

Inhalación de disolventes industriales

Efecto de la inhalación crónica de tiner sobre el hígado de rata y la fracción mitocondrial aislada.

Alfonso Carabez Trejo

Resumen

La inhalación de disolventes industriales es uno de los problemas de salud más importantes tanto en medicina del trabajo, como en la esfera de la farmacodependencia cuando estas substancias son inhaladas involuntaria o voluntariamente. La inhalación voluntaria ha crecido alarmantemente en las últimas décadas, convirtiéndola en un objeto de estudio de importancia primaria, tanto por sus orígenes como por su magnitud. Los estudios pioneros de Costero y Barroso¹ entre otros dan una idea de la magnitud de algunos de los efectos, que tiene esta farmacodependencia. Este trabajo se enfoca al estudio del efecto de la inhalación de tiner por periodos prolongados tiene sobre la morfología y la función del hígado de la rata y la fracción mitocondrial aislada de ese órgano.

Palabras clave: Inhalación crónica, tiner, hígado

Summary

Industrial solvent inhalation has become one of the most important health problems worldwide. Workers frequently are exposed to the vapours of these type of compounds but perhaps the most important problem related with the industrial solvents is the voluntary inhalation, that, under certain conditions and according to the WHO becomes a pharmacodependency or a drug-addiction. In the last few decades this drug addiction has grown to impressive figures, this is an indication that the problem has to be studied, in order to gain insight on the possible mechanism, to which these compounds affect the organism and the physiology of individuals with this health problem. The pioneer studies of Costero and Barroso among others, pointed out on the extent of the effects of this drug addiction. Our work is focussed on the effects that long term thinner inhalation induces on the liver and on the subcellular mitochondrial fraction of rats.

Key words: Chronic inhalation, thinner, liver

Introducción

La exposición a disolventes industriales volátiles tiene dos características: la involuntaria y la voluntaria. El primer caso se maneja en la esfera de la medicina del trabajo, mientras que el segundo no tiene un territorio definido ya que puede ser manejado por diferentes áreas de la esfera médico-legal, de la sociología y la legal. Esto último debido a que el grupo de población en la que tiene mayor incidencia la inhalación voluntaria de los disolventes industriales volátiles, va desde los 5 o 6 años hasta los 18-21 años de edad², este grupo denominado como "menores" (respecto a la ley), lo cual dificulta seriamente las definiciones y la aplicación de las leyes civiles y penales creadas principalmente para los ciudadanos con plenos derechos y deberes constitucionales.

La definición de droga de la OMS³ es toda substancia química que introducida voluntariamente en el organismo de un sujeto, posee la propiedad de modificar las condiciones físicas y/o químicas del organismo. La definición de fármaco es más amplia, refiriéndose a aquellos compuestos que se utilizan siempre en beneficio del individuo.

La dependencia se define: como "el impulso irreprímible de continuar administrándose la droga o fármaco en una forma periódica o continua"⁴, para poder experimentar repetidamente los efectos físicos y/o psíquicos que esa substancia produce. Así, el fenómeno de "escalamiento" en la dependencia es el fenómeno de que, con objeto de continuar experimentando, con la misma intensidad, los efectos que la substancia produce en el área física y/o psíquica, se aumenta la dosis como consecuencia de un proceso de tolerancia o resistencia del individuo hacia el fármaco o droga.

Un fenómeno semántico reciente es el conflicto que existe en nombrar como drogadicto a una persona que utiliza las substancias en forma incorrecta, sobre todo por el valor estigmatizante que el término tiene sobre el paciente. Sin embargo, el término propuesto por la OMS³ de farmacodependiente, no es tampoco adecuado ya que se limita a un pequeño núcleo de personas que consumen drogas aun en forma normal. En nuestro país, el uso de psicobina, mezcalina y marihuana con fines religiosos o médicos por la gente de campo es de uso común y normal y nunca ha sido

problema ni motivo de trastorno social, de manera que entre ellos esas prácticas no son indeseables o socialmente negativas. Se llega al punto intangible de definir el abuso en el empleo de una sustancia. Quizá la más general sea la que define el abuso como la administración de la sustancia con propósitos que no son médicos.

Ya que los disolventes industriales no tienen utilidad médica de manera importante, toda actividad de administración con el fin de experimentar sus efectos psíquicos, sin tomar en cuenta la edad del inhalador, debe ser definida como una drogadicción o si se prefiere, en los términos de la OMS, como una farmacodependencia, e independientemente de la reglamentación penal.

El aumento progresivo y cuantitativo del número de jóvenes que se entregan a la inhalación voluntaria de disolventes industriales volátiles, para experimentar sus efectos psicodélicos, representa un serio problema de salud pública de grandes proporciones.^{3,4}

En términos generales, la preocupación por las exposiciones o inhalación de tipo ocupacional, se ha restringido a los estudios de ciertas normas de seguridad, tales como los periodos y las sustancias a las que están expuestos los obreros en un día de trabajo.

Como consecuencia de la importancia del problema, los estudios con animales (sistemas modelo) se han formalizado demasiado como para poder estudiar el efecto de un solo agente.⁵ Generalmente los estudios se orientan a la inhalación durante cinco a siete horas al día y cinco días a la semana. Estos estudios, sin duda, han aportado valiosos informes sobre la morbilidad de diversos disolventes volátiles así como del daño a diversos órganos y/o tejidos. Sin embargo, la rapidez buscada en estos estudios lleva al empleo de altas concentraciones de exposición y se ha dejado de lado las exposiciones crónicas de bajo nivel que seguramente producen alteraciones pequeñas y menos drásticas que las encontradas bajo la primera condición señalada.

El tipo de estudio realizado hasta ahora sirve como índices de daños potenciales asociados con la exposición en el hombre. Un importante aspecto de la inhalación de disolventes volátiles es la aparición de patrones típicos de tolerancia. Los inhaladores que se inician inhalan uno o más días por semana pero rápidamente avanzan a prácticas compulsivas de experiencias múltiples diarias.

Los farmacodependientes expertos en el consumo de disolventes inhalables expresan preferencia por determinados compuestos dependiendo del olor y del sabor; a menudo detectan cambios en la composición del producto y/o profundidad de efectos.

Este trabajo tiene como objetivo sistematizar los estudios realizados con el disolvente industrial tiner, obtenido de fuentes comerciales "comunes" con objeto de utilizar el material de uso común entre los inhaladores juveniles. Otro

aspecto que se tomó en cuenta en el presente estudio fue correlacionar los hábitos de inhaladores con experiencia intermedia, utilizando como modelo experimental a la rata.

Materiales y métodos

A) Animales de estudio.

Se utilizan como modelo experimental ratas macho de cepa local (derivada originalmente de la cepa Wistar), con un peso al inicio de 100 gramos. Se mantienen en las mejores condiciones de una estación de bioterio con agua y alimento *ad libitum*.

B) Exposición al disolvente.

El disolvente industrial utilizado en el presente estudio fue el tiner, comercialmente conocido como corriente, obtenido de una tlapalería de la zona de Santo Domingo al sur de la Ciudad de México. La caracterización cromatográfica del material recién adquirido, se muestra en la Figura 1. Como puede apreciarse en el cromatograma, este tipo de tiner tiene un contenido elevado de metanol.

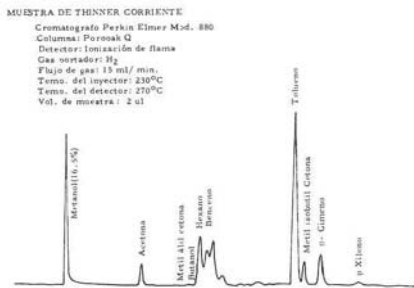


FIGURA 1. Cromatografía en fase gaseosa de tiner corriente. La columna del sistema fue la Poropak Q. Además de los componentes principales como benceno, tolueno etc. se puede observar el contenido elevado de metanol.

C) Analogías experimentales.

Considerando que la rata vive aproximadamente 2.5 años máximo en condiciones de bioterio, establecimos las siguientes analogías para el esquema de inhalación a que se sometieron las ratas.

El mexicano cuenta con una expectativa de vida de 70-72 años en condiciones estándar de vida, que tomamos como referencia. Un inhalador voluntario lo hace, según los estudios de De la Garza², por un periodo promedio de 15 años,

siendo la edad de cinco años como la mínima reportada y 18 a 20 como la máxima, lo cual da un periodo de 13 a 15 años de inhalación.

Tomando en cuenta que la inhalación promedio es de 3-4 veces por semana de a) tintura para zapatos y/o b) tiner, con un volumen promedio de 90 a 100 ml. por día, se tiene un volumen máximo promedio de 300 ml. de solvente por semana, 1.2 litros por mes, 62.4 litros por año (suponiendo un consumo constante) y 1 248 litros durante un periodo de 20 años.

Con este esquema se establecieron las siguientes condiciones de inhalación experimental:

- Volumen de la cámara de inhalación: 40 litros (determinado como volumen de líquido).
- Número de animales tratados por lote: 60
- Número de animales por corrida: 10
- Consumo de oxígeno consumido por animal: 200 ml por hora.
- Requerimiento de oxígeno durante la sesión (por los 10 animales sujetos a tratamiento): 660 ml.
- Contenido de oxígeno en el recipiente: 6.640 l.
- Tiempo de exposición: 5 a 15 min.
- Volumen de solvente evaporado para la exposición: 5 ml.
- Número de sesiones: 2. matutina (antes de las 9:00) Vespertina (después de las 16:00).
- Tiempo total de inhalación: 15 a 30 minutos al día.
- Periodo de inhalación: Agudo hasta 4 semanas. Crónico de 4 hasta 12 ó 16 semanas.
- Controles: 10 animales tratados en la misma forma que los experimentales sin la inhalación del disolvente

D) Obtención de las muestras.

Cuando los animales completan las semanas programadas de exposición al solvente se sacrifican. En el caso de obtención de órganos para el aislamiento de fracciones subcelulares por centrifugación diferencial, se sacrifican por un golpe en la cabeza e inmediatamente se extrae el hígado. Para la obtención de muestras para análisis estructural por microscopía, los animales se anestesian con 0.1 ml de anestésico (Smith Klein and French) por Kg de peso. Cuando el anestésico ha tenido efecto, se realiza una laparotomía y se extraen fragmentos de tejido.

E) Obtención de la fracción mitocondrial por centrifugación diferencial. El hígado se extrae de los animales y se coloca en un medio de sacarosa 0.25 M, EDTA 1 mM ajustado a pH 7.4 con Tris. a 4° C, y se sigue el procedimiento descrito por Hogeboom y Schneider.⁶

F) Determinación del control respiratorio por consumo de oxígeno.

El medio consiste en sacarosa 0.25M, EDTA 1 mM ajustado el pH a 7.4 con TRIS (Tris-hidroxi-metil amino-metano), 5 mM de sustratos oxidable, 10 mM de fosfatos, 8 mM de cloruro de magnesio, KCl 10 mM y 1 mg de proteína por ml. El equipo utilizado fue un oxímetro YSI mod 55 con cámara para temperatura constante (Yellow Spring Instruments, USA). Las adiciones se indican en los pies de figura correspondientes.

G) Determinación de la actividad de enzimas marcadoras.^{7,8,9,10}

La actividad de la ATPasa se determinó en un medio que contiene sacarosa 0.25M, EDTA 1 mM pH 7.4 ajustado con TRIS. 10 mM KCl, 8 mM MgCl₂ y 1 mg de proteína mitocondrial/ml. La reacción se inicia por la adición de 6 mM de ATP, se incuba 10 minutos a 25°C, al final se añade 0.1 ml de una solución al 30 por ciento de ácido tricloroacético para detener la reacción por precipitación de las proteínas. Se centrifugan los tubos y se toma una alícuota de 0.1 ml para la determinación del fósforo liberado a partir del ATP, por el método colorimétrico de Sumner.

La citocromo oxidasa se determina por el método polarográfico, en el oxímetro. El medio consiste en: 1.5 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4, 0.1 ml de ascorbato de sodio 3 mM, y 0.1 ml de Tetrametilén p-fenilén diamina (TMPD) 3mM. Se preincuba la proteína mitocondrial con 0.25 ml de agua a la que se añaden 0.1 ml de lubrol WX al 2.0 por ciento, cuando el trazo del oxímetro se ha estabilizado se inicia la reacción con la adición de 50 ul de una solución de citocromo C 1.2 mM. Se determina el consumo de oxígeno por 3 minutos y se calcula la concentración utilizada.

Deshidrogenasa glutámica. El medio de preincubación es: agua, enzima (proteína mitocondrial) y lubrol WX (0.2 mg/mg de proteína) 0.85 ml. Se mezclan con 0.5 ml de buffer de fosfatos 0.1M a pH 7.7, 0.5 ml de KOH, 0.01 ml de KCN (58 mg/ml), 0.2 ml de NAD (0.02M pH 6.5-7.0), 0.05 ml de BSA (50 mg/ml pH 7), 0.1 ml de EDTA (0.01M pH 7.6) mezclar y añadir 0.5 ml de agua 0.5 ml de buffer de fosfatos y 0.3 ml de reactivo de Cleland (1.5 mg/ml). Equilibrar el espectrofotómetro e iniciar la reacción con la adición de 0.05 ml de glutamato de potasio (0.8M pH 7.4) medir la velocidad inicial a 340 nm a 25°C.

Deshidrogenasa succínica. En celdas de espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz, colocar 0.3 ml de KCN (0.1M) neutralizado y 0.3 ml de K₃Fe(CN)₆ (0.1M) y 0.2 ml de succinato de sodio. Adicionar buffer de fosfatos pH 7.2 a una concentración de 0.1M para un volumen final de 3 ml. En la celda de referencia se utiliza agua. Para iniciar la reacción se adicionan 0.2 ml de la preparación de mitocondrias diluidas en ambas celdas. La reacción se sigue a 400 nm. La actividad se expresa como la disminución de la densidad óptica a 20°C.

La *Monoamino oxidasa* se determinó en un medio que contiene 1.0 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.6, 0.04 ml de lubrol WX al 2 por ciento, la muestra de mitocondrias se diluye con agua en un volumen de 1 ml. La reacción se inicia por la adición del sustrato 0.1 ml de Bencilamina 5 mM. La reacción se sigue por 2 minutos en el espectrofotómetro a 250 nm a una temperatura de 37°C.

H) Determinación de la concentración de proteína.

La determinación se hizo por el método de biuret¹¹

I) Procedimiento para el estudio morfológico por microscopía electrónica de transmisión.

Los fragmentos de tejido de aproximadamente 0.5 cm³, extraídos del animal anestesiado se colocan sobre glutaraldehído al 3 por ciento en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4. El tejido se corta en fragmentos de no más de 1 mm³, se renueva el fijador y se transfieren los fragmentos de tejido a viales con aprox. 1.5 ml de fijador fresco. La fijación se continúa por un total de 2 horas. El fijador se substituye por medio de lavado (sacarosa 0.25 M en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4, después de 12 horas de lavado se substituye ese medio por una solución de tetra óxido de osmio al 2 por ciento en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4. La post-fijación se hace por 2 horas a 4°C, al cabo de las cuales se lava en el medio descrito anteriormente. La deshidratación se realiza con alcohol en serie gradual de concentraciones crecientes de 10 por ciento a absoluto, haciendo dos cambios cada 10 minutos, a 4°C. El etanol absoluto se substituye por óxido de propileno, dos cambios de 30 minutos cada uno, el primero a 4°C y el segundo a temperatura ambiente, este último se substituye por resina epóxica diluida 1:1 (V/V) con óxido de propileno. Se permite la infiltración por 24 a 36 horas, al cabo de las cuales se substituye por transferencia de los bloques de tejido a resina completa (Según Luft¹²) sin diluir, se coloca en un sistema de rotación por 3 a 5 horas y finalmente se transfieren a moldes planos con resina completa y se polimeriza a 70°C por 36 horas. Los bloques de resina polimerizada conteniendo el tejido muestra se lleva a una pirámide de aprox 0.5 mm² y se obtienen cortes semifinos con cuchilla de vidrio en un ultramicrotomo. Los cortes obtenidos se transfieren a portaobjetos con ayuda de un asa de platino, se fijan con calor y se tñen con azul de toluidina al 2 por ciento en amortiguador de boratos pH 7.4. Las secciones se analizan para determinar la ubicación de material interesante para estudio y, si se considera adecuado, se obtienen los cortes finos con navaja de vidrio o de diamante. Las secciones finas se adhieren a rejillas de cobre de 300 mallas y se contrastan con plomo y uranio de acuerdo al método de Reynolds¹³.

J) Observación al microscopio electrónico.

Las rejillas se observaron con el porta-especimen para alto contraste y se fotografiaron en un microscopio electrónico

marca JEOL mod 100B, operado a 60 KV con soporte de alto contraste para la rejilla

Resultados

La evaporación del disolvente industrial en la cámara de inhalación se determinó midiendo los volúmenes retenidos a diferentes tiempos, en presencia y en ausencia de los animales de experimentación. En la Figura 2 se muestran los resultados de las determinaciones de volúmenes evaporados. Como puede verse, la evaporación de solvente sigue una curva de saturación normal con un *Plateau* cercano a los 5 ml. La presencia de los animales aumenta ligeramente la evaporación del solvente en función de dos factores: primero, la temperatura de la cámara aumenta y segundo, parte del solvente está siendo "consumido" por los animales de experimentación, lo cual se refleja en un aumento en el volumen de solvente evaporado y en un menor tiempo en el que se satura la cámara de inhalación.

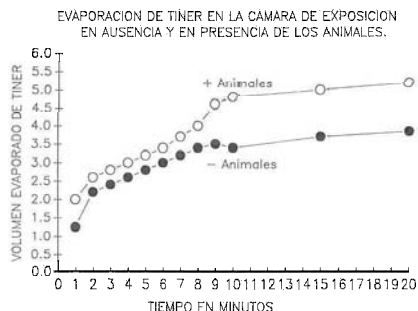
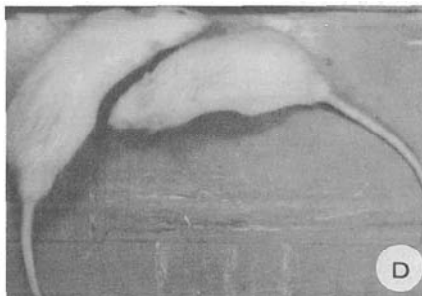
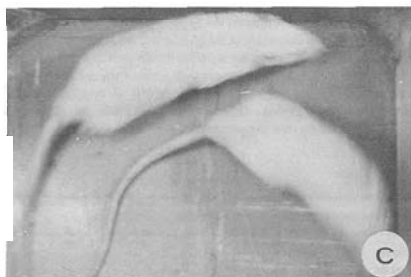
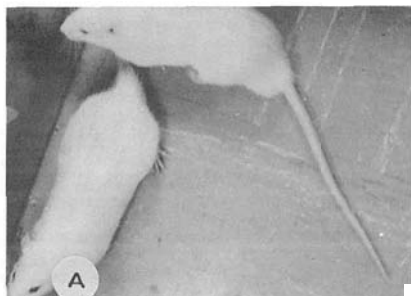


FIGURA 2. Curva de evaporación del solvente en función del tiempo, en la cámara de inhalación, en presencia o ausencia de los animales experimentales. Como puede verse en las fases iniciales la velocidad de evaporación es igual en ambas condiciones, después del minuto 9 la cantidad de solvente evaporada es mayor en presencia de animales

Los animales de experimentación, a diferencia de los animales control, muestran cambios conductuales¹⁴ en cuanto alcanzan un nivel de intoxicación. Estos cambios se observan principalmente en la conducta de los animales, los cuales inicialmente presentan reacción de huida, después buscan aire libre de solvente y después de forma gradual van cayendo en un estado de intoxicación manifestado por irritación y excitación, se hacen muy sensibles a los ruidos externos y después inician la "conducta de giro". Algunos animales giran en sentido de las manecillas del reloj y otras en contra, lo cual indica cierto grado de lateralización de los efectos de la intoxicación con el solvente (Figura 3).



Cuadro 1

SINTESIS DE GLUCOGENO

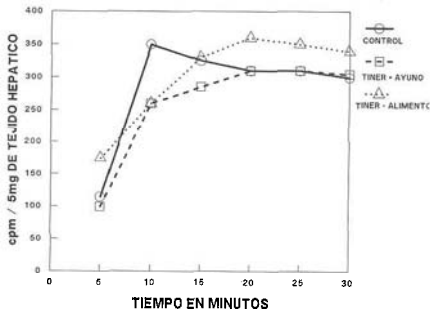


FIGURA 3. Fotografías de las posiciones típicas que adoptan los animales de experimentación durante la fase de exposición al solvente. En A y B se muestra la posición de la cola que indica estados de excitación. En C y D se puede observar la conducta de giro de los animales. En C los animales giran en la misma dirección, mientras que en la sección D se muestra que algunos animales giran en sentido contrario.

En la Figura 4A se muestra la ultraestructura del hígado de la rata control. Como puede observarse, la ultraestructura es la normal, tanto en sus componentes principales como en el aspecto general de los elementos de reserva que contiene, representado principalmente por el glucógeno.

En la Figura 4B se muestra una zona del citoplasma de un hepatocito de rata sometida a la inhalación de tiner durante 4 semanas. Como puede observarse, en estas condiciones existe una acumulación masiva de glucógeno. La acumulación masiva de glucógeno bajo estas condiciones puede deberse a dos factores bioquímicos. El primero de ellos que la utilización del glucógeno se encuentre inhibida o segundo que se encuentre aumentada la síntesis de esta forma de almacenamiento de la glucosa. En el panel D de esta figura se muestra la síntesis del glucógeno en función de la determinación de la actividad de la glucógeno sintetasa. El análisis de las tres condiciones mostradas en el cuadro nos indica que el proceso de síntesis parece no ser el responsable del hallazgo morfológico ya que tanto el control como las dos condiciones (ayuno y con alimento) en presencia de tiner no muestran

diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados se comprobaron al realizar la autorradiografía de muestras de hígado de ratas en la misma condición experimental, a las cuales se administró previamente glucosa 14c uniformemente marcada (Figura 4C). El análisis de citometría indica que los granos de plata revelados se asocian a glucógeno. En el Cuadro 2 se muestran los resultados de la determinación cuantitativa del glucógeno aislado de los animales control y de los experimentales. Nuevamente los resultados indican que la vía de síntesis del glucógeno no se encuentra afectada.

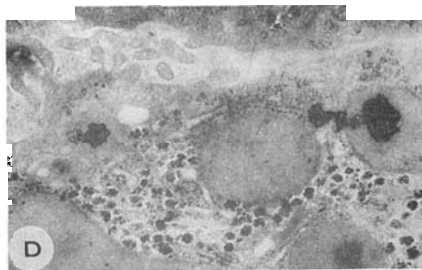
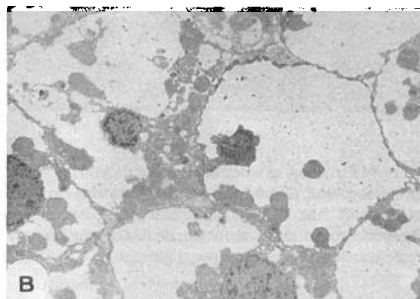
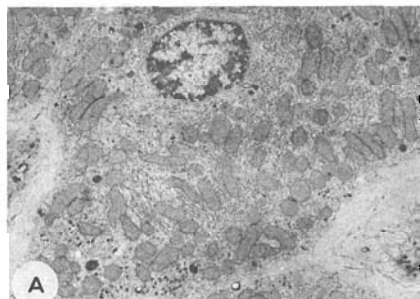


FIGURA 4. Microfotografías en las que se muestran algunos de los cambios observados en el hígado de ratas sometidas a 4 semanas de inhalación de tiner. A. Hígado obtenido de rata control. B microfotografía a bajo aumento del hígado de rata que ha inhalado tiner, obsérvese la abundancia de glucógeno acumulado. En C se muestra un aumento de una zona periférica de un hepatocito de rata experimental, en el que se aprecia la estructura característica de las "rosetas" del glucógeno. En D se muestra el resultado de la autorradiografía de glucosa radioactiva de una parte del citoplasma de un hepatocito de rata experimental.

Cuadro 2. Glucógeno hepático Total

Condición experimental	concentración (MG%)
Control	360 ± 20
Tiner (Ayuno de 16 Hrs)	1100 ± 40
Tiner (Alimento Ad Libitum)	1400 ± 50

Cuadro 3. Actividad de enzimas marcadoras en mitocondrias aisladas en hígado de ratas en tratamiento con solventes industriales (Thinner Opex No. 3)

Semana de Tratamiento	C R	Cit. Oxidasa*	MAO*	Prot./ml
0	4.6	193	3.54×10^{-6}	43.3
1	3.0	860	4.9×10^{-6}	43.3
2	2.0	2492.7	6.36×10^{-6}	50.4
3	3.0	30254	1.76×10^{-5}	34.6
4	1.0	860	3.19×10^{-4}	54.6
5	3.6	946	5.0×10^{-6}	58.1
6	3.7	951	8.0×10^{-6}	33.58
7	3.4	780	7.82×10^{-6}	62.1
8	3.2	567	7.51×10^{-6}	124.7
9	3.1	407	6.01×10^{-6}	62.5

* Determinación polarográfica, ascorbato- TMPD como sustrato.

** Determinación espectrofotométrica a 250 nm de benzaldehído. Benzilamina como sustrato.

En la Figura 5 se muestra otro tipo de cambios morfológicos que se presentan como consecuencia de la inhalación de tiner por la rata. En la Parte A de la figura se muestra la estructura de los lisosomas. En estas condiciones experimentales au-

menta el número de estos organelos por célula y su contenido muestra características morfológicas anormales. Otro de los hallazgos se muestra en la parte B de la figura y corresponde a un incremento masivo de tejido conjuntivo (colágena) entre los hepatocitos, atrapando a estas células en una malla que bien pudiera corresponder a un tipo de cirrosis experimental. En la parte C de la figura se muestra el aspecto que presentan las mitocondrias en el citoplasma de los hepatocitos de las ratas tratadas con tiner. Como puede observarse la matriz mitocondrial presenta una menor densidad y las crestas no presentan luz como en el caso de las mitocondrias control dando incluso el aspecto de estar fusionadas.

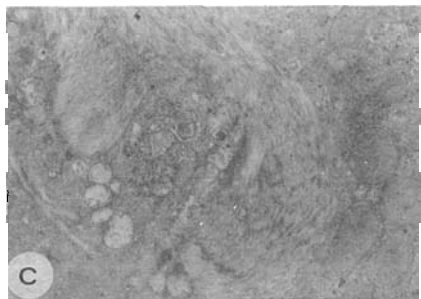
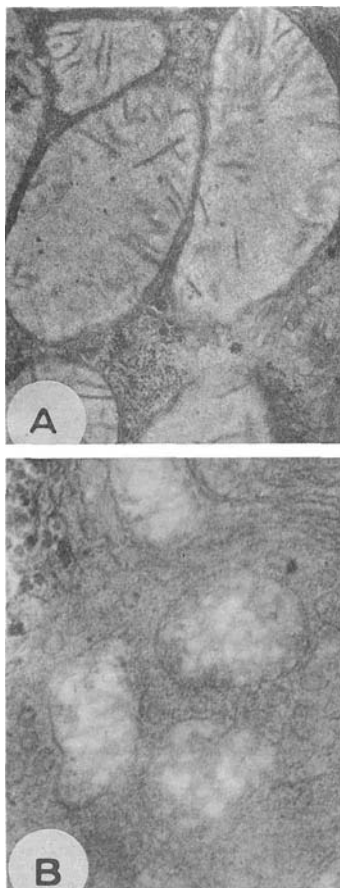


FIGURA 5. Microfotografías de los cambios observados en el hígado de ratas que han inhalado tiner por un período de 8 semanas. En A se muestran los cambios en las mitocondrias, las cuales sufren una disminución de la densidad de la matriz, plegamiento de las crestas y cambios de forma. En B se muestra una zona del citoplasma que muestra el aumento en el número y tipo del somosom. En C se presenta un paquete de colágena, frecuentemente observado en el hígado de ratas que han inhalado tiner, la acumulación de colágena se inicia entre la 4ª y a 5ª semanas de experimentación.

El análisis morfológico de la fracción mitocondrial aislada del hígado de ratas tratadas en las mismas condiciones de la Figura 4B, muestra claras diferencias en cuanto a la estructura de las membranas que la integran, tanto la membrana externa como la interna. De igual manera la matriz mitocondrial así como las crestas mitocondriales se observan afectadas (Figura 6). La determinación de proteína por el método de biuret, de la fracción mitocondrial aislada no muestra una disminución importante en la cantidad total.

Con objeto de precisar si las alteraciones en la morfología de la fracción mitocondrial de hígado se correlacionan con alteración en la función, se estudiaron estas preparaciones para determinar el control respiratorio y la actividad de dos enzimas marcadoras. Los resultados se muestran en el Cuadro 3. En el Cuadro 4, se muestran los resultados obtenidos de la actividad de transporte de iones de la fracción mitocondrial aislada de hígado de rata, sometida a la inhalación de tiner por cuatro semanas. Los resultados presentados permiten observar una disminución importante en la actividad inducida por la adición de un transportador artificial de iones (ionóforo), la valinomicina, a la preparación.

Cuadro 4. Estimulación de la respiración por valinomicina- K^+ en mitocondrias aisladas de hígado de rata tratada con solventes industriales (Thinner Opex No. 3), a diferentes temperaturas.

Temperatura °C	Control*	+VAL - K^{++}
4	9.8	5.9
10	16.3	11.8
15	52.0	19.6
20	71.6	25.5
22	83.3	39.2
25	111.0	59.0
32	100.0	80.4
37	109.0	91.2

nAt 0 por minuto por mg de proteína.

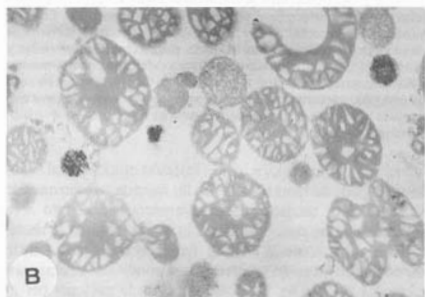
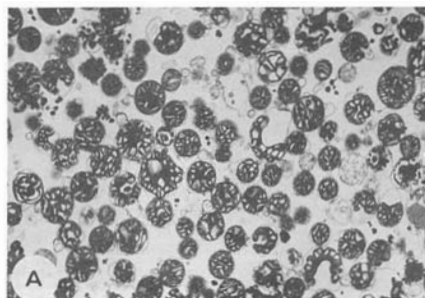
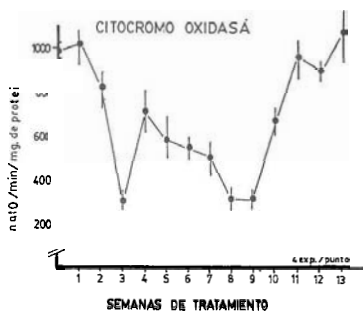
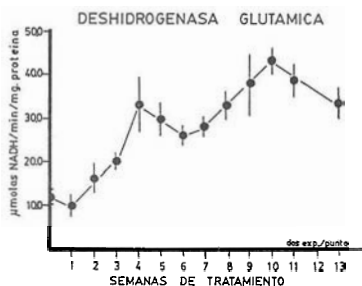
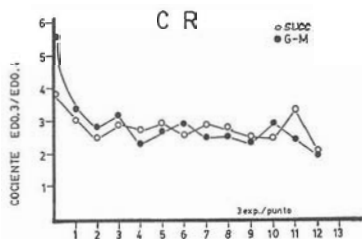


FIGURA 6. Microfotografías de la fracción mitocondrial aislada de hígado de rata control (A) y de animal experimental que ha inhalado tiner por 6 semanas (B). Como puede verse en las mitocondrias aisladas del hígado de la rata experimental la membrana de las mitocondrias no está claramente definida.

El análisis del comportamiento de las actividades enzimáticas de la fracción mitocondrial aislada de hígado de ratas que inhalaban tiner por 13 semanas se presenta en la Figura 7. En el pánel A se puede observar el efecto negativo que tiene la inhalación continuada de tiner sobre el control respiratorio de las mitocondrias, tanto con sustratos de sitio uno (Glutamato) como del sitio dos (Succinato). En el pánel B se puede observar que una enzima de la matriz mitocondrial (Soluble), la Deshidrogenasa glutámica, una enzima soluble localizada en la matriz muestra un patrón de sensibilidad diferente ya que en este caso se observa un aumento de más de 4 veces a las 10 semanas de tratamiento. Las enzimas de membrana como son la monoamino oxidasa (MAO, pánel C) de la membrana, externa, la deshidrogenasa succínica (DHS, pánel D), la citocromo oxidasa y la Adenosin Trifosfatasa (ATPasa, pánel E) son afectadas en sentido inhibitorio entre la 7 y 9 semanas después de los cuales presentan una tendencia a la recuperación de la actividad a partir de la novena semana.



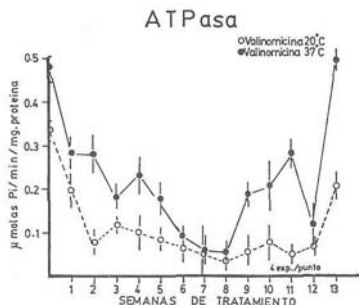
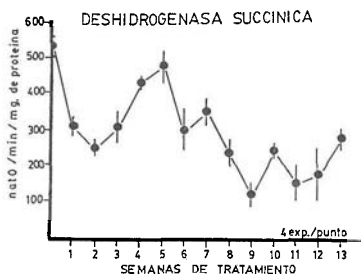
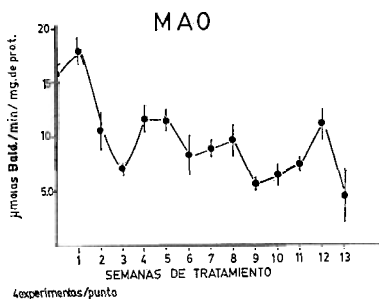


FIGURA 7. Comparación de la actividad respiratoria (CR) y de enzimas marcadoras (MAO de membrana externa, D.H. de matriz mitocondrial, CIT, OX, DH, SUCC Y ATPasa de membrana interna), de la fracción mitocondrial, de ratas que han inhalado tiner.

En este estudio se hizo el análisis del efecto de la adición *in vitro* de tiner a la fracción mitocondrial que parece ser la más afectada.

En la Figura 8A se muestra el efecto que tiene la adición de varias concentraciones de tiner a una preparación de mitocondrias aisladas de animales control, las cuales se mantienen en un medio isotónico e iso-osmótico. En condiciones normales la mitocondria que se comporta como un osmómetro perfecto no presenta cambios volumétricos (por ganancia o pérdida de agua), al añadir el tiner aun a bajas concentraciones se observa que inicia el proceso de ganancia de agua ya que hay una disminución de la absorbencia a 526 nm. En la parte B de la Figura se muestra el efecto que tiene la adición directa de tiner a la preparación mitocondrial. Las mitocondrias pierden la capacidad de tener control respiratorio, lo que indica un desacoplamiento entre respiración y capacidad de sintetizar ATP, este efecto se observa cuando el tiner se adiciona antes o después del ADP, en presencia de sustratos oxidables de sitio I.

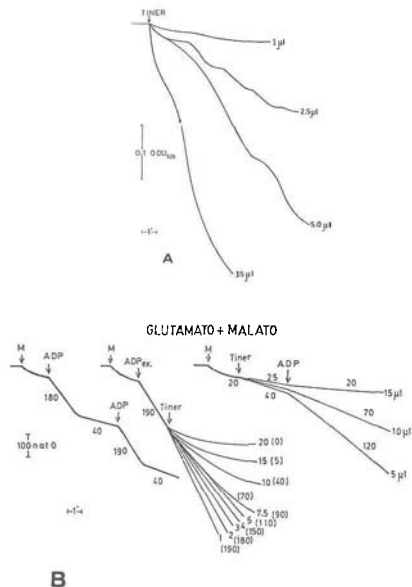
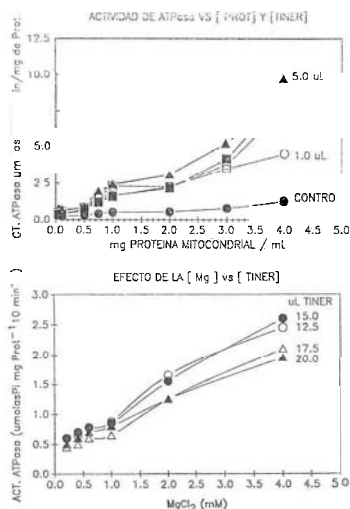


FIGURA 8. Efecto de la adición de tiner sobre el hinchamiento de mitocondrias aisladas de hígado de rata control (Panel A) volumen final 3.0 ml. Obsérvese cómo desde un volumen de 1ML el solvente induce cambios en la D.O. de la preparación, indicativo de cambios en la permeabilidad membranar. En el Panel B se muestra el efecto de la adición del tiner sobre el control respiratorio de mitocondrias control. Nótese el efecto inhibitor del solvente sobre esta actividad mitocondrial.

Tomando como representativa de una enzima membranaral a la ATPasa, se escogió esta enzima para estudiar el efecto de la adición *in vitro* del tiner. En las Figuras 9 A y B, se muestra que la actividad de la enzima es estimulada por la adición de concentraciones crecientes del disolvente al medio de incubación. En el panel C de esta figura se muestra la actividad de ATPasa inducida por ionóforos y su sensibilidad al tiner.

A



ATPasa

B

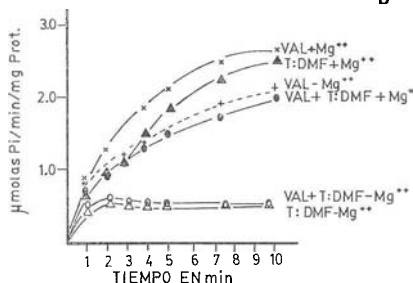


FIGURA 9. Correlación morfofuncional entre la actividad respiratoria y la estructura al microscopio electrónico de los cambios sufridos por la fracción mitocondrial a la cual se añaden 10 ML de tiner. Obsérvese como la actividad respiratoria mitocondrial, inducida por la adición de ADP, se pierde en función del hinchamiento que sufre la preparación

El estudio por microscopía electrónica de la ultraestructura de las mitocondrias expuestas *in vitro* al disolvente tiner se muestra en la Figura 10. En este estudio se adiciona el disolvente y se toman muestras del medio de incubación a los minutos señalados en las gráficas de consumo de oxígeno. Como puede verse, la presencia del disolvente altera la ultraestructura de las mitocondrias, en relación directa a su concentración en el medio.

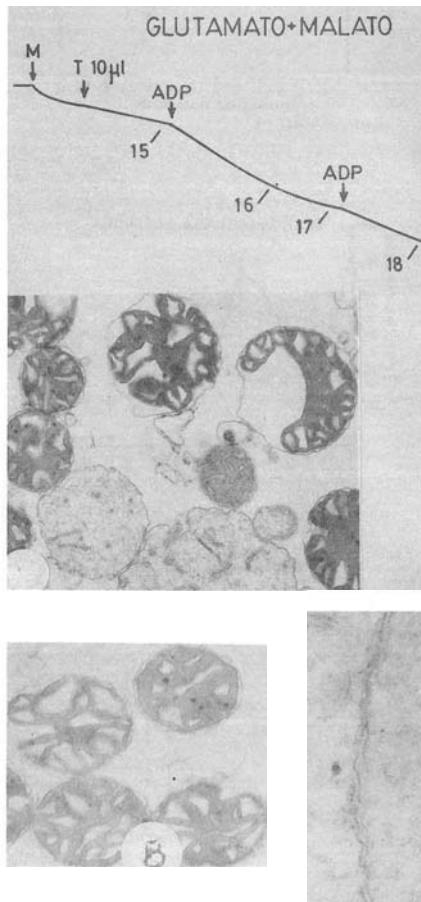
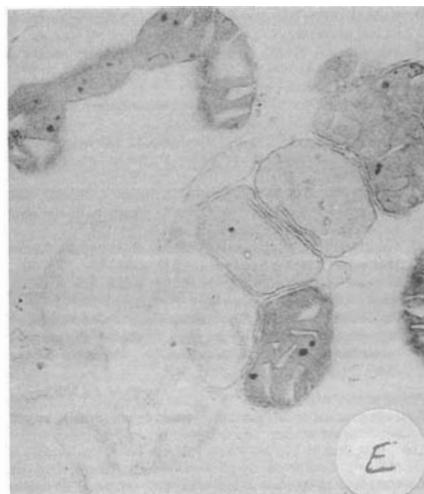
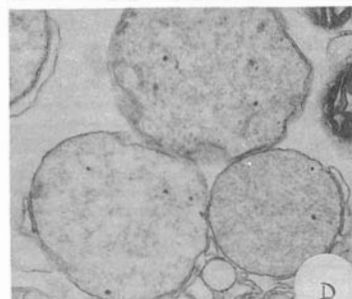
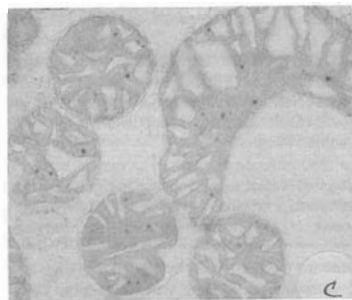


FIGURA 10. Efecto de diversas concentraciones de tiner (2.5, 10 y 20 l) añadido a un medio de respiración que contiene mitocondrias. Los números por debajo de los trazos del consumo de oxígeno corresponden a las microfotografías que acompañan cada registro.



Discusión

Los resultados obtenidos de la observación de los patrones conductuales que manifiestan las ratas bajo tratamiento de inhalación del disolvente industrial tiner, muestran que el órgano blanco de la acción de estos compuestos es el cerebro ya que conforme se van intoxicando con los vapores de solvente se encuentran patrones característicos del daño cerebral que se está produciendo; un ejemplo de ello es el que se presenta en la Figura 3, en la que se dispara la conducta de giro como una de las fases del proceso de intoxicación. Un aspecto importante de señalar en relación a la conducta de giro observada, es que algunas ratas giran en sentido de las manecillas del reloj mientras que otras lo hacen en el sentido contrario a ellas. Esta observación permite concluir que existe lateralidad del efecto de la substancia sobre los hemisferios cerebrales de la rata. Asimismo presentan síntomas clásicos de estimulación central, ya que en otra fase de la inhalación presentan signos semejantes a los descritos para la administración de las endorfinas, como es la rigidez corporal y de la cola. Con estas observaciones, junto con las de Díaz¹⁵, se puede afirmar que el efecto del disolvente, cuando menos desde el punto de vista de conducta externa, tiene en la rata un efecto excitador, semejante al observado en el humano.

Los hallazgos en la morfología del hígado de las ratas tratadas con el disolvente nos indican que existen efectos que van más allá de los descritos desde el punto de vista conductual o electrofisiológico, es decir que la fisiología, el metabolismo

y en general la función se ven profundamente alterados, ya que en el caso de este órgano, el hígado, se encontraron modificaciones profundas en la cantidad de glucógeno almacenado, que en ocasiones llega a ocupar más del 60% del citoplasma, rechazando incluso a los organelos hacia la periferia contra la membrana plasmática. Sin embargo, aparentemente la vía de síntesis no es la afectada, como se puede concluir por los resultados obtenidos por autoradiografía, obtenidos con la administración de glucosa radioactiva (Figura 4 C) y por los resultados mostrados en el Cuadro 1. Pero la acumulación masiva de glucógeno no es la única alteración que se detecta morfológicamente en el hígado de estos animales experimentales ya que también se ve comprometida la estabilidad del tejido de sostén, el tejido conjuntivo, ya que como se mostró en los resultados existe una acumulación masiva de colágena, generando imágenes semejantes a las observadas en la cirrosis experimental. También los procesos de modificación postranscripcional de proteínas se encuentran alterados ya que el número de sistemas de Golgi, generalmente uno o dos por célula hepática, aumenta tanto que, en ocasiones, es posible encontrar hasta 5 grupos de cisternas juntos. Otro signo de las alteraciones sufridas por el hígado de estos animales lo representa la profunda modificación estructural que sufren los lisosomas, no solamente en número, sino en contenido.

Uno de los organelos que se observan más afectados y que quizá tienen una importancia particular para la célula, ya que es su fuente energética, son las mitocondrias. Cuando se analizan las actividades de la fracción mitocondrial aislada de los hígados de los animales tratados, se encuentra que no solamente la estructura es alterada profundamente sino también la función como puede concluirse de las modificaciones en la función primordial de las mitocondrias, como es el control respiratorio, que es considerado como el monitor de las capacidades fosforilativas de la mitocondria. La disfunción en este parámetro indica que la capacidad de síntesis de ATP se ha disminuido o perdido, lo cual compromete la función celular total. Al encontrar alterado este parámetro es necesario explorar en qué grado se encuentran alteradas las enzimas que participan en la función mitocondrial. Los resultados presentados indican que las mitocondrias se ven afectadas por la presencia del disolvente, lo que se refleja en la pérdida de la actividad óptima de las enzimas, pero sorprendentemente las actividades enzimáticas, después de un tiempo que varía de 7 a 9 semanas, inician un proceso de recuperación. La explicación que tenemos y que se ve apoyada por resultados no presentados en este trabajo, es que la membrana de las mitocondrias es modificada en su contenido y tipo de lípidos y en sus propiedades fisicoquímicas (Cuadro 2), para hacer frente a la presencia del disolvente, el cual por su naturaleza tenderá a disolverse en las grasas del organismo de estudio, incluyendo la porción fosfolípida de las membranas, de las cuales forma parte la membrana mitocondrial.

La parte final de este trabajo en el que se muestran los resultados de la adición *in vitro* del tiner, nos permiten concluir que, si bien los efectos son dramáticos, no hay forma de correlacionarlos con los resultados obtenidos *in vivo* ya que bajo estas condiciones experimentales no se tienen los mecanismos de adaptación que se tienen cuando el objeto de estudio es el animal íntegro.

La conclusión de este trabajo es que, si bien solamente reportamos los efectos de la inhalación crónica del tiner sobre la morfología y función del hígado, indudablemente toda la economía, órganos, aparatos y sistemas del organismo se deben encontrar alterados, ya que la inhalación del disolvente no tiene un mecanismo de acción sino que es un efector multivectorial y por lo tanto sus efectos serán tan diversos como sitios blanco afecte.

Referencias

- Barroso-Moguel R. y Romero-Díaz V. (1988) Thinner: Inhalación y consecuencias. Ed. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
- De la Garza F. y Vega A. Eds. (1990). Lajuventud y las drogas. Caps. 1 y 10. pp 9-24, 145-160. Editorial Trillas, México.
- Contreras Pérez Carlos M. (1978) Inhalación voluntaria de disolventes industriales. Editorial Trillas, México.
- Leal H. y Pacheco G. Estrategias de intervención para trabajar con inhaladores de la calle. Labranderio, I. Magdalena, Cabrera Solís, J. Zapata Aguilar, R. y Wagner Echegaray F. Comps. México (1988) 215-46.
- Rodríguez CR, Lorenzana JM, Manjarréz A. y Gómez RH (1978) Inhalación voluntaria de disolventes industriales. Ed. Carlos M. Contreras Ed. Trillas México. 61 - 66.
- Schneider WC, Potter VR. (1949). J. Biol. Chem. 177 (1949). Mencionado en Fractionation of cell components of animal tissues por G. H. Hogeboom. J. Biol. Chem 177
- Keilin D. (1925) Proc. Roy. Soc. B98, 312. Mencionado por Britton Chance in Techniques for the assay of the respiratory enzymes.
- MacMunn CA. (1885). J. Physiol. 6, 22. Mencionado por Britton Chance in Techniques for the assay of the respiratory enzymes. Methods in Enzymology.
- Beaufay K.M. (1959) Glutamic Acid Dehydrogenase Assay in Rat Liver Mitochondria. Biochem J. 73, 623-27.
- Slater EC. y Bonner WD. (1952) Biochem J. 52, 185. Mencionado en Succinic Dehydrogenase por Walter D. Bonner in Methods in Enzymology I.
- Cárazeb TA, Sandoval ZF. (1988), The action of Sesquiterpene Benzoquinone, Peregzone, on Electron Transport in Biological Membranes. Arch. Biochem. Biophys. 260, 293-300
- Luft JH. (1961), Improvement on Epoxy Resin use for Electron Microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 409-414.
- Reynolds ES (1963), The use of lead nitrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol., 17, 208-212.
- Díaz JL, Mondragón CR. Efectos producidos por la intoxicación con tiner sobre la conducta libre del ratón. E: Disolventes Inhalables. Labranderio I.M., Cabrera S.J., Zapata A., R., y Wagner E.F., Comps. SSA y CIJ. México, 21- 38

Agradecimientos

En las diversas etapas del desarrollo del presente trabajo han intervenido los siguientes estudiantes: Virginia Urbieto U., José González, Antonio Lugo, Raúl Cruz M., Lourdes Palma y Giselle Perry. Los técnicos en microscopía electrónica: Jorge Sepúlveda y Rodolfo Paredes. Especialmente se agradece el excelente apoyo secretarial de la Srta. Teresa Rosas.