and tylosin*. Am. J. Vet. Res. 44: 1053-1057.

- Burrows, G.E.; Barto, P.B. y Martin, B. (1987). *Comparative pharmacokinetics of gentamicin, neomycin and oxytetracycline in newborn calves*. J. Vet. Pharmacol. Ther. 10: 54-63.
- Bushnell, P.J.; Pope, C.N. y Padilla, S. (1993). *Behavioral and neurochemical effects of acute chlorpyrifos in rats: tolerance to prolonged inhibition of cholinesterase*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 266: 1007-1017.
- Buss, D.S.; McCaffery, A.R. y Callaghan, A. (2002). *Evidence for p-glycoprotein modification of insecticide toxicity in mosquitoes of the Culex pipiens complex*. Med Vet Entomol., 16(2): 218-222.
- Buxton, I. (2006). *Farmacocinética y Farmacodinamia*. En: *Goodman and Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Eds: Brunton L.; Lazo, J.; Parker, K. 11 edición. Editorial: Mc Graw Hill.
- California Environmental Protection Agency. Department of Pesticide Regulation. Medical Toxicology Branch. (1993). Summary of toxicology data: Chlorpyrifos. Sacramento, CA
- Capece, B.P.; Castells, G.; Pérez, F.; Arboix, M. y Cristòfol C. (2000). *Pharmacokinetic behaviour of albendazole sulphoxide enantiomers in male and female sheep*. Vet. Res. Commun. 24: 339-348.
- Cardoniga, R. (1993). *Farmacocinética*. En *Velásquez. Farmacología*. 16ª edición. (Eds: Velasco, A.; Lorenzo, P.; Serrano, J.; Andrés-Trelles, F). Interamericana • McGraw-Hill
- Casida, J.E. y Quistad, G.B. (2004). *Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets*. Chem. Res. Toxicol. 17: 983-998.
- Cerrutti, J.A.; Brandoni, A.; Quaglia, N.B. y Torres, A.M. (2002a). *Sex differences in p-aminohippuric acid transport in rat kidney: role of membrane fluidity and expression of OAT1*. Mol. Cell. Biochem. 233: 175-179.
- Cerrutti, J.A.; Quaglia, N.B.; Brandoni, A. y Torres, A.M. (2002b). *Effects of gender on the pharmacokinetics of drugs secreted by the renal organic anions transport systems in the rat*. Pharmacol. Res. 45: 107-112.
- Chakraborti, T.K.; Farrar, J.D. y Pope, C.N. (1993). *Comparative neurochemical and neurobehavioral effects of repeated chlorpyrifos exposures in young and adult rats*. Pharmacol Biochem Behav. 46: 219-224.
- Chanda, S.M.; Mortensen, S.R.; Moser, V.C. y Padilla, S. (1997). *Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an in vitro and in vivo comparison*. Fundam. Appl. Toxicol. 38:148-157.

- Chang, S.K.; Brownie, C. y Riviere, J.E. (1994). *Percutaneous absorption of topical parathion through porcine skin: in vitro studies on the effect of environmental perturbations*. J. Vet. Pharmacol. Ther. 17(6):434-439.
- Changeux, J.P. (1966). *Responses of acetylcholinesterase from torpedo marmorata to salts and curarizing drugs*. Mol. Pharmacol. 2:369-392.
- Chatonnet, A. y Lockridge, O. (1989). *Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase*. Biochem. J. 260: 625-634.
- Chen, T.S.; Doong, M.L.; Chang, F.Y.; Lee, S.D. y Wang, P.S. (1995). *Effects of sex steroid hormones on gastric emptying and gastrointestinal transit in rats*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 268: 171-176.
- Chen, W.L.; Sheets, J.J.; Nolan, R.J. y Mattsson, J.L. (1999). *Human red blood cell acetylcholinesterase inhibition as the appropriate and conservative surrogate endpoint for establishing chlorpyrifos reference dose*. Regul. Toxicol. Pharmacol. 29:15-22.
- Chow, A.Y. y Ecobichon, D.J. (1974). *Perinatal development of avian plasma, hepatic and renal esterases*. Biol. Neonate. 25: 23-30.
- Chu, C.Y.; Singla, V.P.; Wang, H.P.; Sweet, B. y Lai, L.T. (1981). *Plasma alpha 1-acid glycoprotein levels in pregnancy*. Clin. Chim. Acta 112: 235-240.
- Chubb, I.W. y Smith, A.D. (1975). *Isoenzymes of soluble and membrane-bound acetylcholinesterase in bovine splanchnic nerve and adrenal medulla*. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 191: 245-261.
- Chuiko, G.M. (2000). *Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 127(3): 233-242.
- Çokuğraş AN. (2003). *Butyrylcholinesterase: Structure and physiological importance*. Turk. J. Bioch. 28(2): 54-61.
- Collen, M.J.; Abdulian, J.D. y Chen, Y.K. (1994). *Age does not affect basal gastric acid secretion in normal subjects or in patients with acid-peptic disease*. Am. J. Gastroenterol. 89: 712-716.
- Coskun, T.; Sevinc, A.; Tevetoglu, I.; Alican, I.; Kurtel, H. y Yegen, B.C. (1995). *Delayed gastric emptying in conscious male rats following chronic estrogen and progesterone treatment*. Res. Exp. Med. 195: 49-54
- Costa, L.G. (2006). *Current issues in organophosphate toxicology*. Clin. Chim. Acta. 366: 1-13.

- Costa, L.G., McDonald, B.E., Murphy, S.D., Omenn, G.S., Richter, R.J., Motulsky, A.G. y Furlong, C.E. (1990). *Serum paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifosoxon toxicity in rats*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 103: 66-76.
- Cox, C. (1994a). *Chlorpyrifos, part 2: Human exposure*. J. Pesticide Reform 15:14-20
- Cox, C. (1994b). *Chlorpyrifos, part 3: Ecological effects*. J. Pesticide Reform 15:13-19
- Cox, C. (1994c). *Chlorpyrifos, Part I: Toxicology*. J. Pesticide Reform 14:15-20
- Coye, M.J.; Lowe, J.A. y Maddy, K.T. (1986). *Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides: Cholinesterase activity determinations*. J. Occup. Med. 28: 619-627.
- Craig, F.; Cummings, E. y Sim, V. (1977). *Environmental temperature and the percutaneous absorption of a cholinesterase inhibitor, VX*. J. Invest. Dermatol. 68: 357-361.
- Cristòfol, C.; Navarro, M.; Franquelo, C.; Valladares, J.E. y Arboix, M. (1998). *Sex differences in the disposition of albendazole metabolites in sheep*. Vet. Parasitol. 78: 223-231.
- Dacasto, M.; Eeckhoutte, C.; Capolongoa, F.; Dupuy, J.; Carletti, M.; Calléja, C.; Nebbia, C.; Alvinerie, M. y Galtier, P. (2005). *Effect of breed and gender on bovine liver cytochrome P450 3A (CYP3A) expression and inter-species comparison with other domestic ruminants*. Vet. Res. 36: 179-190.
- Dale, H. (1914). *The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine*. J. Pharmacol. Exp. Therap. 6:147-190.
- Dalvi, R.R.; Dalvi, P.S. y Lane, C. (2004). *Cytochrome P450-mediated activation and toxicity of chlorpyrifos in male and female rats*. Vet. Hum. Toxicol., 46(6):297-299.
- Dass, P.; Mejía, M.; Landes, M.; Jones, R.; Stuart, B.; Thyssen, J. (1994). *Cholinesterase: review of methods*. Clin. Chem. 10: 135-157.
- De Backer, P. (1986). *Comparative Neonatal Pharmacokinetics*. En: *Comparative Veterinary Pharmacology, Toxicology and Therapy*. (Eds.: Van Miert, A.S.; Bogaert, M.G. y Debackere, M.). Proc. 3° Congr. Europ. Assoc. Vet. Pharmacol. Toxicol. August 25-29, 1985. Belgium. MTP Press Ltd lancaster. United Kingdom
- Deacon, M.M.; Murray, J.S.; Pilny, M.K.; Rao, K.S.; Dittenber, D.A.; Hanley, T.R. y John, J.A. (1980). *Embryotoxicity and fetotoxicity of orally administered chlorpyrifos in mice*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 54: 31-40.
- Dishburger, H.J.; McKellar, R.L.; Pennington, J.Y. y Rice, J.R. (1977). *Determination of residues of chlorpyrifos, its oxygen analogue, and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in tissues of cattle fed chlorpyrifos*. J. Agric. Food Chem. 25, 1325-1329.

- Dressman, J.B.; Berardi, R.R.; Dermentzoglou, L.C.; Russell, T.L. y Schmaltz, S.P. (1990). *Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women*. Pharm. Res. 7: 756-761.
- Dunlop, R. (1983). Ruminal influence on drug action. En: Veterinary pharmacology and toxicology. (Eds.: Ruckebusch, Y.; Toutain, P. y Koritz, G.). MTP Press Limited. Lancaster. p.165-181.
- Dyer, S.M.; Cattani, M.; Pisaniello, D.L.; Williams, F.M. y Edwards, J.W. (2001). *Peripheral cholinesterase inhibition by occupational chlorpyrifos exposure in Australian termiticide applicators*. Toxicology 169: 177-185.
- Earl, C.J. y Thompson, R.H. (1952). *Cholinesterase levels in the nervous system in tri-ortho-cresyl phosphate poisoning*. Br. J. Pharmacol, 7: 685-694.
- Ecobichon, D.J. y Comeau, A.M. (1973). *Pseudocholinesterases of mammalian plasma: physicochemical properties and organophosphate inhibition in eleven species*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 24: 92-100.
- Ecobichon, D.J. y Stephens, D.S. (1973). *Perinatal development of human blood esterases*. Clin. Pharmacol. Ther. 14(1): 41-47.
- Eddleston, M.; Buckley, N.A.; Eyer, P. y Dawson, A.H. (2008). *Management of acute organophosphorus pesticide poisoning*. Lancet. 371: 597-607.
- El-Hissy, F.T. y Abdel-Kader, M.I.A. (1980). *Effect of five pesticides on the mycelial growth of some soil and pathogenic fungi*. Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie 20: 257-263.
- Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.Jr. y Feather-Stone, R.M. (1961). *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochem. Pharmacol. 7:88-95.
- EMA (2006). CVMP/ERA/418282/2005, London. <http://www.emea.europa.eu>
- EMA (1996). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. ICH Topic Q2B. *Validation of Analytical Procedures: Methodology*. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/028195en.pdf>
- Enan, E.E.; El-Sebae, A.H.; Enan, O.H.; El-Fiki, S. (1982). *In-vivo interaction of some organophosphorus insecticides with different biochemical targets in white rats*. J. Environ. Sci. Health B. 17: 549-570.
- Everett, R.W. 1982. *Effect of Dursban 44 on semen output of Holstein bulls*. J. Dairy Sci. 65: 1781-1794.
- Everett, J.W. y Sawyer, C.H. (1946). *Effects of castration and treatment with sex steroids on the synthesis of serum cholinesterase in the rat*. Endocrinology, 39: 323-343.

- Fairbrother, A. y Bennett, J.K. (1988). *The usefulness of cholinesterase measurements*. J. Wildl Dis. 24: 587-593.
- Fishwick, S.K.; Shore, R.F.; Turk, A. y Sparks, T.H. (1996). *Variation of brain and serum cholinesterase activity with age in wild small mammals*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56: 604-611.
- Forsyth, B.A.; Gibbon, A.J. y Pryor, D.E. (1983). *Seasonal variation in anthelmintic response by cattle to dermally applied levamisole*. Aust. Vet. J. 60: 141-146.
- Forslund, K. y Bjorkman, C. (1983). *Cholinesterase in plasma and acetylcholinesterase in erythrocytes from cattle of different breeds and ages and fed different diets*. Acta Vet. Scand. 24: 328-330.
- Forslund, K.; Bjorkman, C. y Abrahamsson, M. (1983). *Cholinesterase levels in blood plasma and erythrocytes from calves, normal delivering cows and cows suffering from parturient paresis*. Acta Vet. Scand. 24: 185-199.
- Fournier, D.; Cuany, A.; Bride, J.M. y Bergé, J.B. (1987). *Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (Musca domestica L.)*. J. Neurochem. 49: 1455-1461.
- Fournier, D.; Bergé, J.B.; Cardoso de Almeida, M.L. y Bordier, C. (1988). *Acetylcholinesterases from Musca domestica and Drosophila melanogaster brain are linked to membranes by a glycopospholipid anchor sensitive to an endogenous phospholipase*. J. Neurochem. 50:1158-1163.
- Frezza, M.; di Padova, C.; Pozzato, G.; Terpin, M.; Barahona, E. y Liebre, C.S. (1990). *High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism*. N. Engl. J. Med. 322: 95-99.
- Friis, C. (1979). *Postnatal development of renal function in piglets: glomerular filtration rate, clearance of PAH and PAH extraction*. Biol. Neonate. 35: 180-187.
- Fukuto, T.R. (1990). *Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides*. Environ. Health Perspect. 87: 245-254.
- Fujimura, A., Sasaki, M., Harada, K.; Kumagai, Y.; Ohashi, K. y Ebihara, A. (1996). *Influences of bathing and hot weather on the pharmacokinetics of a new transdermal clonidine, M-5041T*. J. Clin. Pharmacol. 36(10):892-896.
- Funckes, A.J.; Hayes, G.R. y Hartwell, W.V. (1963). *Urinary excretion of parantitrophenol by volunteers following dermal exposure to parathion at different ambient temperatures*. J. Agric. Food. Chem. 11:455-457
- Gaines, T. (1969). *Acute toxicity of pesticides*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 14: 515-534.

- Galenko-Yaroshevskii, A.P.; Derlugov, L.P.; Ponomarev, V.V. y Dukhanin, A.S. (2003). *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a new local anesthetic agent*. Bull. Exp. Biol. Med. 136:170-173.
- Gallo, M. A. y Lawryk, N. J. (1991). *Organic phosphorus pesticides*. En *Handbook of Pesticide Toxicology: Classes of Pesticides*, Vol. 2 (Eds.. Hayes, W. J. Jr. y. Laws, E.R. Jr.) Academic Press, New York. pp. 917-1123.
- Gandhi, M.; Aweeka, F.; Greenblatt, R.M. y Blaschke, T.F. (2004). *Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 44:499-523.
- Garabrant, D.H.; Aylward, L.L.; Berent, S.; Chen, Q.; Timchalk, C.; Burns, C.J.; Hays, S.M. y Albers, J.W. (2008). *Cholinesterase inhibition in chlorpyrifos workers: Characterization of biomarkers of exposure and response in relation to urinary TCP*. J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. doi: 10.1038/jes.2008.51
- Garcia-Rodriguez, T.; Ferrer, M.; Recio, F. y Castroviejo, J. (1987). *Circadian rhythms of determined blood chemistry values in buzzards and eagle owls*. Comp. Biochem. Physiol. 88: 663-669.
- García, S.; Bovi Mitre, G.; Moreno, I.; Eiman Grossi, M.; Digón, A. y de Titto, E. (2003). *Taller Regional sobre Intoxicaciones por Plaguicidas y Armonización en la Recolección de la Información*.
- Garcia, S.; Seidler, F. y Slotkin, T. (2005). *Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: targeting glial cells*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 19: 455-461.
- Gard, N. y Hooper, M. (1993). *Age-dependent changes in plasma and brain cholinesterase activities of eastern bluebirds and european starlings*. J. Wildlife Diseases, 29: 1-7
- Gaustad, R.; Johnsen, H.; Fonnum, F. (1991). *Carboxylesterases in guinea pig. A comparison of the different isoenzymes with regard to inhibition by organophosphorus compounds in vivo and in vitro*. Biochem. Pharmacol. 42:1335-1343.
- Giacobini, E. (2004). *Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives*. Pharmacol. Res. 50: 433-440.
- Gibaldi, P. y Perrier, D. (1975). *Pharmacokinetics*, 1ª ed. Marcel Decker Inc. New York.
- Gochfeld, M. (2007). *Framework for gender differences in human and animal toxicology*. Environ Res. 104: 4-21.
- Godinho, R.O.; Lima-Landman, M.T.; Souccar, C. y Lapa, A.J. (1987a). *Trophic control of cholinesterase activity in a testosterone-dependent muscle of the rat: effects of castration and denervation*. Exp Neurol.; 96(3): 558-568.

- Godinho, R.O.; Lima-Landman, M.T.; Souccar, C. y Lapa, A.J. (1987b). *Trophic control of cholinesterase activity in a testosterone-dependent muscle of the rat. II. Effects of testosterone administration*. Exp Neurol.; 98(1):93-102.
- Good, J.L.; Khurana, R.K.; Mayer, R.F.; Cintra, W.M. y Albuquerque, E.X. (1993). *Pathophysiological studies of neuromuscular function in subacute organophosphate poisoning induced by phosmet*. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 56: 290-294.
- Goodman, L.R.; Russ, A. y Terpin, M. (1985). *A new early life-stage toxicity test using the California grunion (Leuresthes tenuis) and results with chlorpyrifos*. Ecotoxicol. Environ. Safety 10: 12-21.
- Gordon, C.J.; Grantham, T.A. y Yang, Y. (1997). *Hypothermia and delayed fever in the male and female rat exposed to chlorpyrifos*. Toxicology 118: 149-158.
- Gregory, D.A.; Johnson, D.L.; Thompson, B.H. (1993). *The impact of bran baits treated with the insecticides carbaryl, chlorpyrifos, and dimethoate on the survivorship and reproductive success of non-target mouse populations*. Agric. Ecosys. Environ. 45: 95-103.
- Griffin P.; Mason, H.; Heywood, K. y Cocker j. (1999). *Oral and dermal absorption of chlorpyrifos: a human volunteer study*. Occup. Environ. Med. 56: 10-13.
- Griffin, P.; Payne, M.; Mason, H.; Freedlander, E.; Curran, A.D. y Cocker, J. (2000). *The in vitro percutaneous, penetration of chlorpyrifos*. Hum. Exp. Toxicol. 19: 104-107.
- Grue, C.E.; Powell, G.V. y Gladson, N.L. (1981). *Brain cholinesterase (ChE) activity in nestling starlings: implications for monitoring exposure of nestling songbirds to ChE inhibitors*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 26: 544-547.
- Gürtler, H.; Ketz, H.; Kolb, E.; Schröder, L. y Seidel, H. (1976). *Fisiología Veterinaria*. Acribia. Zaragoza. España.
- Gyrd-Hansen, N.; Friis, C.; Nielsen, P. y Rasmussen, F. (1984). *Metabolism of trimethoprim in neonatal and young pigs: comparative in vivo and in vitro studies*. Acta Pharmacol Toxicol. 55:402.
- Haas, P.J.; Buck, W.B.; Hixon, J.E.; Shanks, R.D.; Wagner, W.C.; Weston, P.G. y Whitmore, H.L. (1983). *Effect of chlorpyrifos on Holstein steers and testosterone-treated Holstein bulls*. Am. J. Vet. Res. 44: 879-881.
- Halbrook, R.S.; Shugart, L.R.; Watson, A.P.; Munro, N.B. y Linnabary, R.D. (1992). *Characterizing biological variability in livestock blood cholinesterase activity for biomonitoring organophosphate nerve agent exposure*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 201: 714-725.
- Haram, K.; Augensen, K. y Elsayed, S. (1983). *Serum protein pattern in normal pregnancy with special reference to acute phase reactants*. Br. J. Obstet. Gynaecol. 90: 139-145.

- Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P.H.; Silman, I. y Sussman, J.L. (1993). *Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 9031-9035.
- Harlin, K.S. y Ross, P.F. (1990). *Enzymatic-spectrophotometric method for determination of cholinesterase activity in whole blood: collaborative study*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73(4): 616-619.
- Hassan, S.A. (1988). *Results of the fourth joint pesticide testing program carried out by the IOBC/WPRS-Working Group, "Pesticides and Beneficial Organisms."* J. Appl. Ent. 105: 321-329.
- Haufe, W.O. (1965). *Bovine tolerance for malathion: an experiment in relation to a case report*. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 29: 102-107.
- Hazelwood, J.; Heath, G. (1976). *A comparison of cholinesterase activity of plasma, erythrocytes and cerebrospinal fluid of sheep, calves, dogs, swine and rabbits*. Am. J. Vet. Res. 37: 741-752.
- Herholz K. (2008). *Acetylcholine esterase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 35 Suppl 1:S25-29.
- Hermann, R.; Ferron, G.M.; Erb, K.; Knebel, N.; Ruus, P.; Paul, J.; Richards, L.; Cnota, H.P. y Troy, S. (2003). *Effects of age and sex on the disposition of retigabine*. Clin. Pharmacol. Ther. 73: 61-70.
- Hill, E.F. (1988). *Brain cholinesterase activity of apparently normal wild birds*. J. Wildl. Dis. 24: 51-61.
- Hill, M.D. y Abramson, F.P. (1988). *The significance of plasma protein binding on the fetal/maternal distribution of drugs at steady-state*. Clin. Pharmacokinet. 14: 156-170.
- Hölzel WG. (1987). *Intra-individual variation of analytes in serum from patients with chronic liver diseases*. Clin. Chem. 33(7):1133-1136.
- Hooser, S.B.; Beasley, V.R.; Sundberg, J.P. y Harlin, K. (1988). *Toxicologic evaluation of chlorpyrifos in cats*. Am. J. Vet. Res. 49: 1371-1375.
- Humphreys, D.J. (1990). *Toxicología Veterinaria*. 3ª Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana de España. Madrid.
- Hunter, D.L.; Lassiter, T.L. y Padilla, S. (1999). *Gestational exposure to chlorpyrifos: comparative distribution of trichloropyridinol in the fetus and dam*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 158: 16-23.

Hutson, W.R.; Roehrkasse, R.L. y Wald, A. (1989). *Influence of gender and menopause on gastric emptying and motility*. *Gastroenterology* 96: 11-17.

Imaoka, S.; Fujita, S. y Funae, Y. (1991). *Age-dependent expression of cytochrome P-450s in rat liver*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1097: 187-192.

Inestrosa, N.C.; Alvarez, A.; Pérez, C.A.; Moreno, R.D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O.I.; Soto, C. y Garrido, J. (1996). *Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme*. *Neuron.* 16: 881-891.

Inestrosa, N.C.; Dinamarca, M.C. y Alvarez, A. (2008). *Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease.* : *FEBS J.* 275: 625-632.

IPCS INCHEM. International Programme of Chemical Safety. (1999). *Chlorpyrifos. Toxicological Evaluations* <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v99pr03.htm>
J. Toxicol. Environ. Health 45: 59-73.

Janus K. y Antoszek, J. (2000). *The effect of sex and age on caffeine pharmacokinetics in cattle*. *Res. Vet. Sci.* 69: 33-37.

Jarvinen, A.W.; Nordling, B.R. y Henry, M.E. (1983). *Chronic toxicity of Dursban (chlorpyrifos) to the fathead minnow (Pimephales promelas) and the resultant acetylcholinesterase inhibition*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 7: 423-434.

Jbilo, O.; L'Hermite, Y.; Talesa, V.; Toutant, J.P. y Chatonnet, A. (1994). *Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase expression in adult rabbit tissues and during development*. *Eur. J. Biochem.* 225:115-124.

Johnson, C.R. (1978). *The effects of sublethal concentrations of five organophosphorus insecticides on temperature tolerance, reflexes, and orientation in Gambusia affinis*. *Zool. J. Linnean Soc.* 64: 63-70.

Johnson, M.K. (1982). *The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus ester: biochemical studies and toxicological applications*. *Rev. Biochem. Toxicol.* 4: 141-212.

Johnston, G.; Walker, C.H.; Dawson, A. y Furnell, A. (1990). *Interactive effects of pesticides in the hybrid red-legged partridge*. *Functional Ecol.* 4: 309-314.

Jokanović, M. y Stojiljković, M.P. (2006). *Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning*. *Eur. J. Pharmacol.* 553: 10-17.

Kaizer, R.R.; da Silva, A.C.; Morsch, V.M.; Correa, M.C. y Schetinger, M.R. (2004). *Diet-induced changes in AChE activity after long-term exposure*. *Neurochem. Res.* 29: 2251-2255.

- Kalia, Y.N. y Guy, R.H. (2001). *Modeling transdermal drug release*. Adv. Drug. Deliv. Rev. 48: 159-172.
- Kaltenbach, M. y Dukic, S. (2003). *Sex-related differences in human pharmacokinetics and pharmacodynamics*. XX vs. XY. 1: 60-63.
- Kami, G.; Merritt, A.M. y Duelly, P. (1984). *Preliminary studies of plasma and extracellular fluid volume in neonatal ponies*. Equine Vet. J. 16: 356-358.
- Karanth, S. y Pope, C. (2000). *Carboxylesterase and A-esterase activities during maturation and aging: relationship to the toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats*. Toxicol. Sci. 58: 282-289.
- Karanth, S. y Pope, C. (2003). *Age-related effects of chlorpyrifos and parathion on acetylcholine synthesis in rat striatum*. Neurotoxicol. Teratol. 25: 599-606.
- Karlsen, R.L.; Sterri, S.; Lyngaas, S. y Fonnum, F. (1981). *Reference values for erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase activities in children, implications for organophosphate intoxication*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 41: 301-302.
- Kawashima, C.; Kida, K.; Hayashi, K.G.; Amaya Montoya, C.; Kaneko, E.; Matsunaga, N.; Shimizu, T.; Matsui, M.; Miyake, Y.; Schams, D. y Miyamoto, A. (2007). *Changes in plasma metabolic hormone concentrations during the ovarian cycles of Japanese black and holstein cattle*. J. Reprod. Dev. 53(2):247-254.
- Khan, A.A.; Coppock, R.W.; Schuler, M.M. y Lillie, L.E. (1988). *In vitro and in vivo effects of dichlorvos on blood cholinesterase activities of cattle*. Am. J. Vet. Res. 49: 1184-1187.
- Kielhorn, J.; Melching-Kollmuss, S. y Mangelsdorf, I. (2006). *Dermal absorption*. World Health Organization. Switzerland, pp 1-192.
- Koenigsberger C, Chiappa S, Brimijoin S. (1997). *Neurite differentiation is modulated in neuroblastoma cells engineered for altered acetylcholinesterase expression*. J. Neurochem. 69: 1389-1397.
- Kolars, J.C.; Schmiedlin-Ren, P.; Dobbins, W.O.; Schuetz, J.; Wrighton, S.A. y Watkins, P.B. (1992). *Heterogeneity of cytochrome P450III_A expression in rat gut epithelia*. Gastroenterology 102:1186-1198
- Koley, K.M.; Chakraborty, A.K.; Choudhury, A.; Bhattacharyya, A.; Mandal, T.K.; Juliet, S. (1997). *Toxicokinetic and residue studies of chlorpyrifos following oral administration in goats*. J. Vet. Pharmacol. Therap. 20, Suppl. 1, 287.
- Koritz, G.D. (1983). *Influence of ruminant gastrointestinal physiology on the pharmacokinetics of drugs in dosage forms administered orally*. En: *Veterinary Pharmacology and Toxicology*. (Eds.: Ruckebusch, Y.; Toutain, P.L. y Koritz, G). MTP Press Limited. Lancaster. England.

- Kostović, I.; Skavić, J. y Strinović, D. (1988). *Acetylcholinesterase in the human frontal associative cortex during the period of cognitive development: early laminar shifts and late innervation of pyramidal neurons*. *Neurosci. Lett.* 90: 107-112.
- Kousba, A.A.; Sultatos, L.G.; Poet, T.S. y Timchalk, C. (2004). *Comparison of chlorpyrifos-oxon and paraoxon acetylcholinesterase inhibition dynamics: potential role of a peripheral binding site*. *Toxicol. Sci.* 80: 239-248.
- Kousba, A.A.; Poet, T.S. y Timchalk, C. (2007). *Age-related brain cholinesterase inhibition kinetics following in vitro incubation with chlorpyrifos-oxon and diazinon-oxon*. *Toxicol. Sci.* 95: 147-55.
- Krill, S.L.; Knutson, K. y Higuchi, W.I. (1992). *The stratum corneum lipid thermotropic phase behavior*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1112(2):281-286.
- Kutty, K.M. y Payne, R.H. (1994). *Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism*. *J. Clin. Lab. Anal.* 8:247-250.
- Kyerematen, G.A.; Owens, G.F.; Chattopadhyay, B.; deBethizy, J.D. y Vesell, E.S. (1988) *Sexual dimorphism of nicotine metabolism and distribution in the rat. Studies in vivo and in vitro*. *Drug. Metab. Dispos.* 16: 823-828.
- Lal, S.; Saxena, D.M. y Lal, R. (1987). *Effects of DDT, fenitrothion and chlorpyrifos on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in Anabaena (Arm 310) and Aulosira fertilissima*. *Agric. Ecosys. Environ.* 19: 197-209.
- Lanning, C.L.; Fine, R.L.; Sachs, C.W.; Rao, U.S.; Corcoran, J.J. y Abou-Donia, M.B. (1996). *Chlorpyrifos oxon interacts with the mammalian multidrug resistance protein, P-glycoprotein*. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 47(4): 395-407.
- Layer, P.G. y Willbold, E. (1995). *Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease*. *Prog. Histochem. Cytochem.* 29: 1-94.
- Layer, P.G.; Weikert, T. y Alber, R. (1993). *Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism*. *Cell. Tissue. Res.* 273: 219-226.
- Lee, S.F.; Chen, Z.Y. y Fong, W.P. (2001). *Gender difference in enzymes related with alcohol consumption in hamster, an avid consumer of alcohol*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 129: 285-293.
- Lein, D.H.; Maylin, G.A.; Hillman, R.B.; Rebhun, W.C.; Henion, J.D. y Ebel, J.G. (1982). *Chlorpyrifos (Dursban 44r) toxicity in dairy bulls*. *Cornell Vet.* 72: 3-58.
- Lepage, L.; Schiele, F.; Gueguen, R. y Siest, G. (1985). *Total cholinesterase in plasma: biological variations and reference limits*. *Clin. Chem.* 31(4):546-550.

- Lev-Lehman, E.; Deutsch, V.; Eldor, A. y Soreq, H. (1997). *Immature human megakaryocytes produce nuclear-associated acetylcholinesterase*. *Blood*. 89: 3644-3653.
- Lewis, P.; Lowing, R. y Gompertz, D. (1981). *Automated discrete kinetic method for erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase*. *Clin. Chem*. 27:926-929.
- Li, W.; Matthews, C.; Distech, C.; Costa, L. y Furlong, C. (1997). *Paraoxonase (PON1) gene in mice: sequencing, chromosomal localization and developmental expression*. *Pharmacogenetics* 7: 137-144.
- Lindahl, A.; Ungell, A.L.; Knutson, L. y Lennernas, H. (1997). *Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in men and women*. *Pharm. Res*. 14: 497-502.
- Liu, C.Y.; Chen, L.B.; Liu, P.Y.; Xie, D.P. y Wang, P.S. (2002). *Effects of progesterone on gastric emptying and intestinal transit in male rats*. *World J. Gastroenterol*. 8: 338-841
- Lockridge, O.; Eckerson, H.W. y La Du, B.N. (1979). *Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase*. *J. Biol. Chem.*; 254: 8324-8330.
- Lockridge, O.; Adkins, S. y La Du, B.N. (1987). *Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase*. *J. Biol. Chem.*; 262: 12945-12952.
- Long, G.G.; Scheidt, A.B.; Everson, R.J. y Oehme, F.W. (1986). *Age related susceptibility of newborn pigs to the cutaneous application of chlorpyrifos*. *Vet. Hum. Toxicol*. 28: 297-299.
- Lotti, M. (1991). *The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy*. *Crit. Rev. Toxicol*. 21: 465-487.
- Lotti, M. (1995). *Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation*. *Clin. Chem*. 41:1814-1818.
- Lotti, M. y Moretto, A. (2005). *Organophosphate-induced delayed polyneuropathy*. *Toxicol. Rev*. 24: 37-49.
- Lush, M.J.; Li, Y.; Read, D.J.; Willis, A.C. y Glynn, P. (1998). *Neuropathy target esterase and a homologous Drosophila neurodegeneration-associated mutant protein contain a novel domain conserved from bacteria to man*. *Biochem. J*. 332: 1-4.
- Ma, W. y J. Bodt. (1993). *Differences in toxicity of the insecticide chlorpyrifos to six species of earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae) in standardized soil tests*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 50: 864-870.
- Ma, T. y Chambers, J.E. (1994). *Kinetic parameters of desulfuration and dearylation of parathion and chlorpyrifos by rat liver microsomes*. *Food. Chem. Toxicol.*, 32: 763-767.

- Ma, J.; Graves, J.; Bradbury, J.A.; Zhao, Y.; Swope, D.L.; King, L.; Qu, W.; Clark, J.; Myers, P.; Walker, V.; Lindzey, J.; Korach, K.S. y Zeldin, D.C. (2004). *Regulation of mouse renal CYP2J5 expression by sex hormones*. Mol. Pharmacol. 65, 730-743.
- Machala, M.; Soucek, P.; Neca, J.; Ulrich, R.; Lamka, J.; Szotáková, B. y Skálová, L. (2003). *Inter-species comparisons of hepatic cytochrome P450 enzyme levels in male*
- MacLeod, S.M.; Renton, K.W. y Eade, N.R. (1972). *Development of hepatic microsomal drug-oxidizing enzymes in immature male and female rats*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 183: 489-498.
- Magnusson, B.M.; Walters, K.A. y Roberts, M.S. (2001). *Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement*. Adv. Drug. Deliv. Rev. 50(3):205-227.
- Maguire, C.C. y Williams, B.A. (1987). *Cold stress and acute organophosphorus exposure: interaction effects on juvenile northern bobwhite*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 16: 477-481
- Makovi, C.M. y McMahon, B.M. (1994). *Pesticide Analytical Manual*. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Vol. 1, 3rd Edition Section 304. United States.
- Marable, B.R.; Maurissen, J.P.; Mattsson, J.L. y Billington, R. (2007). *Differential sensitivity of blood, peripheral, and central cholinesterases in beagle dogs following dietary exposure to chlorpyrifos*. Regul. Toxicol. Pharmacol. 47: 240-248.
- Marco, L. y do Carmo Carreiras, M. (2006). *Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease*. Recent Patents CNS Drug Discov. 1: 105-111.
- Marrs, T. y Allister Vale, J. (2006). *Management of organophosphorus pesticide poisoning*. En: *Toxicology Of Organophosphate & Carbamate Compounds*. (Ed.: Gupta, R.). Elsevier Academic Press. California. United States of America, p 127-143.
- Martinex-Toledo, M.V.; Salmeron, V. y Gonzalez-Lopez, J. (1992). *Effect of the insecticides methylpyrimifos and chlorpyrifos on soil microflora in an agricultural loam*. Plant and Soil 147: 25-30.
- Martinez, M. (1998). *Noncompartmental methods of drugs characterization: statistical moment theory*. JAVMA. 213: 974-983.
- Mason, H.J. (2000). *The recovery of plasma cholinesterase and erythrocyte acetylcholinesterase activity in workers after over-exposure to dichlorvos*. Occup. Med.; 50: 343-347.
- Masson, P.; Froment, M.T.; Fortier, P.L.; Visicchio, J.E.; Bartels, C.F. y Lockridge, O. (1998). *Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters*. Biochim. Biophys. Acta. 1387: 41-52.

- Massoulié, J.; Pezzementi, L.; Bon, S.; Krejci, E. y Vallette, F.M. (1993). *Molecular and cellular biology of cholinesterases*. Prog. Neurobiol. 41: 31-91.
- Mattsson, J.L.; Wilmer, J.W.; Shankar, M.R.; Berdasco, N.M.; Crissman, J.W.; Maurissen, J.P. y Bond, D.M. (1996). *Single-dose and 13-week repeated-dose neurotoxicity screening studies of chlorpyrifos insecticide*. Food Chem. Toxicol. 34: 393-405.
- Mattsson, J.L.; Maurissen, J.P.; Nolan, R.J. y Brzak, K.A. (2000). *Lack of differential sensitivity to cholinesterase inhibition in fetuses and neonates compared to dams treated perinatally with chlorpyrifos*. Toxicol. Sci. 53: 438-446.
- Maul, J. y Farris, J. (2004). *The Effect of Sex on Avian Plasma Cholinesterase Enzyme Activity: A Potential source of variation in an avian biomarker endpoint*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 47: 253-258.
- Mayack, D. y Martin, T. (2003). *Age-dependent changes in plasma and brain cholinesterase activities of house wrens and european starlings*. J. Wildl. Dis. 39: 627-637.
- McCollister, S.B.; Kociba, R.J.; Humiston, C.G. y McCollister, D.D. (1974). *Studies on the acute and long-term oral toxicity fo chlorpyrifos (0,0-diethyl-0(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate)*. Food. Cosmet. Toxicol. 12: 45-61.
- McKellar, Q.A.; Sanchez Bruni, S.F. y Jones, D.G. (2004). *Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine*. J. Vet. Pharmacol. Ther. 27: 503-514.
- McQueen, M.J. (1995). *Clinical and analytical considerations in the utilization of cholinesterase measurements*. Clin. Chim. Acta. 237: 91-105.
- Meerdink, G.L. (1989). *Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning in large animals*. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 5: 375-389.
- Meibohm, B.; Beierle, I. y Derendorf, H. (2002). *How important are gender differences in pharmacokinetics*. Clin. Pharmacokinet. 41, 329-342.
- Meuling, W.J.; Ravensberg, L.C.; Roza, L.; van Hemmen, J.J (2005). *Dermal absorption of chlorpyrifos in human volunteers*. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 78: 44-50.
- Mezzadra, C. (2005). *Los cruzamientos en bovinos para carne: una herramienta interesante*. INTA Balcarce. www.inta.gov.ar/balcarce/genetica/mezzadraCruzam.htm
- Minic, J.; Molgó, J.; Karlsson, E. y Krejci, E. (2002). *Regulation of acetylcholine release by muscarinic receptors at the mouse neuromuscular junction depends on the activity of acetylcholinesterase*. Eur. J. Neurosci. 15: 439-448.

- Miranda, H.F.; Moreu, G.M.; Santiago, P.A. y Wolstenholme, W.W. (1987). *Castration and tolerance induces changes in the levels of the activity of acetylcholinesterase in the isolated vas deferens of the rat*. *Neuropharmacology*; 26(10):1529-1534.
- Mohammad, F.K.; St Omer, V.E. (1982). *Modifications of Michel's electrometric method for rapid measurement of blood cholinesterase activity in animals: a minireview*. *Vet. Hum. Toxicol.* 24(2):119-121.
- Mohammad, F.K.; Faris, G.A. y Al-Kassim, N.A. (1997). *A modified electrometric method for measurement of erythrocyte acetylcholinesterase activity in sheep*. *Vet. Hum. Toxicol.* 39(6):337-339.
- Mohammad, F.K.; Faris, G.A.; Alias, A.S. y Al-Baggou, B., (2005). *Blood cholinesterase activities in cattle, sheep and goats measured by a modified electronic method*. *J. An. Vet. Adv.* 4: 923-926.
- Mohammad, F.K.; Alias, A.S. y Ahmed, O.A. (2007a). *Electrometric measurement of plasma, erythrocyte, and whole blood cholinesterase activities in healthy human volunteers*. *J. Med. Toxicol.* 3(1):25-30.
- Mohammad, F.K.; Alias, A.S.; Faris, G.A. y Al-Baggou, B.Kh. (2007b). *Application of an electrometric method for measurement of blood cholinesterase activities in sheep, goats and cattle treated with organophosphate insecticides*. *J. Vet. Med. A* 54(3):140-143.
- Monteiro-Riviere, N.A.; Bristol, D.G.; Manning, T.O.; Rogers, R.A. y Riviere J.E. (1990). *Interspecies and interregional analysis of the comparative histologic thickness and laser Doppler blood flow measurements at five cutaneous sites in nine species*. *J. Invest. Dermatol.* 95: 582-586.
- Morgan, A.A. (1982). *Apnoea following suxamethonium: the genetic study of four generations of a family*. *J. Med. Genet.* 19: 22-25.
- Morgan, E.W.; Yan, B.; Greenway, D. y Parkinson, A. (1994). *Regulation of two rat liver microsomal carboxylesterase isozymes: species differences, tissue distribution, and the effects of age, sex, and xenobiotic treatment of rats*. *Arch. Biochem. Biophys.* 315: 513-526.
- Mortensen, S.; Chanda, S.; Hooper, M. y Padilla, S. (1996). *Maturation differences in chlorpyrifos-oxonase activity may contribute to age-related sensitivity to chlorpyrifos*. *J. Biochem Toxicol.* 11: 279-287.
- Mortensen, S.; Hooper, M.J. y Padilla, S. (1998). *Rat brain acetylcholinesterase activity: developmental profile and maturational sensitivity to carbamate and organophosphorus inhibitors*. *Toxicology* 125:13-19.
- Moser, V.C. (2000). *Dose-response and time-course of neurobehavioral changes following oral chlorpyrifos in rats of different ages*. *Neurotoxicol. Teratol.* 22: 713-723.

Moser, V.C. y Padilla, S. (1998). *Age- and gender-related differences in the time course of behavioral and biochemical effects produced by oral chlorpyrifos in rats*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 149: 107-119.

Moser, V.C.; Chanda, S.M.; Mortensen, S.R. y Padilla, S. (1998). *Age- and gender-related differences in sensitivity to chlorpyrifos in the rat reflect developmental profiles of esterase activities*. Toxicol. Sci. 46: 211-222.

Moses, G.C.; Tuckerman, J.F. y Henderson, A.R. (1986). *Biological variance of cholinesterase and 5'-nucleotidase in serum of healthy persons*. Clin. Chem. 32: 175-177.

Mount, M.E. (1984). *Comparison of measurement of dialkyl phosphates in milk/urine and blood cholinesterase and insecticide concentrations in goats exposed to the organophosphate insecticide, imidan*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 72(2): 236-244.

Munro, N.B.; Shugart, L.R.; Watson, A.P. y Halbrook, R. (1991). *Cholinesterase activity in domestic animals as a potential biomonitor for nerve agent and other organophosphate exposure*. JAVMA 199: 103-115.

Muralidharan, M. (2006). *Certain factors influencing the skin thickness in exotic cattle*. Tamilnadu J. Vet. An. Sci. 2: 93-95.

Murphy, S. D. (1982). *Toxicity and hepatic metabolism of organophosphate insecticides in developing rat*. En: *Environmental Factors in Human Growth and Development* (Eds.: Hunt, V.R.; Smith, M.K. y Worth, D.), Report No. 11, pp. 125-134. Gold Spring Harbor Laboratory, New York.

Murphy, S. y DuBois, K. (1958). *The influence of various factors on the enzymatic conversion of organic thiophosphates to anticholinesterase agents*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 124: 194-202

Muto, M.A.; Lobelle, F.; Bidanset, J.H. y Wurpel, J.N. (1992). *Embryotoxicity and neurotoxicity in rats associated with prenatal exposure to Dursban*. Vet. Hum. Toxicol. 34: 498-501.

Nebbia, C.; Dacasto, M.; Rossetto Giaccherino, A.; Giuliano Albo, A.; Carletti, M. (2003). *Comparative expression of liver cytochrome P450-dependent monooxygenases in the horse and in other agricultural and laboratory species*. Vet J. 165: 53-64.

Nelson, M.C.; Jalal, S.M.; Larson, O.R. (1990). *Genotoxicity of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos based on human lymphocyte culture*. Cytologia 55: 589-592.

Nolan, R.J.; Rick, D.L.; Freshour, N.L. y Saunders, J.H. (1984). *Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 73: 8-15.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/intro.html>

Notarianni, L.J. (1990). *Plasma protein binding of drugs in pregnancy and in neonates*. Clin. Pharmacokinet. 18: 20-36.

Notarianni, L.J. (1990). *Plasma protein binding of drugs in pregnancy and in neonates*. Clin. Pharmacokinet. 18: 20-36.

Nouws, J.F. (1992). *Pharmacokinetics in immature animals: a review*. J. Anim. Sci. 70: 3627-3634.

Nouws, J.F.; Mevius, D.; Vree, T.B.; Baakman, M. y Degen, M. (1988). *Pharmacokinetics, metabolism, and renal clearance of sulfadiazine, sulfamerazine, and sulfamethazine and of their N4-acetyl and hydroxy metabolites in calves and cows*. Am. J. Vet. Res. 49: 1059-1065.

Nouws, J.F.; Vree, T.B.; Degen, M. y Mevius, D. (1991). *Pharmacokinetics of a sulphamethoxazole/trimethoprim formulation in pigs after intravenous administration*. Vet. Q. 13: 148-154.

Omenn, G.S. (1987) The role of genetic differences in human susceptibility to pesticides. In: *Toxicology of Pesticides: Experimental, Clinical and Regulatory Perspectives* (Eds: Costa, L.G., Galli, C.L. y Murphy, S.D.), Springer-Verlag, Berlin,.

Onor, M.L.; Trevisiol, M. y Aguglia E. (2007). *Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update*. Clin. Interv. Aging. 2: 17-32.

Osweiler, G.; Carson, t.; Buck, W. y Van-Gelder, G. (1985). *Clinical and diagnostic veterinary toxicology*. 3 ed. Kendall Publishing, Co., 298-317.

Overstreet, D.H.; Russell, R.W.; Helps, S.C.; Runge, P. y Prescott, A.M. (1979). *Sex differences following pharmacological manipulation of the cholinergic system by DFP and pilocarpine*. Psychopharmacology (Berl.); 61(1): 49-58.

Overstreet, D.H.; Russell, R.W., Kerni, W. y Netherton, R.A. (1981). *The influence of ovariectomy on the sex-dependent effects of the anticholinesterase diisopropyl fluorophosphate*. Psychopharmacology (Berl.); 74(4): 391-392.

Padilla, S.; Buzzard, J. y Moser, V.C. (2000). *Comparison of the role of esterases in the differential age-related sensitivity to chlorpyrifos and methamidophos*. Neurotoxicology. 21: 49-56.

Palmer, J.S. (1971). *Toxicity of famfur to young Brahman heifers and bulls*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 159(10): 1263-1266.

Palmer, J.S.; Rowe, L.D. y Crookshank, H.R. (1980). *Effect of age on tolerance of calves to chlorpyrifos*. Am. J. Vet. Res. 41: 1323-1325.

- Palovaara, S.; Typbring, G. y Laine, K. (2003). *The effect of ethinylestradiol and levonorgestrel on the CYP2C19-mediated metabolism of omperazole in healthy female subjects*. Br. J. Clin. Pharmacol. 56, 232-237.
- Palylyk-Colwell, E.L. y Jamali, F. (2004). *Effect of gonadectomy and hormones on sex differences in ketoprofen enantiomer glucuronidation and renal excretion of formed glucuronides in the rat*. Pharm. Res. 21, 989-995.
- Paraoanu, L.E. y Layer, P.G. (2008). *Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation*. FEBS J. 275: 618-624.
- Pardio, V.T.; Ibarra, N.; Rodríguez, M.A. y Waliszewski, K.N. (2001). *Use of cholinesterase activity in monitoring organophosphate pesticide exposure of cattle produced in tropical areas*. J. Agric. Food. Chem. 49: 6057-6062.
- Pardío, V.T.; Ibarra, N. de J.; Waliszewski, K.N. y López, K.M. (2007). *Effect of coumaphos on cholinesterase activity, hematology, and biochemical blood parameters of bovines in tropical regions of Mexico*. J. Environ. Sci. Health. B. 42: 359-366.
- Pastino, G.M.; Flynn, E.J. y Sulfatos, L.G. (2000). *Genetic polymorphisms in ethanol metabolism: issues and goals for physiologically based pharmacokinetic modeling*. Drug Chem. Toxicol. 23:179-201
- Patocka, J.; Kuca, K. y Jun, D. (2004). *Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase--important enzymes of human body*. Acta Medica (Hradec Kralove). 47: 215-228.
- Pearson, E.G.; Craig, A.M. y Lassen, E.D. (1986). *Suspected chlorpyrifos toxicosis in a llama, and plasma pseudocholinesterase activity in llamas given chlorpyrifos*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 189: 1062-1064.
- Peraica, M.; Capodicasa, E.; Moretto, A. y Lotti, M. (1993). *Organophosphate polyneuropathy in chicks*. Biochem. Pharmacol. 45: 131-135.
- Perucca, E. y Crema, A. (1982). *Plasma protein binding of drugs in pregnancy*. Clin. Pharmacokinet. 7: 336-352
- Poet, T.S. (2000). *Assessing dermal absorption*. Toxicol. Sci. 58(1):1-2.
- Pope, C.N. y Chakraborti, T.K. (1992). *Dose-related inhibition of brain and plasma cholinesterase in neonatal and adult rats following sublethal organophosphate exposures*. Toxicology 73: 35-43.
- Pope, C.N. y Liu, J. (1997). *Age-related differences in sensitivity to organophosphorus pesticides*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 4: 309-314.
- Pope, C.N.; Chakraborti, T.K.; Chapman, M.L.; Farrar, J.D. y Arthun, D. (1991) *Comparison of in vivo cholinesterase inhibition in neonatal and adult rats by three organophosphorothioate insecticides*. Toxicology. 68:51-61.

- Pope, C.N.; Chakraborti, T.K.; Chapman, M.L. y Farrar, J.D. (1992). *Long-term neurochemical and behavioral effects induced by acute chlorpyrifos treatment*. Pharmacol. Biochem. Behav. 42: 251-256.
- Pope, C.N.; Karanth, S.; Liu, J. y Yan, B. (2005). *Comparative carboxylesterase activities in infant and adult liver and their in vitro sensitivity to chlorpyrifos oxon*. Regul. Toxicol. Pharmacol. 42: 64-69.
- Quistad, G.B. y Casida, J.E. (2004). *Lysophospholipase inhibition by organophosphorus toxicants*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 196: 319-326.
- Racke, K.D. (1993). *Environmental fate of chlorpyrifos*. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 131: 1-150.
- Ralston, J.S.; Rush, R.S.; Doctor, B.P. y Wolfe, A.D. (1985). *Acetylcholinesterase from fetal bovine serum. Purification and characterization of soluble G4 enzyme*. J. Biol. Chem. 260: 4312-4318.
- Ramachandran, C. y Fleisher, D. (2000). *Transdermal delivery of drugs for the treatment of bone diseases*. Adv. Drug. Deliv. Rev. 42: 197-223.
- Rattner, B.A. y Fairbrother, A. (1991). *Biological variability and the influence of stress on Cholinesterase activity*. En: *Cholinesterase-inhibiting insecticides: their impact on wildlife and the environment*. (Ed: Mineau, P.), Elsevier. The Netherlands, pp 89-107.
- Raushel, F. (2002). *Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents*. Curr. Op. Microbiol. 5: 288-295.
- Reiche, R. (1983). *Drug disposition in the new born*. En: *Veterinary Pharmacology and Toxicology*. (Eds.: Ruckebusch, P., Toutain, P. y Koritz, G). Proc. 2º Congr. Europ. Assoc. Vet. Pharmacol. Toxicol. Spt. 3-17, 1982. univ of Toulouse, France. Avi Publishin Co.
- Richardson, J. y Chambers, J. (2003). *Effects of gestational exposure to chlorpyrifos on postnatal central and peripheral cholinergic neurochemistry*. J. Toxicol. Environ. Health A 66: 275-289.
- Rider, J.; Hodges, J.; Swader, J y Wiggins, A. (1957). *Plasma and red cell cholinesterase in 800 healthy blood donors*. J. Lab. Clin. Med. 50: 376-383.
- Riviere, J.E. (1999). *Comparative Pharmacokinetics Principles, Techniques, and Applications*. Iowa State Press. 327 pp..
- Robbins, W.; Hopkins, T. y Roth, R. (1958). *Application of the colorimetric whole blood method to the measurement of red cells cholinesterase activity*. J. Econ. Entomol., 51: 326-329.

- Roberts, B.L y Dorough, H.W. (1984). *Relative toxicities of chemicals to the earthworm Eisenia foetida*. Environ. Toxicol. Chem. 3: 67-78.
- Roberts, W.L.; Kim, B.H. y Rosenberry, T.L. (1987). *Differences in the glycolipid membrane anchors of bovine and human erythrocyte acetylcholinesterases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 7817-7821.
- Rosati, A.; Maniori, S.; Decorti, G.; Candussio, L.; Giraldi, T. y Bartoli, F. (2003). *Physiological regulation of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and cytochrome P450 3A2 during rat ontogeny*. Dev. Growth Differ. 45(4): 377-387.
- Rowland, M. y Tozer, T. (1995). *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Roy, T. S.; Andrews, J. E.; Seidler, F. J. y Slotkin, T. A. (1998). *Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos*. Teratology 58, 62-68.
- Roy, C.; Grolleau, G.; Chamoulaud, S. y Riviere, J.L. (2005). *Plasma B-esterase activities in European raptors*. J. Wildl. Dis. 41:184-208.
- Rumenjak V. (1998). *Distribution of human erythrocyte acetylcholinesterase according to age, sex and pregnancy*. Acta Med. Croatica 52: 187-189.
- ruminants*. Arch. Toxicol. 77: 555-560.
- Ryhänen, R.; Honkakoski, P.; Harri, M.; Ylitalo, P. y Hänninen, O. (1988). *Effect of the cold environment on organophosphate toxicity and inhibition of cholinesterase activity*. Gen. Pharmacol. 19: 741-745.
- Sadik, R.; Abrahamsson, H. y Stotzer, P. (2003). *Gender differences in gut transit shown with a newly developed radiological procedure*. Scand. J. Gastroenterol. 38:36-42
- Sanz, P. y Repetto, M. (1995). *Implicaciones toxicológicas de las enzimas colinesterasas*. En: *Toxicología Avanzada*. (Ed. Repetto, M.) Ediciones Díaz de Santos, SA. Madrid, España p 117-145.
- Saunders, N.R. (1977). *Ontogeny of the blood-brain barrier*. Exp. Eye Res. 25:523-550
- Sawyer, C.; Everret, J. (1946). *Effects of various hormonal conditions in the intact rat on the synthesis of serum cholinesterases*. Endocrinology. 39: 307-322.
- Scarratt, W.K. y Blodgett, D.J. (1986). *Chlorpyrifos intoxication in a bull*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 188: 1444-1446.
- Schallreuter, K.U.; Gibbons, N.C.; Elwary, S.M.; Parkin, S.M. y Wood, J.M. (2007). *Calcium-activated butyrylcholinesterase in human skin protects acetylcholinesterase against suicide inhibition by neurotoxic organophosphates*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 355: 1069-1074.

- Scheidt, A.B.; Long, G.G.; Knox, K. y Hubbard, S.E. (1987). *Toxicosis in newborn pigs associated with cutaneous application of an aerosol spray containing chlorpyrifos*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 191: 1410-1412.
- Schlinke, J.C. (1970). *Chronic toxicity of Dursban in chickens*. J. Econ. Entomol. 63: 319.
- Schumacher, M.; Camp, S.; Maulet, Y.; Newton, M.; MacPhee-Quigley, K.; Taylor, S.; Friedmann, T. y Taylor, P. (1986). *Primary structure of Torpedo californica acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence*. Nature. 319: 407-409.
- Schuttler, J. y Ihmsen, H. (2000). *Population pharmacokinetics of propofol: a multicenter study*. Anesthesiology 92: 727-738.
- Schwark, W.S. (1992). *Factors that affect drug disposition in food-producing animals during maturation*. J Anim. Sci. 70: 3635-3645.
- Schwartz, J.B. (2003). *The influence of sex on pharmacokinetics*. Clin. Pharmacokinet. 42: 107-121.
- Schwarz, M.; Glick, D.; Loewenstein, Y. y Soreq, H. (1995). *Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons*. Pharmacol. Ther. 67: 283-322.
- Shingu, H.; Hodate, K.; Kushibiki, S.; Ueda, Y.; Watanabe, A.; Shinoda, M. y Matsumoto, M. (2002). *Breed differences in growth hormone and insulin secretion between lactating Japanese Black cows (beef type) and Holstein cows (dairy type)*. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 132(4): 493-504.
- Short, C.R. y Tumbleson, M.E. (1973). *Binding of drugs to plasma proteins of swine during the perinatal period*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 24: 612-624.
- Sidell, F.R. y Kaminskis, A. (1975). *Temporal intrapersonal physiological variability of cholinesterase activity in human plasma and erythrocytes*. Clin. Chem. 21: 1961-1963.
- Silman, I. y Sussman, J.L. (2005). *Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology*. Curr. Opin. Pharmacol. 5: 293-302.
- Silman, I. y Sussman, J.L. (2008). *Acetylcholinesterase: how is structure related to function?*. Chem. Biol. Interact. 175: 3-10.
- Silvestri, G.R. (1977). *New techniques to measure blood cholinesterase activity in domesticated animals*. Am. J. Vet. Res. 38: 659-662.
- Simpson, V.R. (1984). *Chlorpyrifos and wildlife*. Vet. Rec. 114: 101-102.
- Singer, A.J. y Brandt, L.J. (1991). *Pathophysiology of the gastrointestinal tract during pregnancy*. Am. J. Gastroenterol. 86: 1695-1712.

- Singh, M. y Rishi, S. (2005). *Plasma acetylcholinesterase as a biomarker of triazophos neurotoxicity in young and adult rats*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 19: 471-476.
- Smith, G.N.; Watson, B.S. y Fischer, F.S. (1967). *Investigations on Dursban insecticide. Metabolism of [³⁶Cl] O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothiate in rats*. Agric. Food Chem., 15. 132-138.
- Sobti, R.C.; Krishan, A.; Pfaffenberger, C.D. (1982). *Cytokinetic and cytogenetic effects of some agricultural chemicals on human lymphoid cells in vitro: organophosphates*. Mut. Res. 102: 89-102.
- Sorensen, K.; Brodbeck, U.; Rasmussen, A.G. y Norgaard-Pedersen, B. (1986). *Normal human serum contains two forms of acetylcholinesterase*. Clin. Chim. Acta. 158: 1-6.
- Soreq, H. y Seidman, S. (2001). *Acetylcholinesterase: new roles for an old actor*. Nat. Rev. Neurosci. 2: 294-302.
- Sowinski, K.M.; Abel, S.R.; Clark, W.R. y Mueller, B.A. (1999). *Effect of gender on the pharmacokinetics of ofloxacin*. Pharmacotherapy 19: 442-446
- Srivastava, S.K.; Tiwari, P.R. y Srivastav, A.K. (1990). *Effects of chlorpyrifos on the kidney of freshwater catfish, Heteropneustes fossilis*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 45: 748-751
- Stedman, E.; Stedman, E. y Easson, L.H. (1932). *Choline-esterase. An enzyme present in the blood-serum of the horse*. Biochem. J. 26: 2056-2066.
- Su, M.Q.; Kinoshita, F.K.; Frawley, J.P. y DuBois, K.P. (1971). *Comparative inhibition of aliesterases and cholinesterase in rats fed eighteen organophosphorus insecticides*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 20: 241-249
- Sultatos, L.G. (1991). *Metabolic activation of the organophosphorus insecticides chlorpyrifos and fenitrothion by perfused rat liver*. Toxicology. 68: 1-9.
- Sultatos, L.G.; Minor, L.D. y Murphy, S.D (1985). *Metabolic activation of phosphorothionate pesticides: role of the liver*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 232: 624-626.
- Sussman, J.L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L. y Silman, I. (1991). *Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein*. Science. 253: 872-879.
- Szotáková, B.; Baliharová, V.; Lamka, J.; Nozinová, E.; Wsól, V.; Velík, J.; Machala, M. Neca, J.; Soucek, P.; Susová, S. y Skálová, L. (2004). *Comparison of in vitro activities of biotransformation enzymes in pig, cattle, goat and sheep*. Res. Vet. Sci. 76(1): 43-51.

- Tang, J.; Cao, Y.; Rose, R.L.; Brimfield, A.A.; Dai, D.; Goldstein, J.A. y Hodgson, E. (2001). *Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes*. Drug. Metab. Dispos. 29: 1201-1204.
- Tang, J.; Rose, R. y Chambers, J. (2006). *Metabolism of organophosphorus and carbamate pesticides*. En: *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*. (Ed.: Gupta, R.). Elsevier Academic Press. California. United States of America, p 127-143.
- Taylor, P. (2006). *Anticolinesterasas*. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 11ed. (Eds. Brunton, L; Lazo, J. y Parker, K.). Colombia. 201-216.
- Taylor, D.C.; McEwan, A.D. y Burke, W.M. (1983). *Cutaneous application of levamisole to cattle: variations in bioavailability related to season and ambient temperature*. Vet. Rec. 112: 481.
- Tecles, F. y Cerón, J.J. (2001). *Determination of whole blood cholinesterase in different animal species using specific substrates*. Res. Vet. Sci. 70: 233-238.
- Tecles, F.; Martínez Subiela, S.; Bernal, J. y Cerón, J. (2000). *Use of Whole Blood for Spectrophotometric of Cholinesterase Activity in Dogs*. Vet. J. 160: 242-249.
- Terry, A. V.; Stone, J. D.; Buccafusco, J. J.; Sickles, D. W.; Sood, A. y Prendergast, M. A. (2003) *Repeated exposures to subthreshold doses of chlorpyrifos in rats: hippocampal damage, impaired axonal transport, and deficits in spatial learning*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 305, 375-384
- Thiermann, H.; Kehe, K.; Steinritz, D.; Mikler, J.; Hill, I.; Zilker, T. Eyer, P. y Worek F. (2007). *Red blood cell acetylcholinesterase and plasma butyrylcholinesterase status: important indicators for the treatment of patients poisoned by organophosphorus compounds*. Arh. Hig. Rada. Toksikol. 58: 359-366.
- Thirugnanam, M. y Forgash, A.J. (1977). *Environmental impact of mosquito pesticides: toxicity and anticholinesterase activity of chlorpyrifos to fish in a salt marsh habitat*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 5: 415-425.
- Thompson, H.M. (1993). *Avian serum esterases: species and temporal variations and their possible consequences*. Chem. Biol. Interact. 87: 329-338.
- Thompson, H.M. (1999). *Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates*. Ecotoxicology 8: 369-384.
- Thongsinthusak, T.; Ross, J.H.; Saiz, S.G. y Krieger, R.I. (1999). *Estimation of dermal absorption using the exponential saturation model*. Regul Toxicol Pharmacol. 29: 37-43.
- Thrasher, J.D.; Madison, R.; Broughton, A. (1993). *Immunologic abnormalities in humans exposed to chlorpyrifos: Preliminary observations*. Arch. Environ. Health 48: 89-93.

Timchalk, C.; Nolan, R.J.; Mendrala, A.L.; Dittenber, D.A.; Brzak, K.A. y Mattsson, J.L. (2002). *A Physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic (PBPK/PD) model for the organophosphate insecticide chlorpyrifos in rats and humans*. Toxicol. Sci. 66: 34-53.

Timchalk, C.; Poet, T.S. y Kousba, A.A. (2006). *Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos*. Toxicology 220: 13-25.

Timchalk, C.; Kousba, A.A. y Poet, T.S. (2007). *An age-dependent physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for the organophosphorus insecticide chlorpyrifos in the preweanling rat*. Toxicol. Sci. 98(2): 348-365.

Torp, H.E. (1986). *Haemolytic effect of the enzyme system acetylcholine erythrocyte-cholinesterase. The enzyme systems possible connection with H⁺-ion activity relating to erythrocytes from the spleen*. Scand. J. Haematol. Suppl. 46: 1-11.

Toutain, P.L. y Bousquet-Melou, A. (2004a). *Plasma clearance*. J. Vet. Pharmacol. Therap. 27: 415-425.

Toutain, P.L. y Bousquet-Melou, A. (2004b). *Plasma terminal half-life*. J. Vet. Pharmacol. Therap. 27: 427-439.

Toutain, P.L. y Bousquet-Melou, A. (2004c). *Volumes of distribution*. J. Vet. Pharmacol. Therap. 27: 441-453.

Toutant, J.P. y Massoulie, J. (1988). *Cholinesterases: tissue and cellular distribution of molecular forms and their physiological regulation*. In: *The Cholinergic Synapse*, (Ed: Whittaker, V.P.), Springer-Verlag, Berlin. pp. 225-265.

Tully, T.N.; Osofsky, A.; Jowett, P.L. y Hosgood, G. (2003). *Acetylcholinesterase concentrations in heparinized blood of Hispaniolan Amazon parrots (*Amazona ventralis*)*. J. Zoo Wildl. Med. 34(4):411-413.

United States Environmental Protection Agency. (2002). *Chlorpyrifos Facts*, EPA 738-F-01-006. http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/chlorpyrifos_fs.htm

Valentin, J. (2001). *Basic anatomical and physiological data for use in radiological protection: reference values - International Commission on Radiologic Protection*. Annals of the ICRP Publication 89, Pergamon, Elmsford, NY.

van der Wel, H. y Welling, W. (1989). *Inhibition of acetylcholinesterase in guppies (*Poecilia reticulata*) by chlorpyrifos at sublethal concentrations: methodological aspects*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 17: 205-215.

van Gemert, M.; Dourson, M.; Moretto, A. y Watson, M. (2001). *Use of human data for the derivation of a reference dose for chlorpyrifos*. Regul. Toxicol. Pharmacol. 33: 110-116.

- Vidair, C.A. (2004). *Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity in the postnatal rat: extrapolation to the human*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 196: 287-302.
- Vigny, M.; Gisiger, V. y Massoulié, J. (1978). *Nonspecific cholinesterase and acetylcholinesterase in rat tissues: molecular forms, structural and catalytic properties, and significance of the two enzyme systems*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 2588-2592.
- Villarino, N.; Landoni, M.F. (2006). *Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica*. A. Vet. 26: 28-37
- Walker, B. y Nidiry, J. (2002). *Current concepts: organophosphate toxicity*. Inh. Toxicology 14: 975-990.
- Walters, K.A. y Roberts, M.S. (2002). *The structure and function of skin*. En: *Dermatological and Transdermal Formulations*. (Ed.: Walters K.A.). Marcel Dekker, New York. Pp 1-40.
- Wang, R.H.; Bejar, C. y Weinstock, M. (2000). *Gender differences in the effect of rivastigmine on brain cholinesterase activity and cognitive function in rats*. Neuropharmacology. 39: 497-506.
- Watanabe, S. y Sato, T. (1996). *Effects of free fatty acids on binding of bovine and human serum albumin with steroid hormones*. Biochim. Biophys. Acta 1289: 385-396.
- Watson, K. y Black, W.D. (1981). *Whole blood cholinesterase activity in calves after topical treatment with famphur*. Can. Vet. J. 22: 179-181.
- Watson, A.D.; van Gogh, H.; van Deurzen, E.J.; van Duin, C.T. y van Miert AS. (1987). *Pharmacokinetics of three sulphonamides in ruminant and preruminant kids*. Res. Vet. Sci. 43: 208-216.
- Westlake, G.E.; Martin, A.D.; Stanley, P.I. y Walker, C.H. (1983). *Control enzyme levels in the plasma, brain and liver from wild birds and mammals in Britain*. Comp. Biochem. Physiol. C. 76: 15-24.
- Wetstone, H.J. y Lamotta, R.V. (1965). *The clinical stability of serum cholinesterase activity*. Clin. Chem. 11:653-663.
- Whitney, K.D.; Seidler, F.J. y Slotkin, T.A. (1995). *Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 134: 53-62.
- Wood, M. y Wood, A.J. (1981). *Changes in plasma drug binding and alpha 1-acid glycoprotein in mother and newborn infant*. Clin. Pharmacol. Ther. 29:522-526
- Worek, F.; Koller, M.; Thiermann, H. y Szinicz, L. (2005). *Diagnostic aspects of organophosphate poisoning*. Toxicology. 214:182-189

Yamaoka, K.; Nakagawa, T. y Uno, T. (1978). *Statistical moments in pharmacokinetics*. J. Pharmacokinet. Biopharm. 6: 547-558.

Yuan, J (1994). *Toxicokinetics of Chlorpyrifos in F344 Rats and B6C3F1 Mice*. CRISP/94/S21177-02. United State Department of Health and Human Services; Public Health Service; National Institutes of Health; National Institute of Environmental Health Sciences.

Zaccheo, O.; Dinsdale, D.; Meacock, P.A. y Glynn, P. (2004). *Neuropathy target esterase and its yeast homologue degrade phosphatidylcholine to glycerophosphocholine in living cells*. J. Biol. Chem. 279:24024-24033.

Zeller E.; Bissiger, A. (1943). *Über die cholinesterase des gehirns und der erythrocyten*. Helvetia Chimica Acta 26: 1619-1630.

Zeller, E.; Birkhauser, H.; Wattenwyl, H. (1941). *Geschlecht und cholinesterase bei Meerschweinchen, Maus, und Beri-Beri-Rate*. Helv. Chim. Acta. 24: 1465-1470.

Zhao, Q.; Gadagbui, B.; Dourson, M. (2005). *Lower birth weight as a critical effect of chlorpyrifos: a comparison of human and animal data*. Regul. Toxicol. Pharmacol. 42: 55-63.

Zimmerman, G y Soreq, H. (2006). *Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission*. Cell. Tissue. Res. 326: 655-669.