

17352

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



* 5 3 0 9 5 7 8 3 3 8 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TESIS DOCTORAL

"INCIDENCIA DEL LINDANO
EN EL ORGANISMO ANIMAL"

AGUSTIN ORTIZ MARTINEZ

MADRID, NOVIEMBRE, 1991



ARCHIVO

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL II

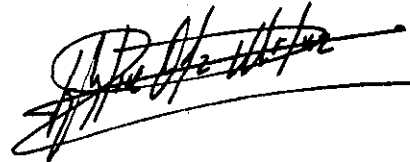
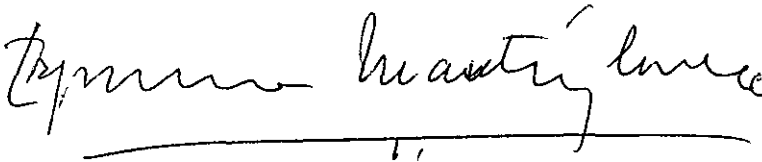
Memoria que para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas presenta AGUSTIN ORTIZ MARTINEZ
del Departamento de Biología Animal II

"INCIDENCIA DEL LINDANO
EN EL ORGANISMO ANIMAL"

Dirigida por la Dra. Esperanza Martínez-Conde,
Profesora Titular del Departamento de Ecología
de la Facultad de Ciencias Biológicas de la
Universidad Complutense de Madrid.

Vº Bº del Director

El Interesado



Dra. Esperanza Martínez-Conde

Agustín Ortiz Martínez

Madrid, Noviembre, 1991

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis Doctoral forma parte de un amplio estudio que ha sido posible gracias a una subvención del Instituto de Salud Pública de la Comunidad Foral de Navarra, a consecuencia de un convenio entre la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas y dicho Instituto para desarrollar un proyecto de investigación sobre pesticidas organoclorados. Este proyecto se llevó a cabo bajo la responsabilidad y dirección de la Dra. Esperanza Martínez-Conde.

Quiero expresar mi agradecimiento a mis compañeros en el Proyecto del Instituto de Salud Pública, Antonio Laguna y Javier Maldonado, y también a Luis Miguel Villamediana.

Es importante también para mí, agradecer y recordar en este capítulo a Isabel Corpas, M^a Dolores Malumbres y M^a Helena Cantarino por su asistencia y aportación en la realización del estudio morfológico.

Y, mi gratitud y reconocimiento, a Esperanza Martínez-Conde, no solamente por la dirección, conocimientos y trabajo aportado en la realización de esta Tesis Doctoral, sino además por todo lo que me ha ido enseñando durante estos años, muchas veces sin darme cuenta de ello.

¡Ah! Por supuesto, gracias, a todos aquellos que me rodean y me han estado apoyando y animando.

INDICES

INDICE GENERAL.

1.- INTRODUCCION.

1.1. Breve historia de los pesticidas.....	pág. 3.
1.2. Compuestos químicos de síntesis.....	pág. 20.
1.3. Organoclorados : formulación y propiedades.....	pág. 23.
1.4. Efectos sobre el medio.....	pág. 32.
1.5. Toxicidad en el organismo animal.....	pág. 36.
1.6. Lucha integrada y pesticidas biorracionales.....	pág. 47.
1.7. LINDANO (γ -HCH).....	pág. 50.
1.7.1. Propiedades físico-químicas y uso.....	pág. 50.
1.7.2. Distribución y acción sobre los organismos..	pág. 56.
1.7.3. Metabolismo. Transaminasas.....	pág. 67.
1.7.4. Neurotoxicidad. Dopamina.....	pág. 74.
1.7.5. Toxicidad aguda y crónica.....	pág. 82.
1.7.6. Mutagenicidad y carcinogenicidad.....	pág. 88.
1.8. Objetivos.....	pág. 90.

2.- MATERIAL Y METODOS.

2.1. Material.....	pág. 94.
2.2. Métodos.....	pág. 98.
2.2.1. Determinación de lindano en órganos.....	pág. 98.
2.2.2. Determinación de aminas biógenas.....	pág. 109.
2.2.3. Determinación de transaminasas: ASAT y ALAT.	pág. 117.
2.2.4. Estudio morfológico.....	pág. 118.
2.2.5. Tratamiento estadístico de los datos.....	pág. 121.

3.- RESULTADOS.

3.1. Neurotoxicidad.....	pág. 126.
3.2. Variaciones en el peso de los animales.....	pág. 132.
3.3. Acumulación de lindano en órganos.....	pág. 146.
3.4. Dopamina.....	pág. 161.
3.5. Transaminasas: ASAT y ALAT.....	pág. 168.
3.6. Morfología.....	pág. 168.

4.- DISCUSION.....

4.1. Neurotoxicidad.....	pág. 189.
4.2. Variaciones en el peso de los animales e índices órgano-somáticos.....	pág. 190.
4.3. Distribución y acumulación de lindano en órganos.....	pág. 192.
4.4. Dopamina.....	pág. 193.
4.5. Valoración de transaminasas.....	pág. 195.
4.6. Estudio morfológico.....	pág. 197.

5.- CONCLUSIONES.....

6.- CONSIDERACIONES GENERALES.....

7.- BIBLIOGRAFIA.....

INDICE DE TABLAS.

TABLA Nº	CONTENIDO	PAG.
nº1	Distribución de animales que sufrieron los distintos tipos de pautas con la dosis aguda.....	131.
nº2	Pesos iniciales, finales y de los órganos de los animales machos utilizados para la dosis aguda.....	133.
nº3	Pesos iniciales, finales y de los órganos de los animales hembras utilizados para la dosis aguda.....	134.
nº4	Incremento medio \pm error standard de peso total en machos y hembras de la dosis aguda.....	135.
nº5	Pesos iniciales, finales y de los órganos de los animales machos utilizados para la dosis subcrónica.....	137.
nº6	Pesos iniciales, finales y de los órganos de los animales hembras utilizados para la dosis subcrónica.....	138.
nº7	Incremento medio \pm error standard de peso total en machos y hembras de la dosis subcrónica.....	139.
nº8	Diferencias medias \pm error standard en el incremento de peso total entre dosis aguda y dosis subcrónica.....	141.

nº9	Índice organosomático de la dosis aguda: peso del hígado/peso total y peso del riñón/peso total.....	143.
nº10	Índice organosomático de la dosis subcró- nica: peso del hígado/peso total y peso del riñón/peso total.....	144.
nº11	Índice organosomático: peso hígado/peso del riñón y peso del riñón/peso total.....	145.
nº12	Dosis aguda: acumulación de lindano en órganos de animales machos.....	147.
nº13	Dosis aguda: acumulación de lindano en órganos de animales hembras.....	148.
nº14	Dosis aguda: acumulación media \pm error standard por sexos de lindano en órganos....	149.
nº15	Dosis aguda: acumulación media \pm error standard de lindano en órganos.....	151.
nº16	Dosis aguda : nivel de significación entre los órganos de animales experimentales.....	153.
nº17	Dosis subcrónica: acumulación de lindano en órganos en animales machos.....	154.
nº18	Dosis subcrónica: acumulación de lindano en órganos en animales hembras.....	155.
nº19	Dosis subcrónica: acumulación media \pm error standard por sexos de lindano en órganos.....	156.
nº20	Dosis subcrónica: acumulación media \pm error standard de lindano en órganos.....	157.

nº21	Dosis subcrónica: nivel de significación entre los órganos de animales experimentales.....	159.
nº22	Dosis aguda: niveles medios \pm error standard de dopamina.....	162.
nº23	Dosis subcrónica: niveles medios \pm error standard de dopamina.....	164.
nº24	Niveles medios \pm error standard de dopamina y porcentaje de descenso en la dosis aguda y dosis subcrónica.....	166.

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA Nº	CONTENIDO	PAG.
I	Tipos de pautas exhibidas por los animales con la dosis aguda.....	128.
II	Frecuencia de los tipos de pautas observados en los animales experimentales con la dosis aguda.....	129.
III	Porcentaje de aparición de los diversos síntomas de intoxicación aguda por lindano.....	130.
IV	Dosis aguda: valores medios \pm error standard del incremento de peso total.....	136.
V	Dosis subcrónica: valores medios \pm error standard del incremento de peso total.....	140.
VI	Valores medios \pm error standard del incremento de peso en la dosis aguda y dosis subcrónica.....	142.
VII	Dosis aguda: acumulación media \pm error standard de lindano en órganos.....	150.
VIII	Dosis aguda: valores de acumulación media \pm error standard de lindano en órganos.....	152.
IX	Dosis subcrónica: acumulación media \pm error standard de lindano en órganos.....	158.
X	Concentraciones medias \pm error standard de lindano en órganos de dosis aguda y dosis subcrónica.....	160.

XI	Dosis aguda: niveles medios \pm error standard de dopamina.....	163.
XII	Dosis subcrónica: niveles medios \pm error standard de dopamina.....	165.
XIII	Niveles medios \pm error standard de dopamina en la dosis aguda y dosis subcrónica...	167.
XIV	Dosis aguda : niveles medios \pm error standard de ASAT en suero. Comparación entre controles y experimentales en la dosis aguda.....	169.
XV	Dosis aguda : niveles medios \pm error standard de ALAT en suero. Comparación entre controles y experimentales en la dosis aguda.....	170.
XVI	Dosis subcrónica : niveles medios \pm error standard de ASAT en suero. Comparación entre controles y experimentales en la dosis subcrónica.....	171.
XVII	Dosis subcrónica : niveles medios \pm error standard de ALAT en suero. Comparación entre controles y experimentales en la dosis subcrónica.....	172.

MICROFOTOGRAFIAS.

Nº	CONTENIDO	PAG.
nº1	Animal control. Órgano: Hígado. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 10 aumentos.....	176.
nº2	Animal control. Órgano: Hígado. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 40 aumentos.....	176.
nº3	Animal control. Órgano: Hígado. Tinción: Sudán IV. 10 aumentos.....	177.
nº4	Animal control. Órgano: Riñón. Tinción: Sudán IV. 10 aumentos.....	177.
nº5	Animal control. Órgano: Riñón. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 40 aumentos.....	178.
nº6	Animal control. Órgano: Riñón. Tinción: Sudán IV. 40 aumentos.....	179.
nº7	Animal control. Órgano: Riñón. Tinción: Sudán IV. 40 aumentos.....	179.
nº8	Dosis aguda. Animal experimental. Órgano: Hígado. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 40 aumentos.....	180.
nº9	Dosis aguda. Animal experimental. Órgano: Hígado. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 100 aumentos.....	180.
nº10	Dosis aguda. Animal experimental. Órgano: Riñón. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 40 aumentos.....	181.

nº11	Dosis aguda. Animal experimental. Organo: Riñón. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 100 aumentos.....	181.
nº12	Dosis aguda. Animal experimental. Organo: Riñón. Tinción: Sudán IV. 40 aumentos.....	182.
nº13	Dosis aguda. Animal experimental. Organo: Riñón. Tinción: Sudán IV. 40 aumentos.....	182.
nº14	Dosis aguda. Animal experimental. Organo: Hígado. Tinción: Sudán IV. 40 aumentos.....	183.
nº15	Dosis subcrónica. Animal experimental. Organo: Riñón. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 10 aumentos.....	183.
nº16	Dosis subcrónica. Animal experimental. Organo: Hígado. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 40 aumentos.....	184.
nº17	Dosis subcrónica. Animal experimental. Organo: Hígado. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 100 aumentos.....	184.
nº18	Dosis subcrónica. Animal experimental. Organo: Riñón. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 40 aumentos.....	185.
nº19	Dosis subcrónica. Animal experimental. Organo: Riñón. Tinción: Hematoxilina-Eosina. 100 aumentos.....	185.
nº20	Dosis subcrónica. Animal experimental. Organo: Hígado. Tinción: Sudán IV. 100 aumentos.....	186.

- nº21 Dosis subcrónica. Animal experimental.
Organo: Riñón. Tinción: Sudán IV.
100 aumentos..... 186.
- nº22 Dosis subcrónica. Animal experimental.
Organo: Riñón. Tinción: Sudán IV.
40 aumentos..... 187.
- nº23 Dosis subcrónica. Animal experimental.
Organo: Riñón. Tinción: Sudán IV.
40 aumentos..... 187.

INTRODUCCION

"Cubrieron toda la superficie de la tierra, que se oscureció. Devoraron todas las hierbas de la tierra, todos los frutos de los árboles, todo cuanto había dejado el granizo; y no quedó nada de verde, ni en los árboles, ni en los campos, en toda la tierra de Egipto".

Exodo, 10: 14-15.

INTRODUCCION.

1.1. BREVE HISTORIA DE LOS PESTICIDAS.

Antes de la aparición del ser humano, millones de organismos diferentes luchaban por sobrevivir, y no hubiera tenido sentido el término "peste". Hace 250.000 años, cuando apareció el *Homo sapiens*, surgió la palabra "peste" y con ella designó a algunos de estos organismos. De hecho, el término "peste", totalmente orientado hacia la especie humana, se define como un organismo que reduce la disponibilidad, calidad o valor de alguna fuente humana. Esta fuente puede ser una planta o animal desarrollado para alimento, placer o la salud de una persona, bienestar o paz interior (Flint y van den Bosch, 1981).

La consideración de "peste", se basa en las necesidades y valores humanos y así puede cambiar de una situación a otra. El mismo organismo que es una peste en un caso puede ser considerado un aliado en otro. De hecho, la mayoría de los organismos no son pestes, y muchos están considerados como beneficiosos, tales como los organismos de los que nos alimentamos o disfrutamos, aquellos que ayudan a polinizar o controlar organismos indeseables, etc... (van den Bosch, 1978).

Las pestes, bajo una perspectiva utilitaria, incluyen un amplio rango de organismos desde formas microscópicas como virus y bac-

terias, nemátodos, hongos hasta arbustos y animales vertebrados.

Los artrópodos, y más concretamente los insectos, son a menudo plagas. En el mundo, cerca de 10.000 especies de insectos son plagas en cultivos, ganadería, salud humana y productos almacenados. Las malas hierbas son otra categoría de peste. Existen cerca de 30.000 especies de plantas clasificadas como malas hierbas, y más de 1.800 causan pérdidas económicas en agricultura. En el área agrícola existe una extensa variedad de plagas; más de 1.500 enfermedades son causadas por unas 50.000 especies de hongos y más de 1.500 especies de nemátodos dañan los cultivos (National Academy of Sciences, 1975).

Según Gips, 1988, un artículo de las Naciones Unidas estimaba que había aproximadamente dos millones de envenenamientos por pesticidas anualmente, casi cuatro por minuto en el mundo. Aproximadamente el 50% de estos tenían lugar en el Tercer Mundo, donde el consumo de pesticidas es relativamente alto.

En los últimos 30 años, el uso de pesticidas en los Estados Unidos ha aumentado doce veces mientras que las pérdidas de cultivos por plagas casi se han doblado. En menos de medio siglo, se ha notado un aumento de 64 veces la resistencia a plagas por parte de los organismos. Por ejemplo, de solamente siete especies de insectos y ácaros resistentes al DDT en 1938 a 447 especies resistentes a al menos uno o más insecticidas en 1984. La resistencia a los pesticidas se ha encontrado en numerosas especies

de plantas, nemátodos y roedores (Gips, 1988). En Africa, la venta de pesticidas se multiplicó por cinco de 1.964 a 1.978, sin embargo la producción de alimento descendió un 1%.

En 1.985, la Red de Acción contra Pesticidas (PAN), de carácter internacional, una red de más de 300 organizaciones no gubernamentales, lanzó una campaña de información pública contra 12 de los más peligrosos pesticidas del mundo, la "Docena Sucia": DDT, "los Drins" (Aldrín, Dieldrín, Endrín), Etilendibromo, Clordano/Heptacloro, Paration, Paraquat, 2,4,5-T, Clordimeform, Dibromocloropropano, γ -HCH (lindano), Toxafeno y Pentaclorofenol. Aunque prohibidos en un término medio de 12 países, la "Docena Sucia" todavía se produce y utiliza en muchos países industrializados y desarrollados (Gips, 1988).

Los promedios generales de producción y de consumo mundiales de plaguicidas han venido incrementándose desde la década de 1940, considerándose que en 1970 se vendieron 2.700 millones de dólares, en 1982, 14.000 millones y se esperaban 20.000 millones para después de 1990 (Hallenbeck y Cunninghamburns, 1985).

"Pesticida" es un término sombrilla utilizado para describir cualquier producto químico que controle o mate una peste, sea insecto, semilla, enfermedad, animal vertebrado, etc. Mucho antes de conocer la biología de las pestes, los hombres desarrollaron muchos métodos biológicos, culturales y físicos para la protección de cultivos, animales y para la suya propia. Muchas de estas prácticas mostraron validez científica, aunque originalmente

derivaron de métodos empíricos imperfectos (Ordish, 1976).

Los primeros métodos para controlar malas hierbas involucraron al hombre, al ganado y a la energía mecánica. Desde el año 6.000 A.C. hasta el 5.000 A.C. las malas hierbas se controlaron por las manos de los hombres. Instrumentos rudimentarios de madera, incluidos azadones, utilizados del 3.000 al 2.000 A.C. se suplieron por segadoras manuales y el primer arado de madera apareció hacia el año 1.000 A.C. El primer arado metálico, tirado por caballos o mulas, se introdujo en 1837 D.C. (Timmons, 1970).

Van den Bosch (1978), en su obra "La conspiración de los pesticidas", señala que la agricultura comenzó en el año 8.000 A.C.. Los primeros datos sobre pesticidas son de antes del 2.500 A.C. cuando los sumerios utilizaron compuestos de azufre para controlar insectos y ácaros. Evidencias posteriores (1.500 A.C.) se encontraron en un papiro egipcio que recogía fórmulas para la elaboración de preparaciones contra chinches, pulgas y avispas. Por el año 1.200 A.C., los chinos desarrollaron pesticidas derivados de plantas para el tratamiento de semillas (Flint y van den Bosch, 1977).

Escritores griegos y romanos describieron prácticas similares. Herodoto mencionó la construcción de altas redes para contener mosquitos (450 A.C.), y Aristóteles describió la utilización por los griegos (350 A.C.), de la fumigación. El romano Cato relató el uso de rociadores de aceite, aceite y ceniza, ungüentos de betún de azufre y aceite y de betún pegajoso para control de pes-

tes. La última mezcla, aplicada como "banda de grasa" para prevenir la infección de la hoja de vid, *Vitis vinifera*, L., todavía es utilizada en Turquía, mientras que una mezcla de aceite y alquitrán fue utilizada por los cultivadores de fruta a principios de siglo. (Flint y van den Bosch, 1981).

Varios siglos antes de Cristo, los chinos desarrollaron técnicas significativas en el control de plagas, aprendiendo a controlar poblaciones de insectos por explosión de "enemigos naturales" y por adaptación de los cultivos. La tecnología por el control de las plagas en China continuó desarrollándose durante el nuevo milenio, dando como resultado el inicio en la aplicación del control biológico. Por el año 300, los chinos introdujeron colonias de hormigas depredadoras en sus huertos de cítricos para controlar orugas y escarabajos. Los nidos de hormigas se colocaban estratégicamente en los huertos y se canalizaba su recorrido por la construcción de pistas de bambú que les dejaban caminos hacia los árboles infectados. También desarrollaron varios controles químicos, incluyendo la aplicación de arsénico blanco a la raíz de algunas plantas para proteger los trasplantes de arroz, *Oryza sativa*, L., contra los insectos (siglo IV). El azufre y el cobre se utilizaron para controlar piojos y aplicaciones de aceite de cerdo para proteger a las ovejas de parásitos.

Mientras China continuó avanzando, los métodos europeos confiaban menos en los conocimientos biológicos y aumentaban en la fe religiosa, supersticiones y pronunciamientos legales. Por ejemplo,

a Mahoma en los campos de cultivo (571-630) o, en Berna, Suiza, se llevaban larvas de mariposas a la corte, se determinaba su culpabilidad y eran excomulgadas por el arzobispo (1476).

El acercamiento europeo se inició cuando el Renacimiento introdujo la búsqueda por el conocimiento científico y un entendimiento de los organismos, acelerado por la invención del microscópio y el descubrimiento de las bacterias en 1.675. En la primera mitad del siglo XVIII, el taxonomista y científico sueco Linneo contribuyó con un sistema de identificación de insectos y sugirió el uso de escarabajos de tierra, neurópteros y parásitos para control de plagas biológicas. La extensa experimentación y las preparaciones de pesticidas comenzó en los siglos XVIII y XIX. En 1.807, el uso de sulfato de cobre en el tratamiento de semillas para prevenir la enfermedad del hinchazón del trigo, *Triticum sp.*, fue descubierto en Francia después de empapar las semillas con cobre. También, se fueron utilizando pesticidas de origen vegetal de forma progresiva, incluida la infusión de hoja de tabaco, *Arnica montana, L.* El pesticida natural, rotenona, hoy en día popular, se empleó ya en Europa hacia 1.848 para controlar las orugas (Ware, 1983).

Entre 1.750 y 1.880 se vivió en Europa una época de revolución agrícola. Los campos aumentaron un 150% su producción, resultante de varios factores. Primero, las nuevas técnicas agrícolas, tales como prácticas de abono sofisticadas y buenos sistemas de rotación que incluían cultivos fijadores de nitrógeno. Segun-

do, la parcial redistribución de la tierra, mitigando las relaciones patrón-esclavo. Y, finalmente, el desarrollo de la maquinaria agrícola permitió cultivos en hilera y la separación de las malas hierbas mediante azadón.

Mientras el cambio en la agricultura subsistía a escala más grande, la producción del monocultivo, al principio, produjo tremendos aumentos de las cosechas. Ahora bien, las nuevas prácticas también contribuyeron a algunos de los peores desastres en la agricultura nunca recordados; como fue la producción de patata, *Solanum tuberosum*, L., que arruinó los últimos años de la década de 1840, o el comienzo del moho gris, *Botrytis cinerea*, en la década de los 50 del siglo XVIII en áreas de crecimiento de la uva en Europa, la invasión europea por los insectos americanos, la filoxera, *Phylloxera vastatrix*, de la uva, que llevó a la temprana destrucción de la industria vitícola en Francia (1848-1878), etc... (Flint y van den Bosch, 1981). Estos desastres, **aparte de incrementar el estudio científico, aportaron algo acerca del cambio desde el punto de vista del control de las pes-**tes. De hecho, el principal papel jugado en el control de la filoxera de la uva y el moho gris fue debido a los esfuerzos humanos. Cuando el control químico se mostró inefectivo para controlar la filoxera, se encontró una solución en el injerto de rizomas de variedades de uvas americanas que eran resistentes a la filoxera.

Además, el problema del moho gris se resolvió por un descubrimiento accidental de un granjero que aplicó una solución de cobre

y cal a las plantas de la uva. Este descubrimiento acabó en el desarrollo del "caldo bordelés" (cal hidratada más sulfato de cobre), siendo todavía el fungicida más utilizado en el mundo. El descubrimiento también llevó consigo la creación del "verde de París" (acetometarsenito de cobre), otro popular fungicida e insecticida (Bowman, 1984).

El conocimiento de estas experiencias, complementado por un crecimiento en la literatura científica, condujo a la evolución de métodos que dominaron el control de las plagas durante los siguientes cincuenta años. Mientras que se mejoró la formulación y aplicación de los controles químicos en este mismo periodo, los materiales utilizados no cambiaron significativamente. Los principios activos eran compuestos de arsénico, antimonio, selenio, azufre, talio, zinc, cobre o alcaloides derivados de plantas. También se utilizaron varios aceites y la fumigación se llevó a cabo con gas de cianuro de hidrógeno.

Hacia 1850 se introdujeron dos importantes insecticidas naturales: la rotenona obtenida de las raíces de la planta derris, *Derris elliptica*, y el piretro procedente de las cabezas florales de una especie de crisantemo, *Crysanthemum cinerariaefolium* (Cremllyn, 1982).

La última mitad del siglo XIX y la primera parte del XX marcaron una época reveladora en el control de plagas. Los científicos empezaron a descubrir la base biológica para el control de éstas. En parte por intuición y en parte porque no había alternativas

efectivas, los científicos abogaron por prácticas que maximizarían los beneficios de controles naturales biológicos y ambientales. Metcalf, 1930, describió, que a finales de 1800, Stephen A. Forbes, entomólogo de la Universidad de Illinois, adoptó la palabra "ecología" y añadió una extensa aplicación de principios ecológicos en el control de insectos en cultivos agrícolas. Otros expertos en control de pestes de esta época abogaron por un aproximamiento ecológico que integraba una serie de técnicas supresoras de pestes, tales como variedades de cultivos resistentes, prácticas culturales y control biológico. Por ejemplo, el tratamiento de gorgojos se basó en principios ecológicos antes de que surgiera la tecnología del control químico (Smith y col., 1976). Este coleóptero, endémico de México y América Central, se propagó hacia el sur de EE.UU. al final del siglo XIX. En una década se desarrolló un sistema de tratamiento que integraba variedades de algodón que maduraban muy pronto, antes de que las poblaciones de gorgojo aumentaran significativamente; también se emplearon prácticas de control de cultivos, tanto ambientales como biológicas. En 1919, cuando el arseniato cálcico fue descubierto para controlar la peste, los científicos recomendaron que se aplicara solamente si las medidas de control biológicas fallaban para prevenir que el gorgojo causara daños económicos.

Los patólogos de plantas desarrollaron importantes conceptos y técnicas para el tratamiento de enfermedades. Por ej., se reconocieron plantas resistentes a enfermedades en el siglo XIX, y las variedades de cultivo resistentes a la enfermedad aumentaron

después del redescubrimiento de las leyes de Mendel sobre la herencia en 1900. Siguiendo estos descubrimientos, se controlaron importantes enfermedades en plantas de muchos cereales y de algunos cultivos en horticultura (Apple, 1977).

El mayor triunfo con la importación y establecimiento de enemigos naturales para el control biológico sucedió en 1890. Después de su introducción accidental en los últimos años de 1860, una polilla se extendió a través de áreas de cítricos de California y amenazó con destruir toda la industria de los años 80 del siglo XIX. La peste llegó originariamente desde Australia, y se buscó un enemigo natural de esta. Después de encontrar al escarabajo vedalia, *Rodolia cardinalis*, se comprobó un rápido y efectivo control, y se enviaron 140 de estos predadores a California. En año y medio, los descendientes de estos escarabajos controlaron esta peste. El control ha sido mantenido desde ese tiempo por este escarabajo (excepto una vez cuando los escarabajos fueron aniquilados por el DDT y hubo que reintroducirlos) y por una mosca parásita, *Cryptochaetum iceryae*, que es un enemigo natural. En la década de 1890-1900, la entomología médica demostró un extraordinario avance con los descubrimientos de las garrapatas, *Ixodes ricinus* L., del ganado (1893) que producían una fiebre altísima, de la mosca tse-tse, *Glossina morsitans*, que transmitía la enfermedad del sueño africano (1896), de pulgas que parasitaban ratas, de la bacteria, *Yersinia pestis*, causante de la peste bubónica, de los mosquitos, *Anopheles* sp., portadores de la malaria (1897), de las moscas que transmitían la fiebre ti-

foidea (1.898) y mosquitos portadores del virus de la fiebre amarilla (1.900). Estos descubrimientos significaron que muchas enfermedades graves serían controladas a través de los vectores transmisores en humanos y animales.

Pronto se llegó a la idea de que la incidencia de muchas enfermedades graves se reduciría a través del control de los vectores de la enfermedad. Por ejemplo, una estrategia para el tratamiento del mosquito integró la manipulación ecológica de los hábitats de cría acuáticos y la utilización ocasional de queroseno para aniquilarlos. De hecho, estos descubrimientos jugaron un papel crítico en la terminación del Canal de Panamá por los americanos en 1915. Mientras los franceses habían fracasado en su terminación en el último cuarto del siglo XIX como resultado de su incapacidad para controlar la malaria y la fiebre amarilla, los americanos enfocaron el problema en la destrucción de lugares de cría por drenaje, relleno, creación de embalses, desbordamientos periódicos y el uso ocasional de larvicidas tales como el queroseno, pero parece ser que a la vez se olvidaban de los desastres ecológicos que ello llevaba consigo.

Durante este periodo, el control de las malas hierbas se mantuvo por una combinación de rotación en el cultivo con cultivos competitivos de malas hierbas, limpieza de cultivos, de cosechas y separación de las malas hierbas. El primer control químico de malas hierbas no tuvo lugar hasta 1.896 cuando se descubrió el sulfato de hierro, que se empleó para matarlas en amplios campos de

cultivos de cereales. Otros compuestos inorgánicos simples, tales como el nitrato de sodio, sulfato amónico y ácido sulfúrico, fueron utilizados de forma limitada como herbicidas en la década siguiente.

Al finalizar el siglo XIX, se establecieron cinco formas para controlar las plagas : 1) control biológico, 2) control físico y mecánico, 3) control cultural, 4) control químico y 5) variedades resistentes (Flint y van den Bosch, 1981).

A principios de siglo aumentó el número de personas empleadas activamente como entomólogos, patólogos de plantas y expertos en control de plagas, lo cual hizo que aumentara la literatura sobre el tema. Los textos empezaron a revelar sistemáticamente, formulaciones y aproximaciones biológicas para controlarlas. Se hizo énfasis en la necesidad de entender la biología de la plaga en orden a hacer intervenciones propias.

El control de patógenos de plantas avanzó significativamente con el desarrollo de cultivos de éstas y el control de malas hierbas, así como mejoraron los equipos de agricultura y métodos de cultivo. El control biológico de las malas hierbas se manifestó de forma dramática en Australia en 1926 cuando una polilla, *Cactoblastis sp.*, y otros insectos que se alimentaban de cactus se introdujeron para controlar el crecimiento de éstos. En diez años, desaparecieron más de 60 millones de acres de los mismos a consecuencia de la acción de esta polilla.

A partir de 1921, los controles químicos se vieron incrementados por la aplicación de las sustancias desde aeroplanos. Aumentó significativamente el rociado de insecticidas inorgánicos y llegó a ser el principal control químico de pestes. El arseniato de plomo, un veneno con toxicidad de amplio espectro, fue el insecticida más utilizado hasta la introducción de compuestos de fluor.

Sin embargo, los problemas empezaron a aparecer debido a que los pesticidas inorgánicos tenían alta toxicidad y persistencia en el medio. Además, varios pesticidas, que habían sido efectivos, fallaron pronto en el control de ciertas pestes. Algunos científicos encontraron que mientras el pesticida destruía la mayor parte de la población de una peste particular, unos pocos sobrevivían cada vez. Estos pocos se reproducían y pasaban las cualidades de supervivencia a la siguiente generación. Esta nueva generación era resistente al pesticida y crecía sin ningún tipo de control.

Hasta el advenimiento de la revolución industrial el arsenal fitosanitario era principalmente de sustancias minerales. La era de los pesticidas minerales es la del siglo XIX y los progresos en la segunda mitad del siglo XIX serán el germen de los descubrimientos de pesticidas orgánicos de síntesis, aunque sus propiedades como tales no fueran entonces conocidas. Así, los ésteres fosfóricos se sintetizaron en 1845, y Zeidler sintetiza en 1874 el DDT, el primer insecticida organoclorado, aunque sus pro-

piedades insecticidas aún no eran conocidas. El grupo de los carbamatos, que representa hoy una familia esencial entre los pesticidas, se inicia con la fisostignina que se sintetiza en 1935. La generalización en el uso de las moléculas orgánicas de síntesis en la agricultura ocurrió después de la Segunda Guerra Mundial. A partir de 1950 se produce la aplicación masiva de pesticidas orgánicos de síntesis. Entre los factores que explican esta práctica se encuentran los siguientes: necesidad de resurgimiento económico, evolución en la estructura de producción agrícola, escasez de mano de obra y, sobre todo, la presión de una industria química muy potente, desarrollada durante la guerra, que ensaya innumerables productos químicos con vistas a la diversificación de la lucha -acción selectiva- acompañada de una legislación muy laxa en dicha materia (Martínez-Conde y col., 1983).

- LA REVOLUCION EN EL CONTROL DE LAS PESTES: DDT.

La Segunda Guerra Mundial trajo consigo una revolución en el control de las plagas con el desarrollo de los pesticidas orgánicos de síntesis que reemplazaron a los compuestos inorgánicos. En EE.UU. y Europa, se probaron cientos de productos químicos como insecticidas. Uno de estos, el dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), se mostró, en cuanto a efectividad, superior a todos. Las propiedades insecticidas del DDT fueron descubiertas en 1934 por el químico suizo Dr. Paul Mueller, un empleado de J.R. Geigy (ahora Ciba-Geigy). Su primer éxito fue controlar una epidemia del escarabajo de la patata o dorífora del Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, en Suiza en 1939. En 1942, la casa Geigy informó

a la armada de U.S.A. de la efectividad del DDT como un agente para controlar el tifus. Las muestras recogidas se enviaron a los EE.UU. y los resultados de los tests fueron tan asombrosos que se asignaron 29 científicos para desarrollar los compuestos del DDT para uso militar. La producción comercial comenzó en 1.943, y el DDT efectuó su primera acción en octubre de ese año, cuando alrededor de 1.300.000 personas fueron rociadas en Nápoles, Italia, para prevenir una epidemia de tifus (Gips, 1988).

Después de la guerra, el DDT se utilizó no sólo para controlar vectores, sino como un insecticida de amplio espectro y para múltiples aplicaciones en agricultura.

La industria de los pesticidas creció como una de las corporaciones más grandes y empezó a desarrollar, manufacturar y vender estos productos. Los equipos de aplicación en el campo mejoraron y el uso de pesticidas se extendió desde los huertos hasta los grandes cultivos, así como a las áreas urbanas y recreativas. El aumento de pesticidas coincidió con un cambio fundamental en la actitud hacia el control de la peste. Los años de buenos criterios acerca del control biológico se olvidaron, para despertar al nuevo "milagro" de los pesticidas. Muchos entomólogos se encontraron avocados al uso del DDT y abandonaron la búsqueda de formas biológicas para controlar pestes. Al enfocarse el problema sobre la química, el control de las pestes cambió y el problema ecológico se convirtió en químico o de ingeniería, no teniendo en cuenta la problemática ecológica (Flint y van den Bosch, 1981).

Muchos agricultores emplearon DDT para destruir las plagas y mejorar las cosechas, otros se vieron forzados a adoptar su uso para poder ser competitivos. Con esta, aparentemente, poderosa arma, muchos agricultores atisbaron que se podrían sustituir algunas de sus acciones para prevenir el control de plagas, tales como las rotaciones, salubridad en los cultivos y estímulos de enemigos naturales. Estas prácticas fueron reemplazadas por rociamientos automáticos de los campos por programación a pesar de los niveles de pesticidas que se pudieran alcanzar en el medio. El DDT y los otros pesticidas "milagro" actuaron tan eficazmente que la erradicación de las plagas fue total.

Sin embargo, la esperanza del DDT se vió rápidamente truncada. Las moscas, en Suecia, empezaron a ser resistentes en 1.946, y pronto aumentaron los casos de resistencia en todo el mundo. En 1.975, la mayoría de las plagas por insectos en agricultura en California habían desarrollado resistencia al DDT.

Los agricultores empezaron a darse cuenta del resurgir de la plaga-objeto. Después de rociar, a veces la población de la plaga descendía drásticamente y de pronto resurgía hasta niveles más altos que al inicio. Esto era porque, como insecticida de amplio espectro, el DDT mataba a los enemigos naturales de la plaga tanto como a la plaga misma. Los pocos enemigos naturales supervivientes, a menudo pasaban hambre hasta morir ya que las poblaciones de la plaga eran, temporalmente, demasiado bajas para proveer alimento adecuado. Otros emigraron en busca de alimento.

Los supervivientes de la peste, por otra parte, estaban libres de sus enemigos naturales y su población crecía sin control. Otro problema fue el inicio de pestes secundarias inducidas. Las poblaciones de insectos que, en un principio, no se consideraban pestes de pronto surgieron para producir perjuicio. Estos comienzos normalmente eran el resultado de la desaparición de los enemigos naturales, hasta el punto de haber protegido efectivamente la nueva peste bajo un perfecto control biológico. Por ejemplo, la polilla del algodón en los huertos de California, que había sido protegida bajo un completo control biológico desde 1890 por el escarabajo vedalia y una mosca parásita, explotó de nuevo en un gran problema en los huertos donde fue utilizado el DDT. El escarabajo murió por la acción del DDT y la polilla fue rápidamente liberada de los sesenta años de control biológico.

Los granjeros intentaron contrarrestar los problemas de resistencia de la peste, de resurgimiento e inicios de pestes secundarias con aplicaciones más frecuentes de pesticidas. Con esto se agravó el problema y se creó para ellos "el tormento del pesticida".

En suma, por causar problemas a los insectos que actuaban como enemigos naturales, el DDT mató o interrumpió la reproducción de un rango de organismos que no eran su objetivo, desde los halcones peregrinos, *Falco peregrinus*, y pingüinos, *Columbus arcticus*, de la Antártida a peces de las profundidades oceánicas y ranas boreales. La capacidad del DDT para persistir en el medio y acumularse en las grasas de los animales le permitió llegar a con-

centrarse en la cadena alimentaria. Esto llegó incluso a crear serios problemas de contaminación en leche humana (Edwards, 1975).

1.2. COMPUESTOS QUÍMICOS DE SÍNTESIS.

La defensa de los animales y de los cultivos llevó a la búsqueda de métodos para controlar las plagas, basándose en el uso masivo de compuestos químicos en las cinco últimas décadas.

El cúmulo de xenobióticos que se ha desarrollado durante décadas en cantidad y calidad constituye hoy un conjunto muy vasto y heterogéneo. Estos productos químicos de síntesis, que se han denominado pesticidas, o plaguicidas, contienen sustancias o principios activos, así como disolventes, dispersantes, excipientes, etc... que ayudan a que actúe el principio activo. Aunque la mayoría carece de especificidad, los podemos clasificar:

A) Según el tipo de organismo a controlar. Son muchos los productos que tienen más de un uso habitual. Las categorías más frecuentes son :

Herbicidas: sustancias destinadas a destruir o detener el crecimiento de los vegetales, herbáceos o leñosos; entre ellos se distinguen varios grupos.

Insecticidas: destinados, como su propio nombre indica, a matar insectos; aunque no son nada específicos, por un lado hay productos que destruyen los insectos o impiden la eclosión de sus huevos, el desarrollo normal de sus larvas o maduración sexual, de otro lado hay

productos que destruyen animales próximos, como los ácaros.

Fungicidas: aunque el nombre hay que tomarlo en sentido restrictivo, su acción no lo es; luchan contra los hongos fitopatógenos, principalmente, pudiendo diferenciarse productos de tratamiento de invierno para la arboricultura, productos preventivos y productos curativos.

Rodenticidas, empleados contra los roedores.

Nematicidas, empleados para eliminar toda clase de gusanos.

Molusquicidas, exterminan los caracoles, limacos y babosas.

Esterilizantes, inhiben la fertilidad de los huevos de insectos, repelentes, atravesantes, etc. (B.O.E., 1984).

B) Según la composición química de los diferentes compuestos. Algunos de los grupos más frecuentes son :

Organoclorados, organofosforados, carbamatos, fenoxiacéticos, cloronitrofenoles, organomercuriales, bipiridilos, piretroides, tiocarbamatos, derivados triazínicos (Cremlyn, 1982).

Estos productos químicos de síntesis están destinados a cualquiera de los siguientes fines :

- a) Combatir los agentes nocivos para los animales y vegetales o prevenir su acción.

- b) Favorecer o regular la producción vegetal, con excepción de los nutrientes y los destinados a la enmienda de los suelos.
- c) Conservar los productos vegetales, incluida la protección de las maderas.
- d) Destruir animales y vegetales indeseables.
- e) Destruir parte de los vegetales o prevenir un crecimiento indeseable de los mismos.
- f) Hacer inofensivos, destruir o prevenir la acción de otros organismos nocivos o indeseables distintos de los que atacan a los vegetales (B.O.E., 1984).

Los promedios generales de producción y de consumo mundiales de plaguicidas han venido incrementándose desde la década de 1.940. El uso de plaguicidas, viene presentando una serie de problemas, de los cuales los más frecuentes son los siguientes:

- a) Resurgimiento de la plaga que interesa controlar.
- b) Destrucción de especies benéficas.
- c) Liberación de plagas secundarias de la restricción por parte de sus enemigos naturales; también conocida como "emergencia" de nuevas plagas.
- d) Fitotoxicidad y alteraciones fenológicas de la planta huésped.
- e) Selección de variedades resistentes al pesticida o cambio en las poblaciones de especies.
- f) Toxicidad para el ser humano y animales a corto y largo plazo (Hallenbeck y Cunninghamburns, 1985).

1.3. ORGANOCLORADOS : FORMULACION Y PROPIEDADES.

- FORMULACION.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la mayor parte de los pesticidas fabricados no constan tan solo del principio activo, sino que a éste se le unen disolventes, dispersantes, excipientes, etc., que ayudan de una u otra manera a que el principio activo actúe.

Raramente son comercializados como materias activas pues se presentan bajo forma de preparados que son especialidades comerciales vendidas con nombres "exóticos".

La mezcla del principio activo con otros materiales, para facilitar la aplicación del producto, se denomina formulación. El principio activo se presenta en concentraciones compatibles con su utilización, que se consigue gracias a los diluyentes (materias sólidas en el caso de los polvos o solventes en las preparaciones líquidas). Los solventes suelen ser: agua, alcoholes, petróleo, aceite vegetal, productos de la destilación del petróleo y alquitrán de hulla. Estos últimos contribuyen a la actividad de la preparación.

Los pesticidas se asocian y para ello necesitan de coadyuvantes; los hay termoactivos, otros que rebajan la tensión superficial favoreciendo el contacto entre sustancias no miscibles, otros mejoran la adhesibilidad sobre el vegetal, también los hay anties-

pumantes, antitranspirantes, etc. A algunos se les añaden colorantes y sustancias de mal olor con el fin de que el color y el hedor influyan sobre los animales superiores para prevenir intoxicaciones.

La mayoría presenta una estructura química complicada que está justificada si se considera que cada molécula va a tener que poseer: una parte activa, que condiciona la mayor o menor solubilidad en el agua y otra que hace de soporte de las anteriores y condiciona la solubilidad en las grasas.

Es difícil precisar y atribuir estas cualidades a una estructura química y hay casos en los que un mismo grupo, por ejemplo, el -OH favorece la solubilidad en el agua y además es parte de la estructura activa; éste sería el caso del nitrato de fenol en los herbicidas.

La estructura química y la fórmula de los pesticidas juega un papel determinante en el acceso del principio activo a las células vivas. Dentro de los organoclorados, el principio activo es la parte común a todas las moléculas de cada grupo; la desaparición de dicho principio implicará la pérdida de actividad del insecticida. A partir de una molécula activa la química puede introducir modificaciones que tiendan a mejorar las propiedades fisicoquímicas condicionadas a su penetración y acción. También se tenderá a aumentar la estabilidad de la molécula para no tener que repetir las aplicaciones; en esto consistiría la adición de Cl (cloro) o Br (bromo). La persistencia de la molécula y la

presencia de cloro están ligadas en el caso de los organoclorados.

Por cada pesticida se distinguen varios nombres. Nombre trivial, que comprende el químico; el químico abreviado, nombre común y nombre oficial. También poseen el nombre registrado y el número del código.

El término organoclorado aplicado a insecticidas tiene una significación más estricta que su sentido químico, ya que se encuentra referido a todas las moléculas orgánicas que contiene cloro. Engloba moléculas cíclicas policloradas que no poseen ningún otro grupo funcional.

- PROPIEDADES.

Para apreciar el comportamiento en el medio de los pesticidas organoclorados, junto con los peligros asociados que ellos poseen hacia organismos que no son objeto de su acción, es necesario entender sus propiedades.

Según González y col. (1983), las propiedades físico-químicas de los compuestos orgánicos clorados, su persistencia en el medio y su cinética de dispersión (Ramade, 1976), facilitan la acumulación de estos xenobióticos en los distintos organismos de los ecosistemas (Greichus y col., 1977, 1978; López y col., 1980).

Su comportamiento resulta de la combinación de algunas de las propiedades siguientes :

La persistencia, una de las características distintivas de estos productos que era más deseada cuando surgieron los primeros representantes del grupo, es definida por Greenhalgh y col., 1980, como "el tiempo de residencia de un agente químico específico en un compartimento determinado del ambiente" y significa que la acción del pesticida se mantiene por largo tiempo debido a su baja capacidad de degradación; con el correr del tiempo esta característica significaría un cúmulo de problemas que cuestionarían su empleo.

Una vez que el pesticida llega al medio bien por utilización o bien por accidente, su distribución y persistencia es una función compleja que depende de numerosos factores físicos, químicos y biológicos. Estos factores son, por un lado, propios de la naturaleza de la sustancia considerada, tales como su solubilidad, constante de disociación, tamaño molecular, polaridad, volatilidad o distribución de carga y por otro, externos a ella como absorción, movimiento del aire y del agua, temperatura, pH o luz.

La persistencia en el suelo es mayor que en el agua y por lo tanto tiene una gran incidencia sobre la fauna edáfica. Pueden considerarse tres reservas grandes de estas sustancias: la atmósfera, el suelo y el sedimento acuático.

La persistencia de los organoclorados y su amplia difusión son las causas de un envenenamiento a largo plazo. Los más estables están prohibidos en muchos países, pero son utilizados ampliamente en los más subdesarrollados. El viento y las lluvias conti-

nuaran diseminandolos. Se calcula que al cabo de 14 años permanece un 40% de aldrín, un 40% de heptacloro, un 40% de toxafeno y un 10% de lindano. Pasados 15 años queda el 31% de dieldrín y al cabo de 17 años el 39% de DDT. Se estima que el DDT podría persistir 37 años en ciertos suelos forestales (Edwards, 1975).

Esta característica de los organoclorados varía con el compuesto y las condiciones. El DDT es lentamente convertido a DDD, después a otros metabolitos, y en diversas condiciones y organismos, al menos tóxico DDA (O'Brien, 1967).

Los pesticidas organoclorados son compuestos orgánicos apolares, que tienen una solubilidad extremadamente baja en agua, pero alta en lípidos o tejidos grasos. El agua se satura con DDT con solamente 1,2 ppb. El mirex es todavía menos soluble; el aldrín y dieldrín tienen una solubilidad algo más alta, de 27 y 186 ppb, respectivamente (Park y Bruce, 1968; Wurster, 1969a).

Las propiedades de solubilidad explican porqué estos pesticidas no se "pierden" por dilución en los componentes inorgánicos del medio (agua, aire y suelo). En cambio, los residuos de organoclorados, especialmente el DDT, han llegado a ser casi universales en tejidos animales en la mayoría de los lugares del mundo.

Aves, peces y mamíferos, incluyendo al hombre, y como eslabones más altos de las cadenas tróficas están de forma invariable, contaminados. La penetración en el organismo animal o vegetal está condicionada por la afinidad a las grasas por una parte y

al agua por la otra. Primero tiene que atravesar una barrera lipídica, cutícula cerosa de vegetales, tegumento de insectos y piel de animales superiores y para eso es preciso poseer una cierta solubilidad en los lípidos y después pasar a la fase acuosa para seguir su acción. Esta fase acuosa constituye el medio vivo a nivel de la célula y permite el transporte intercelular (savia, sangre, linfa) por lo que es necesaria una cierta hidrosolubilidad. El coeficiente de reparto entre las grasas y el agua de la molécula química es lo que condiciona su transporte desde el medio externo hasta el lugar de acción.

La bioacumulación de insecticidas es materia de interés. Las moléculas ejercen una toxicidad durante un periodo considerable de tiempo a niveles crecientes en los organismos, en comparación con sus medios circundantes (bioconcentración directa), o en comparación a niveles tróficos inferiores (biomagnificación).

En los organismos está relacionada con la cantidad, el tiempo de exposición, el estado nutricional, la edad, el sexo, y los órganos envueltos en su metabolismo: circulación, depósito y excreción (Farias y col., 1980).

Los pesticidas organoclorados se acumulan a través de las cadenas alimentarias por fenómenos de bioacumulación o bien simplemente por su inadecuada utilización (uso excesivo, incumplimiento de plazos de seguridad, contaminaciones accidentales, etc...). Cada organismo se alimenta de organismos del nivel trófico más bajo, los organismos-alimento son metabolizados y excretados, pero los

organoclorados son retenidos, así se alcanza una concentración más alta en el organismo predador que la que se encontraba presente en el organismo-alimento. Concentraciones de estos compuestos aumentan con cada escalón de la cadena trófica, alcanzando los valores más altos en carnívoros, siendo peligrosos para estos organismos porque tienen un amplio espectro de actividad biológica. Por lo tanto, estos compuestos, son materiales incontrolables después de haberse liberado al medio. Esto les lleva a alcanzar niveles que son miles o millones de veces más altos en organismos que se encuentran circundantes en el medio (Woodwell y col., 1967; Korschgen, 1970).

Un ejemplo de la bioacumulación de estos organoclorados es el siguiente: En un trabajo de Shaw, 1983, en cinco lugares de Alberta (Canada), se determinó la concentración de residuos de pesticidas organoclorados en huevos y pollos de golondrina bicolor, *Tachycineta bicolor*. Pesticidas organoclorados (como DDT y dieldrín) no son utilizados en los campos de Canada desde 1978, lo que sugería que aves migradoras como ésta se alimentarían, en áreas agrícolas de Canada, de insectos no contaminados a sus pollos. Por otra parte, algunos de estos pesticidas se degradan muy poco a poco bajo condiciones anaeróbicas en los sedimentos húmedos de los campos. Gran parte de este sedimento es suelo erosionado desde zonas agrícolas adyacentes durante el pasado. Por lo tanto, muchos de los insectos dípteros consumidos por las golondrinas podían estar contaminados con residuos de organoclorados, ya que su desarrollo larval ocurre en las aguas y sedimentos de las charcas.

Se encontró que la acumulación de DDE y heptacloroepóxido en los pollos era significativamente superior a la de los huevos, lo que sugería que las golondrinas adultas acumularon cierta cantidad de pesticidas, ya que aves migradoras como estas, anidan en áreas agrícolas y se alimentan de insectos en zonas de Centro y Sudamérica.

A su vez, rapaces como el halcón peregrino, *Falco peregrinus*, que contienen en su cuerpo cantidades considerables de pesticidas organoclorados provenientes de presas como la golondrina bicolor, han colocado a esta rapaz en peligro de extinción debido a la inviabilidad en el desarrollo de crías y a la esterilización de los adultos (Peakall, 1976).

Por lo tanto, los análisis de suelo, agua, o aire, que muestran solo mínimas cantidades de organoclorados, pueden ser indicadores engañosos de la calidad del medio, porque ignoran la importancia de estos mecanismos de concentración biológica altamente eficientes. El análisis de organismos predadores que se encuentran en los niveles más altos de la cadena alimentaria son una medida más aclaratoria de la contaminación del medio con organoclorados.

Hay investigaciones que han descrito concentraciones de contaminantes en visón salvaje, *Mustela vison*, en diferentes localidades de EE.UU. (Franson y col., 1974; Hill y Dent, 1985) y Canadá (Frank y col., 1979). Es menos conocida en nutrias, *Lutra canadensis*, la acumulación de productos organoclorados y los efectos a exposiciones agudas y crónicas. Sin embargo, Foley y col.,

1988, encontraron mayores concentraciones de insecticidas organoclorados en nutria que en visón cuando estos animales se recogieron en las mismas áreas (Henny y col., 1981). Tanto el visón como la nutria poseen una alta capacidad para acumular contaminantes en sus hábitats porque son carnívoros y consumen cantidades significativas de peces que habitan zonas con niveles elevados de organoclorados persistentes (Foley y col., 1988).

Estos compuestos también tienden a acumularse en la grasa de ballena, *Globicephala melaena*. Se han demostrado correlaciones de estos con la edad en machos de ballena (Reinjders, 1980), no pudiéndose demostrar esto en las hembras, ya que pasan parte del año con la carga de la futura descendencia en su cuerpo (Law y col., 1989). Los niveles de estos pesticidas, junto con los de plomo, mercurio y cadmio fueron entre 20 y 30 veces más altos en ballenas que en delfines, *Lagenorhynchus albirostris*. Para Muir, 1988, esta diferencia se debió principalmente a la mayor longevidad de las ballenas.

Adamovic y col., 1978, informaron que la leche humana contiene una concentración cerca de 20 veces más alta que la de la leche de vaca. De acuerdo con Luquet y col., 1974, la proporción de niveles de residuos en leche humana con respecto a la de vaca fue 5-10:1 para compuestos de HCH, 4-5:1 para heptacloro y heptacloro epóxido, 5-6:1 para aldrín y dieldrín, 100:1 para DDT, y 150:1 para p,p'-DDE. Esta diferencia, según Blüthgen y col., 1977 y 1979, en un trabajo de Mussalo-Rauhamaa y col., 1988, puede ser porque una madre excreta en su leche, durante un corto

periodo, el contenido de organoclorados acumulados durante un periodo de 20 a 30 años. A este respecto una vaca tiene acumuladas tales sustancias de 3 a 12 años, pero las excreta casi constantemente a lo largo de su vida.

1.4. EFECTOS SOBRE EL MEDIO.

En la naturaleza la disipación del pesticida es, a menudo, muy rápida pero si éste es resistente a alguno o a todos los factores capaces de atenuar su potencia y su efecto, puede seguir activo mucho tiempo. Desgraciadamente, los organoclorados no solo permanecen en el lugar donde son aplicados, sino que son dispersados a grandes distancias, llegando a alcanzar la atmósfera, el suelo y las aguas, con lo que la aplicación local daría lugar a una contaminación de tipo mucho más global y generalizada.

El agua y el suelo pueden incrementar su contenido, así como los organismos que viven en estos medios a partir de los residuos que residen eventualmente en la atmósfera. Su origen se debe principalmente a su aplicación; y su permanencia viene determinada por el tamaño de las partículas y las condiciones meteorológicas. Todo ello explica la variabilidad cuantitativa a que dan origen los análisis en agua, suelo, vegetales y animales, funcionando la atmósfera como una reserva potencial de dichos contaminantes que variará su concentración según la entrada o salida en ella de insecticidas con los fenómenos meteorológicos (precipitaciones en forma de lluvia o nieve).

De hecho es bien sabido que incluso en zonas alejadas de la tierra donde no ha sido aplicada voluntaria y directamente un pesticida como el DDT, éste llega a encontrarse a niveles claramente apreciables en animales. Es bueno recordar al DDT en su relación con nuestro ambiente y que se ha tardado un mínimo de 25 años para poder concretar los peligros de su uso indiscriminado. Prácticamente no se conoce en la tierra lugar donde no haya llegado su presencia contaminante, pudiendo decirse que los organoclorados en general constituyen parte integrante de todo sistema biológico y están presentes en, prácticamente, todo material humano vivo.

Aunque la solubilidad en agua sea excepcionalmente baja, esto no impide que estos compuestos sean transportados en solución en aguas corrientes, pero la capacidad de transporte se aumenta por la tendencia de los organoclorados a formar suspensiones en el agua y a adsorberse a partículas, las cuales van hasta aguas abajo y al interior de las cuencas (Bowman y col., 1964; Edwards, 1966).

La mayor parte de la contaminación de las aguas superficiales ocurre a partir de la escorrentía de los campos agrícolas y de las precipitaciones atmosféricas (Bedding y col., 1982).

En el bioma vegetal, se han encontrado efectos nocivos en el rizobium de leguminosas, y la incorporación de organoclorados desde el suelo a la planta por absorción radicular (Ruiz y col., 1986).

Según Franke, 1971, en un trabajo de López e Infante, 1981, la penetración de los residuos de pesticidas en las plantas acuáticas se realiza a través de los ectodesmos que son los espacios microscópicos interfibrilares de las paredes celulósicas de la epidermis de las hojas, situados entre la superficie de la cutícula y la membrana plasmática. Brochinskij y col., 1970, en el mismo trabajo, señalaron que las concentraciones de organoclorados pueden variar de unas especies a otras, dependiendo de las posibilidades de absorción de cada especie. Las plantas semiacuáticas absorberán por las raíces y por la parte del tallo que se halle sumergida, en tanto que las plantas sumergidas lo harán también por las hojas.

Se ha comprobado que pequeñas cantidades de DDT (ppb), dieldrín o endrín en el agua, hacen decrecer la fotosíntesis, medida por el ^{14}C , en ciertas especies de fitoplancton marino (Menzel y col., 1970).

El efecto de los organoclorados sobre las algas parece ser altamente selectivo, afectando a ciertas especies susceptibles, ocurriendo muchas veces un envenenamiento selectivo de algunas especies de algas en áreas cercanas a lugares de aplicación, disminuyendo la diversidad biológica. Una alteración en la composición de especies de comunidades de fitoplancton tendría profundas consecuencias ecológicas, alterando la estructura y el funcionamiento del ecosistema.

La aplicación de estos compuestos en los agrosistemas ha conducido a una dispersión global y se empieza a evidenciar su aparición en la atmósfera, hidrosfera y biosfera de la Antártida. En mar abierto, la contaminación por organoclorados tiene también su relevancia. Las aguas del mar sirven como un gran reservorio y fosa final de estos. La velocidad de sedimentación de estos productos químicos desde la superficie hasta los fondos más profundos en las aguas de los océanos es relativamente más baja en aguas tropicales que en altas latitudes. Esto implica la posible prolongación de la contaminación de los organoclorados persistentes en el medio marino tropical, incluso si su utilización se detuviera en el futuro.

Los procesos de bioacumulación en organismos marinos dependen principalmente de las propiedades físico-químicas y bioquímicas de los contaminantes, la capacidad metabólica y la vida de los organismos (Tatsukawa, 1977).

En un estudio de Martínez-Conde y col., 1990, sugieren que el *Chondrostoma toxostoma* puede ser un bioindicador en sistemas acuáticos. Este organismo acumuló grandes cantidades de alfa-HCH, gamma-HCH (lindano) y HCB en branquias, hígado y gónadas en el sistema por ellos estudiado.

Algunos autores han propuesto que el consumo de alimentos marinos es una gran fuente de organoclorados en poblaciones humanas (Westöo y Noren, 1978). La cantidad total de productos marinos

consumidos en Hong Kong es alta comparada a los países de Europa. Phillips, en 1985, en un trabajo (Ip y Phillips, 1989), encontró que mejillones empleados como bioindicadores en aguas de Hong Kong estaban significativamente contaminados por organoclorados.

Además, existe una creciente evidencia de que los residuos de metales tóxicos y compuestos organoclorados están alcanzando altas concentraciones en mamíferos marinos y peces del Artico canadiense. El significado final de estos contaminantes en este medio, sin embargo, es el impacto sobre las poblaciones nativas indígenas que utilizan alimentos naturales en una porción sustancial de su dieta. La mayoría de los organoclorados, normalmente comprenden más del 75% del total de los medidos, son HCH, específicamente, el lindano y el isómero alfa-HCH. Le siguen en abundancia el alfa-endosulfan y dieldrín (Gregor y Gummer, 1989).

La presencia generalizada de residuos de pesticidas clorados en el ambiente asociado al conocimiento existente de sus efectos colaterales indeseables sobre todos los seres vivos, hace reflexionar también sobre la incidencia en las comunidades silvestres, poniendo en peligro su supervivencia y en el mejor de los casos disminuyendo el potencial biótico (Primo y Carrasco, 1977).

1.5. TOXICIDAD EN EL ORGANISMO ANIMAL.

El mecanismo tóxico de los organoclorados ha sido estudiado extensamente desde que se demostró en los años 40 (Roeder y Weiant,

1946) que el DDT provoca una característica descarga nerviosa repetitiva. Sin embargo, con la posible excepción del DDT, los mecanismos bioquímicos y celulares de toxicidad aguda no están totalmente entendidos en el resto de organoclorados. En dosis suficientes, la mayoría interfiere con transmisiones axónicas de impulsos nerviosos y por lo tanto interrumpen las funciones del sistema nervioso. Dieldrín, aldrín y lindano aparentemente aumentan la liberación de neurotransmisores en las sinapsis colinérgicas, y pueden aumentar las concentraciones de amonio en el cerebro por disminución de la síntesis de glutamina (Raisbeck y col., 1989). Magour y col., 1984, han formulado la hipótesis de la inhibición de la Mg^{2+} -ATPasa del sistema nervioso central, enzima asociada a las fosforilaciones oxidativas, y al mantenimiento de una concentración intracelular baja en Ca^{2+} y la $(Na^{+} + K^{+})$ -ATPasa, enzima asociado al transporte de cationes a través de las membranas (Akeru y col., 1971; Koch y col., 1972).

Para Hrdina y col., 1974, las modificaciones en el metabolismo de la 5-hidroxitriptamina y de la norepinefrina son responsables de la hipertermia mientras que los temblores y las convulsiones serían debidos a una modificación en la concentración de acetilcolina. En definitiva, son neurotóxicos y su efecto puede llegar a ser letal (O'Brien, 1967).

El metabolismo de xenobióticos puede estar dividido conceptualmente en dos grupos de reacciones que trabajan individualmente con el fin de incrementar la solubilidad en agua de compuestos endógenos y exógenos. La fase I o reacciones de bioactivación

(por ejemplo, oxidación, reducción o hidrólisis), generalmente convierten los xenobióticos a derivados que son más solubles en agua que la molécula inicial, pero la función principal de estas reacciones es añadir grupos funcionales. Las reacciones de la fase II son biosintéticas, donde el xenobiótico o un metabolito derivado de la fase I se une covalentemente a una molécula endógena, produciendo un compuesto conjugado. La molécula endógena (por ejemplo, ácido glucurónico) confiere al xenobiótico lipófilo o a su metabolito un aumento en la solubilidad en agua. Una propiedad común de los organoclorados persistentes es la resistencia a metabolizarse, o metabolizar a otro, igualmente, persistente. Aunque el heptacloro es metabolizado a heptacloro epóxido, por ejemplo, el HE es lipófilo y así persiste en el cuerpo durante periodos prolongados de tiempo (Raisbeck y col., 1989).

La toxicidad de los organoclorados no está limitada a las especies de insectos objetos de su acción, ya que afectan también a gran variedad de animales, incluyendo toda clase de vertebrados; además, pueden operar por diferentes mecanismos. La mayoría son inductores de sistemas enzimáticos hepáticos e inhibidores de otros enzimas. Por ejemplo, conducen a un aumento sustancial en la síntesis de enzimas hepáticos que hidroxilan hormonas esteroideas y otros sustratos (Conney, 1967; Kupfer, 1967; Peakall, 1970b). El efecto ha sido notado en animales de experimentación con niveles en la dieta de unas pocas ppm de pesticida.

La tasa de absorción de pesticidas por los invertebrados acuáticos está correlacionada con la actividad metabólica, superficie y peso del organismo y con el nivel trófico que ocupa (Kerr y Voss, 1973). En un trabajo, Lopez e Infante, 1981, hacen referencia a una serie de autores que han trabajado con invertebrados acuáticos : Peterle, 1967, quien detectó residuos de organoclorados en caracoles de agua dulce, trabajó con gasterópodos de la familia *Planorbidae*; Fredeen y Duffy, 1970, con *Competoma*; Reinbold y col., 1951 y Wallace y Brady, 1971, con caracoles del género *Physa*. Cocks, 1973, describió alteraciones en el balance hídrico de los gasterópodos. Canton y Sloof, 1977 pusieron de manifiesto la reducción de la fecundidad de *Lymnaea stagnalis L.*, por acción del isómero alfa del HCH con una dosis de 0,02 ppm.

Según López e Infante, 1982, la presencia de estos compuestos en el exoesqueleto del cangrejo de río (*Austropotamobius pallipes* Lereb.) planteaba el problema de su procedencia : endógena y/o exógena. La exógena se explicaría por adsorción cuticular o a través de la epiflora, mientras que para la endógena habría que pensar en transporte activo o difusión, que permitirían el almacenamiento de estos productos en el exoesqueleto, que con la muda quedarían definitivamente fuera del organismo. De ahí que la ecdisis se revele como un eficaz mecanismo de eliminación de pesticidas en los cangrejos. En un estudio con ciclodienos, el diel-drín superó significativamente al aldrín en cada una de las fracciones orgánicas objeto de estudio. Esta circunstancia se explica, aparte del mayor uso que de aquel insecticida pudiera haberse

hecho, por la epoxidación de aldrín a dieldrín, que llevan a cabo los microsomas de los cangrejos (Krebs y col., 1974). En otro trabajo, reflejado en el de López e Infante, 1982, la exposición aguda a los organoclorados provoca, en los cangrejos, movimientos natatorios desordenados, pérdida de equilibrio, hiperirritabilidad, convulsiones y parálisis que pueden conducirles a la muerte en 24-96 horas (Mahood y col., 1970). En cualquier caso, estas manifestaciones van a impedir una adecuada respuesta de los cangrejos ante el ataque de sus predadores (Krebs y Valiela, 1978).

Los pesticidas organoclorados son conocidos por ser altamente tóxicos para los peces, además de provocar cambios conductuales que llevan a dificultades en la reproducción, aumento de mortalidad entre los alevines y en algunos casos toxicidad aguda en los adultos.

Macek, 1968, demostró, con experimentos controlados, que concentraciones de DDT en la dieta que son subletales para peces adultos, pueden ser letales para las crías después de que estas salen de puestas contaminadas.

Análisis realizados en hígado de bacalao del Mar Báltico, entre 1969 y 1981, reflejaron una alta contaminación por PCBs, DDT, HCB o HCH, dejando a los peces en malas condiciones para el consumo humano. Los niveles de pesticidas organoclorados encontrados, por media, eran comparables con aquellos encontrados en bacalao de la misma longitud capturados en el sur del Báltico durante 1981 (Folandysz, 1986).

El problema es más grave en las aves ya que constituyen el eslabón final de numerosas cadenas alimentarias: se ha podido constatar que paralelamente al incremento de DDT en adultos, se produce una fragilización de las cáscaras de los huevos, debida a irregularidades en la calcificación que provienen de un desequilibrio en las hormonas sexuales. Después de esta observación, algunas experiencias han confirmado el papel de los organoclorados, especialmente el DDT, en la aparición de trastornos fisiológicos en el aparato genital y signos de degeneración en las células reproductoras (Lutz, 1974; David, 1976, 1977a y b; Lutz-Ostertag-David, 1974 y 1977).

Para Becker y Sperveslage, 1989, los pollos reciben contaminantes principalmente de dos fuentes: desde el huevo, el cual refleja directamente la contaminación de la hembra procreadora; así como desde el alimento. Además, las concentraciones de contaminantes en pollos varían con el crecimiento y depende de la distribución en el cuerpo y están relacionadas con un descenso en el contenido de lípidos.

González e Hiraldo, 1988, comprobaron los efectos en huevos, observando, primero la existencia de huevos infértiles y, segundo, una reducción del grosor tanto en los huevos infértiles como en huevos viejos.

El impacto de estos contaminantes sobre la productividad de las poblaciones de aves e individuos a menudo se determina evaluando la relación entre el grosor de la cáscara del huevo y los niveles

de contaminantes en huevos (Blus y col., 1974; Ohlendorf y col., 1979; Laporte, 1982). Se ha considerado que un descenso en el grosor de la cáscara de cerca del 20% indica sucesos de baja reproductividad para una población o individuo (Anderson y Hickey, 1972). Así, cuando se observa la presencia de organoclorados y la existencia de adelgazamiento en la cáscara de una muestra de huevos, no hay lugar a dudas del efecto adverso de los organoclorados sobre la reproducción de las aves (Bunck y col., 1985).

En las aves el DDT estimula una enzima que destruye el estrógeno que va a determinar la acumulación de calcio, por lo que las aves intoxicadas ponen huevos inviables llegando así a desaparecer algunas especies. La disminución en el grosor de la cáscara puede ser causada por inhibición de la anhidrasa carbónica, una enzima que es esencial para la formación del carbonato cálcico de la cáscara (Peakall, 1970a). Jefferies y French, 1971, han sugerido que esa disminución resulta de una condición hipotiroidal causada en las aves por el DDT. Síntomas adicionales incluyen ovulación y nidada tardía, comportamiento anormal en la incubación y en la puesta de huevos (Peakall, 1970a).

El papel de los organoclorados, aparte del DDT, en la reproducción de aves está menos claro, porque están mucho menos repartidos en el medio y porque han sido menos estudiados. El dieldrín también causa descenso en el grosor de la cáscara (Lehner y Egbert, 1969); inhibe la anhidrasa carbónica, es un poderoso inductor enzimático hepático (Peakall, 1970b), y, evidentemente,

fue el principal factor en el bajo éxito de reproducción del Aguila dorada en Escocia (Ratcliffe, 1970).

Haciendo referencia a la toxicidad aguda en mamíferos, las manifestaciones clínicas de envenenamiento agudo se totalizan como neuromusculares (Jager, 1970; Allen y col., 1984). El comienzo de los signos puede ocurrir desde unos pocos minutos a uno o dos días después de la exposición a una dosis tóxica aguda. El ganado expuesto a una dosis aguda exhibe un periodo de aprensión e hipersensibilidad, durante el cual los animales incrementan su agitación, descoordinación y beligerancia. Esto está seguido por contracciones musculares de la cabeza y del cuello que progresivamente envuelven al resto del cuerpo. Se pueden producir posturas anormales, modo de andar espástico y continuos movimientos masticadores. Los animales finalmente exhiben convulsiones tónico-clónicas que progresan hasta el coma y la muerte, o que alternan con periodos intermitentes de fuerte depresión. Los animales que quedan comatosos durante periodos prolongados (esto es, más de unas pocas horas) probablemente mueren. La existencia de signos clínicos puede producirse de manera lenta y progresiva o explosiva en la naturaleza. Otros signos pueden incluir desorientación, debilidad, parestesia, vómitos después de la ingestión, y depresión respiratoria (Raisbeck y col., 1989).

Los organoclorados se acumulan en el tejido graso desde el que son eliminados gradualmente cuando la exposición ha cesado. El tejido adiposo humano contiene débiles cantidades ya que el hombre consume cantidades variables en forma de residuos alimenta-

rios. También están presentes en la orina y en la leche y por ésta última vía pueden ser transmitidos a los recién nacidos. Además, también atraviesan la barrera placentaria (Radomski y col., 1971). La lipólisis asociada al estado de ayuno lleva a su movilización brusca del tejido adiposo. Se puede obtener una reducción significativa en su concentración tisular mediante la administración prolongada de sustancias como la difenilhidantoína y el fenobarbital (Davies y col., 1983).

Parece que la concentración de organoclorados en la sangre está en equilibrio con la cantidad almacenada en los tejidos y la determinación de su concentración plasmática permite apreciar su carga corporal (Radomski y col., 1971).

Un estudio estadístico de González y col., 1983, sobre los niveles de contaminación sanguínea por insecticidas, entre madres y sus respectivos hijos, no reveló ninguna diferencia significativa. Esta circunstancia la explicaron por el hecho de que la placenta es un órgano de baja capacidad metabólica para las sustancias xenobióticas y, en consecuencia, no altera la liposolubilidad de estos hidrocarburos clorados, aunque los transfiere al feto por difusión pasiva, según Ginsberg, 1971, y Nebert y Springfield, 1974, en este mismo trabajo.

Pesticidas del grupo del DDT se han asociado con abortos y nacimientos prematuros (Saxena y col., 1980, 1981). Las concentraciones más altas se hallaron en mujeres embarazadas así como aquellas que presentaron un tiempo de embarazo más corto. La

proporción entre la concentración en la sangre de las madres y la concentración en la placenta y feto es más alta para el DDT y para el pp'-DDE en casos de aborto (Leoni y col., 1989).

La leche es especialmente importante en el esquema de estos residuos, como un alimento potencialmente contaminado y como la mejor ruta de eliminación de estos xenobióticos. Son transportados pasivamente desde la sangre a la célula lipídica de la glándula mamaria, que consecuentemente es secretada como grasa láctea. La transferencia de la carga de organoclorados a la grasa de la leche está asegurada por la gran perfusión de la glándula mamaria y el gradiente favorable creado por la síntesis constante y secreción de leche (Mathews, 1984).

Las concentraciones en leche humana son un fiel indicador de las cantidades de estos compuestos almacenadas en las grasas del cuerpo en individuos lactantes. En 1976 un estudio sobre leche humana, con pacientes de una maternidad de Hong Kong (Ip, 1983), mostró que estos tenían una gran cantidad de DDT y sus metabolitos e isómeros del HCH. Las concentraciones encontradas fueron consideradas por ser de un significado potencial toxicológico, aunque Ip, 1983, enfatizó las ventajas de alimentar a los niños con leche materna, y consideró que estas tenían un mayor peso que cualquier efecto adverso posible de la ingestión de contaminantes mediante leche humana. Los niveles de DDT y DDE en muestras de leche de Hong Kong fueron generalmente mayores que aquellos recogidos en las naciones del oeste, antes o desde las restricciones sobre el uso del DDT en tales áreas.

En trabajadores expuestos al lindano y al DDT, Carlson y Kolmodin-Hedman, 1972, en González y col., 1983, encontraron un acusado aumento de las lipoproteínas plasmáticas, uno de los factores de riesgo de las sociedades desarrolladas.

Trabajadores agrícolas, que constituyen cerca de las tres cuartas partes de los trabajadores en los países más pobres del mundo, utilizan pesticidas para proteger los cultivos. Este uso representa importantes peligros para la salud humana. Se ha estimado que cerca de un millón de casos de envenenamiento inintencionado agudo por pesticidas ocurren cada año en el mundo (Jeyaratnam y col., 1987).

En los organismos superiores, la acción prolongada de estos productos produce varios efectos nocivos. Así, cabe citar que, como inductores enzimáticos del sistema oxidativo microsomal hepático, pueden acelerar el metabolismo de las hormonas esteroideas y, en consecuencia, provocar trastornos de la libido, menstruación, gestación y en el parto (D'Ercole y col., 1976; Nakayama y Aoki, 1977).

1.6. LUCHA INTEGRADA Y PESTICIDAS BIORRACIONALES.

Como consecuencia de los problemas derivados del uso de los pesticidas químicos de síntesis convencionales, muchas investigaciones han derivado hacia productos cada vez más selectivos, menos persistentes y de menor toxicidad en el hombre, con analogía a moléculas biológicas. Fruto de ello son el descubrimiento de nuevos compuestos insecticidas, que se conocen con el nombre de pesticidas "biorracionales".

Junto a estos pesticidas biorracionales se ha ido abriendo paso el concepto de "lucha integrada", entendiéndose como tal, la lucha contra los organismos perjudiciales, utilizando un conjunto de métodos que satisfagan simultáneamente las exigencias económicas, ecológicas y toxicológicas, reservando la prioridad de actuación a los elementos naturales de control y respetando los límites de tolerancia. Es decir, no se excluye la utilización de productos químicos, pero se tienen en cuenta todos los posibles sistemas de lucha, en especial la acción de los insectos útiles (Vives de Quadras, 1988).

En cuanto a los pesticidas biorracionales representan una nueva generación de productos químicos destinados al control de insectos, cuya estrategia de investigación se basa en un buen conocimiento de aquellos procesos fisiológicos o mecanismos de comunicación específicos de insectos, y en la obtención de agentes capaces de perturbarlos.

Hasta este momento se han comercializado análogos de la hormona juvenil, inhibidores de la formación de la cutícula y feromonas.

Los análogos de la hormona juvenil inducen unos efectos biológicos idénticos a las propias hormonas juveniles naturales, en particular inhiben la metamorfosis y son secundariamente letales. La ventaja de estos productos reside en su inocuidad frente a animales superiores y en la relativa especificidad que puede lograrse. Su limitación principal es sólo son efectivos en determinados momentos del desarrollo de los insectos.

Los inhibidores de la formación de la cutícula son compuestos que al ser ingeridos por determinados insectos impiden la formación del exoesqueleto, con lo que entre otras perturbaciones se impide la muda de las larvas, que terminan por morir. Se utilizan ampliamente por su eficacia, especificidad e inocuidad para los animales superiores. Como inconvenientes pueden citarse su limitado campo de aplicación, su lentitud de acción y su larga persistencia en algún tipo de formulaciones.

Las feromonas constituyen la base química de la comunicación de los insectos. Hasta el momento, las más utilizadas en el campo agrícola y forestal son las sexuales. Como medio directo de lucha, existen tres variantes básicas de utilización :

1) Captura masiva con trampas cebadas con feromonas; 2) Atracción hacia lugares concretos y tratamiento de los mismos con insecticidas, y 3) confusión, difundiendo en el medio una gran cantidad

de feromona, con lo que se dificulta el encuentro de machos y hembras.

Pero las posibilidades de perturbación de funciones específicas de insectos van mucho más allá de los tres tipos mencionados. Se están obteniendo resultados prometedores, destacándose los antagonistas de la hormona juvenil y otras hormonas endocrinas, compuestos defensivos de plantas contra insectos y antagonistas de feromonas.

La lucha contra los insectos plantea todavía numerosos y graves problemas y la estrategia biorracional para el diseño de plaguicidas parece un buen camino para intentar resolverlos, al menos parcialmente. En cualquier caso, parece claro que los insecticidas biorracionales constituirán una parte significativa en el contexto del control integrado de plagas y ello en un futuro que se entrevé cada vez más inmediato (Vives de Quadras, 1988).

1.7. LINDANO (γ -HCH).

1.7.1. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS.

Gamma-HCH es la denominación común del isómero gamma puro del 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano y lindano es la denominación común de los productos cuyo contenido de gamma-HCH no baja del 99,5%. La fórmula molecular es $C_6H_6Cl_6$ y el peso molecular es de 290,9. La formula estructural es la siguiente :



En las publicaciones, se hace referencia al lindano, gamma-hexaclorociclohexano (γ -HCH) y gamma-benceno hexacloruro (γ -BHC) en forma intercambiable, pero que a veces se presta a confusión (Demozay, 1976; Hanig y col., 1976).

En un sentido estrictamente histórico, el hexaclorociclohexano (HCH) es el más antiguo de los insecticidas organoclorados. Faraday, en 1825, describió como había comprimido "gas oil" para dar un producto condensado que contenía benceno, el cual reaccionaba con el cloro a la luz del sol. El producto consistió en un compuesto sólido y denso, que era soluble en alcohol, y estos experimentos fueron la primera preparación del HCH técnico. Meunier, a finales del siglo XIX, descubrió los isómeros alfa y beta, y Van der Linden, en 1912, confirmó la existencia de estos dos isómeros y anunció la presencia de otros dos, el gamma y el delta.

Pero no fue hasta 1943, cuando en los laboratorios de las Industrias Químicas Imperiales de Inglaterra se demostró que el isómero gamma era el responsable de la actividad insecticida del HCH técnico. El descubrimiento de la actividad insecticida del gamma-HCH (lindano, desde Van der Linden) tuvo su origen en la búsqueda de compuestos químicos de síntesis para reemplazar a los deseados pero muy caros insecticidas naturales piretro y rotenona (Brooks, 1974). Tal como se produce inicialmente por cloración fotoquímica del benceno, el hexaclorociclohexano (HCH) contiene del 14 al 77% del isómero gamma. El HCH puede existir teóricamente como ocho diferentes estereoisómeros, de los cuales cinco se encuentran en el producto bruto. En el comercio se ofrecen diversos grados técnicos. Por ejemplo, el HCH "fortificado" contiene una mezcla de por lo menos cinco isómeros, con un mínimo del 40% del isómero gamma y una distribución relativa de los isómeros característica : 40-50 % de gamma, 20-22 % de delta, 18-22 % de alfa, 4 % de beta, 1 % de epsilon y sustancias inertes, y 10 % de heptaclorociclohexano y octaclorociclohexano (Cocks, 1973). Hay países como Japón y la URSS en que el HCH técnico tiene un contenido del isómero gamma del 12-15% (Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, 1979) y la O.M.S. recomienda que el HCH técnico no contenga más del 16% del gamma-HCH (Brooks, 1974).

El insecticida BHC consiste principalmente en alfa-HCH con una mezcla de otros isómeros HCH; se utilizó ampliamente en Canada hasta que se restringió su uso en 1970. El lindano, que consiste en un mínimo de 99,5% de gamma-HCH, reemplazó al BHC en 1971,

y está registrado todavía en este país para ciertos usos. Por ejemplo, los niveles de beta-HCH descendieron en cormoranes, *Phalacrocorax carbo*, entre 1980 y 1984 lo que, probablemente, se debió al cambio del BHC por lindano (Elliot y col., 1988).

Los residuos de HCHs son conocidos por ser contaminantes traza ubicuos en la atmósfera y en los océanos (Bidleman y col., 1981). El isómero beta es el más persistente de los isómeros HCH y es eliminado de los organismos más despacio que el lindano. Tiene de 10 a 30 veces mayor capacidad para acumularse en tejidos grasos que el gamma-HCH. Además, los isómeros alfa y gamma pueden isomerizar hacia el beta en organismos vivos (Jensen, 1983). Así, la proporción entre los diferentes isómeros cambia desde el inicio de las cadenas alimentarias hasta la excreción en la leche humana, resultando ser el beta el isómero predominante en ésta (Skaare y col., 1988).

Algunos de los nombres comerciales del lindano son: aalindan, agrocide, ameisentod, aplidal, BBH, bentox 10, celanex, chlore-sene, DBH, devoran, entomoxan, forlin, gamacid, gammalin, hecloc-tox, hexachloran, gamma-hexachlorane, hexicide, HGI, Jacutin, kwell, lendine, lindafor, lindatox, lorexane, milbol 49, nexit, nicochloran, omnitox, pedraczak, quellada, sang-gamma, streunex, TAP 85, viton, 666.

El isómero gamma del HCH es un sólido cristalino blanco con un punto de fusión de 112,9°C. Es ligeramente soluble (10 mg/l) en agua y aceites de petróleo, moderadamente soluble (67 microg/l)

en alcohol y soluble en acetona y solventes aromáticos y clorados (Valin y col., 1968). Es estable al aire, al calor y al dióxido de carbono; no lo atacan los ácidos fuertes, pero en presencia de álcalis se transforma por deshidrocloración en triclorobenceno. Su presión de vapor es baja, $9,4 \times 10^{-4}$ mmHg a 20°C ; pero es lo bastante volátil para que se pueda utilizar en aparatos distribuidores calentados.

Es aplicado en forma de polvo, ungüento, o loción y comercializado como insecticida. La droga es un polvo blanco, prácticamente insoluble en agua (Boyd y Chen, 1968).

Hay polvos humectables de todas las concentraciones, suspensiones de hasta el 20% para emulsiones, soluciones en solventes orgánicos de hasta el 50%, polvos para aplicación en seco del 0,5-3%, gránulos del 3-4%, cebos y preparaciones para fumigación y aerosoles. Hay también cristales puros (al 100%). La Organización Mundial de la Salud, 1981, ha establecido especificaciones para polvos de aplicación en seco, polvos humectables, emulsiones y soluciones concentradas para emulsiones, soluciones y diversas mezclas de lindano.

Desde la mitad de los años 40, se han venido estudiando las incidencias sobre el mundo biológico del hexaclorociclohexano y en especial de su isómero gamma, el lindano. En 1942, se estudió la utilidad del HCH como insecticida y se comprobó la eficacia del isómero gamma contra diversos animales como moscas, piojos,

pulgas, garrapatas y ácaros que atacan al ganado (Woolley y col., 1985).

Metcalf, 1955, comprobó que para la mayoría de los insectos, el lindano es entre 100 y 1000 veces más tóxico que cualquier otro isómero. Es un insecticida de amplio espectro y en mamíferos exhibe una toxicidad oral entre 100-200 mg/kg para la DL₅₀, (Ang-subhakorn y col., 1989), y en concreto para la rata, la DL₅₀ es de 125 mg/kg de peso (el valor de la DL₅₀ es la estimación estadística de la cantidad de mg del tóxico por Kg de peso corporal requerida para matar el 50% de un grupo de animales de experimentación) (Portig y Schnorr, 1988).

Las preparaciones comerciales de lindano son utilizadas para controlar la sarna producida por un ácaro, *Sarcoptes scabiei*, así como la pediculosis originada por el piojo de la cabeza, *Pediculus capitis* L., el piojo del cuerpo, *Pediculus corporis* L., y las ladillas, *Phthirus pubis* L. (World Health Organization, 1982). A pesar de la conocida toxicidad sobre el Sistema Nervioso Central, la acumulación y persistencia en tejido cerebral y la potencial carcinogenicidad (Solomon, 1988), se ha creado una controversia sobre el uso de este compuesto lipófilo, especialmente en niños y ancianos.

Es un importante compuesto en agricultura e inicialmente se utilizó mucho en la administración a frutos, verduras y otros comestibles vegetales antes de la recolección. Su empleo en manzanas, cítricos y bayas ha cesado prácticamente en Europa y EE.UU., pero

continúa en otros lugares. Se utiliza para plantas forrajeras y cereales, aplicándolo a la planta o al suelo para el tratamiento de semillas, solo o en combinación con fungicidas. Cuando se aplica al suelo, se necesitan largos intervalos (por ejemplo, de uno a tres años) antes de cultivar en él productos comestibles. A veces se aplica en los invernaderos de frutas y hortalizas en forma de aerosoles, humos y vapores (Moody y Ritter, 1989).

Se utiliza para combatir los ectoparásitos del ganado y animales domésticos (Luquet y col., 1974) y se ha empleado en rociamientos de acción residual contra el mosquito vector del paludismo y el vector del mal de Chagas. Además, se usa en el hogar, en forma de aerosol combinado con piretrinas. También se utiliza en jardines. En los Estados Unidos, debido a su persistencia ambiental e interferencia con la salud humana, el uso como insecticida se restringió en 1977 (Dikshith, 1986). El empleo doméstico en forma de aerosol ha sido prohibido en países como Suecia y Finlandia y restringido en Canadá (Ramade, 1976). En Argentina está prohibido en cultivos, comercio y proceso industrial del tabaco; en Bulgaria, para uso en agricultura; en Canadá, prohibido desde 1970 salvo para ciertos tratamientos de suelos en un número limitado de cultivos; en Colombia está prohibido en los cultivos de café desde 1978; en Hungría desde 1968; en Japón, dejó de usarse como pesticida desde 1971; en la Unión Soviética está prohibido en la industria ovina, etc... (United Nations Secretariat, 1984). En España, la legislación vigente no especifica las concentraciones máximas permitidas para cada compuesto organoclorado en particular, estableciendo un máximo de 500 ng/l para la suma de pla-

guicidas en aguas potables (B.O.E., 1982), aunque se admite un contenido máximo de 2 ppm en productos vegetales para el lindano (B.O.E., 1989).

1.7.2. DISTRIBUCION Y ACCION SOBRE LOS ORGANISMOS.

La generalización de su uso puede tener repercusiones serias en los eslabones más altos de las cadenas tróficas, como consecuencia, principalmente, de cuatro parámetros que lo definen: persistencia, inespecificidad, poder de acumulación y toxicidad. La pervivencia del lindano en el ambiente se calcula entre tres y diez años.

Los factores físicos, y muy especialmente, los biológicos, son los que más contribuyen a su degradación, aunque estos últimos a un alto riesgo dependiendo del organismo de que se trate. Para valorar la persistencia en el medio tendría que tenerse en cuenta el tipo de suelos, la cantidad de producto aplicado, frecuencia, luminosidad, etc., así como los agentes modificadores que se añaden en las formulaciones.

Las fuentes directas de contaminación por lindano, responden a tres causas fundamentales : 1) a los procesos de fabricación, si los afluentes aéreos y acuosos no son sometidos a adecuados controles de calidad; 2) las pérdidas en el envasado y transporte y 3) la administración directa en los tratamientos agrícolas y sanitarios que siendo menos espectaculares, representan un alto factor de riesgo a largo plazo para todos los organismos vivos.

Los vientos y el agua de lluvia o de riego pueden permitir sus desplazamientos hacia corrientes superficiales, contaminando la fauna piscícola, o a las aguas subterráneas, contaminando el subsuelo. Por ejemplo, en un estudio realizado en el Reino Unido (Marks, 1989), se evidenció la contaminación de las aguas superficiales en la región de Yorkshire debido al tratamiento de ectoparásitos en ovejas y su consecuente esquilmamiento.

Los carnívoros, contienen la mayor concentración del contaminante en sus tejidos, especialmente en las grasas, y la química de estas moléculas es susceptible a este transporte biológico. Sin que por ello haya que minimizar que, después de su aplicación, el producto queda sujeto a la acción de mecanismos físicos y químicos, que actúan como efectivas vías de transporte, difundiendo el contaminante sobre áreas cada vez más extensas, dependiendo de las características de la zona.

Estudios en el cangrejo rojo americano de río, *Procambarus clarkii*, de las Marismas del Guadalquivir, López y col., 1980, hallaron concentraciones medias de lindano del orden de 0,89 ppm y concentraciones de alfa y beta-HCH de 2,49 ppm, siendo los HCHs los insecticidas hallados en mayor proporción. En experimentos realizados a 6° y 16°C, 43 lombrices, *Nereis virens*, fueron expuestas a una concentración de ¹⁴C-gamma-HCH de 1 microg/l durante una semana, el gamma-HCH y sus metabolitos se determinaron en lombrices individuales tanto en agua como en heces. Los factores de bioconcentración de lindano fueron más altos a la temperatura más baja, tanto cuando se hizo la medición solamente

del lindano, como cuando se hizo la de éste más sus metabolitos (Goerke y Ernst, 1980). De la misma forma, Warwick, 1985, llegó a la conclusión de que la toxicidad de lindano en cínifes, *Chironomus riparius*, disminuye cuando el pH del medio aumenta. Inman y Lockwood, 1977, demostraron que en la gamba, *Gammarus duebeni*, también disminuyó cuando la salinidad y dureza del medio aumentaba. En sistemas acuáticos de aguas dulces (río Ega), Martínez-Conde y col., 1991, han utilizado como bioconcentradores de contaminación por lindano al *Potamogeton crispus* y al *Chondrostoma toxostoma*.

Su acumulación es notable en muchos organismos marinos. Hay en la literatura una gran variedad de resultados con respecto a este fenómeno. Se han realizado estudios en peces, mejillones, corales, poliquetos, cangrejos, focas, delfines, ballenas, etc., encontrándose una alta absorción en algunos casos, y una fácil eliminación en otros (Schimmel y col., 1977; von Westernhagen y col., 1981; Tanabe y col., 1984; Solbakken, 1985 y Muir y col., 1988).

La incorporación del lindano al organismo animal se puede producir a través de todas las superficies del cuerpo. La velocidad del proceso va a depender tanto de la vía de administración o adquisición como de la forma física en que se aplique. En mamíferos penetra, predominantemente, a través de los tractos gastrointestinal y respiratorio. La absorción depende mucho del vehículo. Por ejemplo, en ratones, la absorción intestinal del lindano aplicado en aceite de cacahuete fue del 20% en 15-25 mn, del 40%

en 3h y del 85% en 27h. Una hora después de la inyección intraperitoneal de una solución aceitosa que contenía 40 mg de gamma-HCH por kg de peso, un 35% de la cantidad inyectada había sido absorbida, y al cabo de 24h, un 10% de ella se encontraba todavía en la cavidad abdominal (Koransky y col., 1963).

Todos los isómeros del HCH inducen enzimas hepáticas microsomales que metabolizan drogas y exhiben diferente distribución en los órganos después de la absorción y biotransformación hepática (Kolmodin-Hedman y col., 1971; Chadwick y col., 1971; Kurihara y Nakajima, 1974; Mikol y col., 1980; Campbell y col., 1983), y, con una administración repetida, estimulan su propio metabolismo (Chadwick y Freal, 1972).

Tras su absorción en ratas, el lindano se encuentra presente en la sangre. Se distribuye en diversos órganos, pero, como corresponde a su carácter lipófilo, se almacena sobre todo en el tejido graso. Se ha comprobado su presencia en el riñón y en los músculos, así como en la hipófisis y en el tiroides. También se acumula en el encéfalo (Kramer y col., 1980).

López-Aparicio y col., 1988, realizaron un estudio sobre la distribución y destino del lindano en ratas macho y los posibles cambios en la composición de fosfolípidos y ácidos grasos en varios tejidos. El experimento se llevó a cabo durante ocho días con una dieta semisintética que contenía 250 ppm de lindano. Observaron que la acumulación más alta se produjo en riñón, seguida por el tejido adiposo. Hígado, cerebro y pulmón contenían peque-

ñas cantidades del tóxico. En cuanto a los fosfolípidos, la administración de lindano aumentó el contenido de fosfolípidos en pulmón, hígado y riñón con respecto a los animales control. El aumento más alto se produjo en riñón. Según sus datos el lindano puede acumularse principalmente en el riñón, pero solo bajo ciertas condiciones dietéticas. En este estudio, una pequeña cantidad de lindano se halló en el hígado, posiblemente debido a la inducción de la actividad enzimática en este órgano conduciendo a una aceleración en el metabolismo del lindano "in vivo".

En rata, *Rattus norvegicus*, cuatro horas después de la administración oral de lindano (150 mg/kg de peso corporal) en aceite de oliva el contenido del pesticida en sangre llegó a 10 mg/l (Jain y col., 1965).

La administración repetida a ratas y ratones demostró que la sustancia se acumula en el organismo durante un periodo de tres a seis semanas. Al aumentar la dosis, la concentración de lindano aumenta concomitantemente en el tejido adiposo, mientras que el incremento es menor en hígado, encéfalo y plasma (Kolmodin-Hedman, 1974). Copeland y col., 1986, con una administración subcutánea a ratas de 2, 9, 16 y 23 días de edad, observaron una dependencia con la edad en el metabolismo del lindano.

Ratas a las que se suministraron 250 ppm en dieta semisintética durante 8 días presentaron la mayor acumulación de lindano en el riñón, de acuerdo con estudios previos (Zhu y col., 1986). López-Aparicio y col., 1988, como se ha citado anteriormente comproba-

ron que la acumulación de lindano y el aumento de cantidades de fosfolípidos alcanzan los valores más altos en riñón de ratas macho. Sin embargo, otros investigadores han demostrado que el lindano se acumula principalmente en el tejido adiposo (Yvelin y col., 1984; Kulkarni y Hodgson, 1984; Baker y col., 1985; Gopalaswamy y Aiyar, 1986). Para López-Aparicio y col., 1988, una posible solución a esta discrepancia está relacionada con factores nutricionales ya que los resultados obtenidos por Zhu y col., 1986, se obtuvieron utilizando dietas semisintéticas mientras que los otros investigadores utilizaron alimento comercial de laboratorio.

En conejos a los que se administró lindano en la dieta en una dosis de 100 mg/kg durante 10 días se encontraron, 3 días después de terminar la administración, menos de 0,1 mg de residuos por kg. A los que se suministró una dieta que contenía 10 mg de lindano por kg durante cuatro meses, se llegó a una concentración de lindano de 40-50 mg/kg en los tejidos grasos. No se pudo detectar lindano 2 meses después de terminar la exposición (Gladenko y col., 1967).

En un estudio realizado por Mosha y col., 1986, sobre distribución y eliminación de lindano en cabras a las que se les administró 6 mg/kg de peso durante cinco días consecutivos, observaron que los animales experimentales no presentaban incidencias, pero su concentración en leche (0,9 ppm/cabra/día) fue muy superior a la encontrada en sangre (0,1 ppm) durante el periodo de administración, descendiendo después en ambas. Esta rápida caída,

tanto en sangre como en leche, coincide con el hecho de que el lindano, según Ullmann, 1972, en general es rápidamente eliminado en mamíferos. Sin embargo, deben existir variaciones entre especies ya que experimentos similares en conejos (Moshá, 1984) demostraron que el lindano se eliminaba mucho más lentamente desde la sangre así como desde los tejidos que en cabras. Se han encontrado variaciones semejantes en ganado vacuno, en búfalos, en cabras y en pollos (Kaphalia y Seth, 1981).

El γ -HCH es absorbido rápidamente a través de la piel, mostrando variaciones regionales. Asumiendo que el mono (*Macaca mulatta*) muestra el modelo más indicado para la absorción percutánea humana, Moody y Ritter, 1989, indicaron que el lindano es absorbido rápidamente a través de la piel y el grado de absorción llegó a depender de la región anatómica tratada. Por ejemplo, la absorción del antebrazo dorsal del mono fue aproximadamente dos veces mayor que la referida al antebrazo ventral en humanos. La, relativamente, alta permeabilidad de la zona anterior de la cabeza es importante cuando se considera que el lindano es aplicado al cuero cabelludo para el control de los piojos y que el cuero cabelludo humano y la zona anterior de la cabeza del mono tienen permeabilidades similares, por lo menos para algunos pesticidas.

Exposiciones prolongadas en humanos al γ -HCH, particularmente durante la manufacturación así como durante el rociamiento, han producido dermatitis en trabajadores, y se ha visto la aparición de urticaria debido al contacto con el isómero gamma. En países

tropicales, los trabajadores a menudo utilizan de forma negligente la ropa de protección y a consecuencia de la alta temperatura y humedad la absorción de pesticidas por la piel llega a tener un alto potencial de toxicidad (Dikshith y col., 1989). En un estudio de Feldmann y Maibach, 1974, aproximadamente el 10% de una dosis de lindano aplicada con acetona como vehículo fue absorbida a través de la piel intacta. Sin embargo, se sabe que la penetración en la piel intacta puede variar del 10% al 90%, según el vehículo empleado y el lugar anatómico donde se emplee. El compuesto se absorbe aún más a través de piel lesionada (Ginsburg y col., 1977).

El lindano se acumula en los órganos y tejidos del ser humano en menor grado que otros plaguicidas organoclorados. En un estudio realizado en Francia entre 1971 y 1973, los residuos de HCHs alcanzaron la mayor importancia cuantitativa. Representaron alrededor del 90% del total de insecticidas detectados en la sangre de las mujeres gestantes y de los recién nacidos. Los tres isómeros del HCH (alfa, beta y gamma) se encontraron en el 100% de las muestras analizadas. El hecho de que los niveles encontrados de los isómeros alfa y gamma fueran relativamente altos sugería que la población se encontraba expuesta en ese momento a una agresión por estas sustancias, ya que, como ha demostrado Abott y col., 1968, estos isómeros son rápidamente eliminados de la sangre (el lindano, mediante la acción de las enzimas oxidativas microsomales y posterior conjugación con el glutatión reducido) (Kurihara y col., 1977); mientras que el isómero beta, que no es

tan biodegradable, se acumula con relativa rapidez en el tejido adiposo (Gonzalez y col., 1983).

En Argentina, Radomski y col., 1971, midieron la concentración de lindano (y de otros organoclorados) en la sangre de 13 madres y de sus hijos recién nacidos. La proporción de cerca de 1 entre los valores de lindano en sangre correspondientes al recién nacido y a la madre fue una de las más elevadas en comparación con los demás pesticidas estudiados, lo que indica que pasa fácilmente a través de la placenta.

Los efectos adversos del lindano en animales de experimentación son fundamentalmente de tipo neurológico y de comportamiento (Hulth y col., 1976; Joy, 1982), aunque también se han documentado alteraciones en las funciones hepáticas (tumores en ratones) y renales (Dikshith y col., 1978). Se ha demostrado, además, que interrumpe las funciones reproductoras en aves y mamíferos (Chakravarty y Lahiri, 1986). En rata, produce atrofia testicular y cambios degenerativos en los túbulos seminíferos (Dikshith y col., 1978; Nigam y col., 1979; Shivanandappa y Krishnakumari, 1983; Chowdhury y col., 1987).

Puede causar varias alteraciones en el control hormonal de la función ovárica. Los aumentos periódicos de estrógeno sérico (que conducen a una reducción de la entrada de alimento y ganancia de peso corporal) suceden menos a menudo en los animales tratados, mostrando ciclos irregulares (Chadwick y col., 1988b). Sin embargo, también puede ser que el lindano ejerza un efecto

antagonista sobre cualquier estrógeno de tipo endógeno que pueda estar presente en la sangre. El hecho de que haya varios cambios en el control hormonal de la función ovárica tras el tratamiento con lindano sugiere que la exposición a este insecticida afectaría a la fertilidad en la hembra de rata (Sircar y Lahiri, 1990).

En suma, el lindano tiene propiedades antiestrogénicas, interfiriendo con el efecto del estradiol circulante sobre los tejidos objeto de su acción (Cooper y col., 1989).

Ya que la mayoría de los carcinógenos químicos en el medio requieren activación metabólica (Miller y Miller, 1974), la diferencia de susceptibilidad entre varias razas de ratones en los que el lindano indujo hepatomas pudo ser debido a diferencias en la biotransformación del pesticida (Robinson y col., 1975; Thorgeirsson y Wirth, 1979).

Se han registrado casos de intoxicación y se han practicado algunos estudios sobre grupos de trabajadores industriales, pero apenas se ha procedido a una evaluación sistemática de la relación entre dosis y efecto en condiciones clínicas o en el medio laboral. Se carece, pues, de datos humanos válidos.

Sí se sabe que en la acción del lindano sobre el hombre es importante destacar el efecto del vehículo utilizado para la dosis letal media (DL₅₀) en la toxicidad percutánea; la DL₅₀ del lindano cristalizado es mucho mayor (2000-4000 mg/kg de peso corporal) que cuando se utiliza como vehículo aceite o crema (50-500 mg/kg

de peso corporal); con solventes como vehículos, los valores de la DL₅₀ son intermedios entre esos márgenes. Sobre la base de informes clínicos, se ha propuesto una dosis oral de 150 mg/kg como letal en el 50% de los sujetos; aunque otros autores, (Herbst y Bodenstein, 1974), consideran que una sola dosis oral de 20 mg/kg constituye un riesgo para el individuo.

Los síntomas y signos de intoxicación humana son: cefalalgia, dolor muscular, náuseas, vómitos, debilidad, hipertensión, convulsiones, insuficiencia renal aguda, acidemia, anemia, pancreatitis, insuficiencia respiratoria con cianosis y a veces muerte. La autopsia ha revelado infiltración grasa en el hígado, degeneración del músculo cardíaco y necrosis de los vasos de los pulmones, riñón y encéfalo (Munk y Nantel, 1977; Solomon y col., 1977).

En algún caso de envenenamiento se observó también pérdida de memoria, perturbaciones emocionales resultantes en irritabilidad, agresión o manías (Patel y Rao, 1958) y se han asociado a un perjuicio en el sistema límbico (Woolley y col., 1984). El hipocampo y las estructuras límbicas de la parte rostral del encéfalo están envueltas en la iniciación de ataques (convulsiones) y son especialmente sensibles a una moderada exposición (Woolley y col., 1985).

A lo largo de los años se han realizado estudios sobre la toxicidad y muerte asociadas a una exposición accidental o deliberada al lindano (Ullmann, 1972; Solomon y col., 1977; Davies y

col., 1983). Por ejemplo, en un trabajo reciente, se suministró una emulsión oral como un vermífugo a un número de pacientes, de los cuales uno exhibió convulsiones mientras otros sufrieron náuseas. En otro caso (Davies y col., 1983), se encontró a un niño muerto en su cuna después del tratamiento para la sarna con solución de lindano. El incidente más grave se debió a un envenenamiento epidémico ocurrido en la India. Las semillas rociadas con el insecticida se mezclaron con granos de alimento y a continuación fueron consumidos (Woolley y col., 1985). En este sentido, Starr y Clifford, 1972, han aportado datos sobre accidentes debidos a la ingestión de lindano, su biotransformación y excreción. Con dosis aguda, se han descrito ataques, leucocitosis, fallo renal, coma e incluso, la muerte (Jaeger y col., 1984).

1.7.3. METABOLISMO. TRANSAMINASAS.

La naturaleza lipófila del lindano facilita su acumulación en la membrana lipídica de paso a sus lugares de acción. Los fosfolípidos participan en procesos complejos, y una parte significativa de sus propiedades está determinada por su composición en ácidos grasos (Antunes-Madeira, 1981). Se ha comprobado (López-Aparicio y col., 1988) la correlación entre la acumulación de lindano y un aumento en los fosfolípidos en riñón de rata, así como un aumento en el contenido de fosfolípidos del hígado de ratones (Chadwick y col., 1987).

Por otra parte, se ha relacionado la proporción colesterol/fosfolípido con la fluidez de membrana y se ha comprobado que la tem-

peratura es un parámetro que controla claramente la incorporación del lindano a la membrana (Antunes-Madeira y col., 1981).

Fitzloff y col., 1982, demostraron múltiples vías de biotransformación en microsomas hepáticos de humanos y ratas. El gamma-HCH es metabolizado por el sistema del citocromo P-450 del retículo endoplasmático liso y puede inducir la síntesis de enzimas que esán relacionadas con el metabolismo de xenobióticos y sustancias endógenas (Junqueira y col., 1986).

La inducción microsomal por el insecticida llevaría de un modo concebible a alteraciones en la generación de $O_2^{\cdot -}$ por esta fracción celular. Es factible la producción de radicales libres relacionados con el lindano en el proceso de biotransformación reductiva por el sistema del citocromo P-450 del hígado (Fitzloff y col., 1982; Baker y col., 1985). De hecho, se ha sugerido la formación de un radical pentaclorociclohexano por la deshalogenación reductiva microsomal (Junqueira y col., 1986).

El metabolismo cuantitativo parece estar relacionado con la estructura química, y el gamma es más rápidamente metabolizado que el alfa y beta-HCH (Joy, 1976). La mayoría de los metabolitos son excretados en formas solubles en agua (Engst y col., 1977; Copeland y col., 1986).

En estudios "in vivo" del metabolismo del lindano en mamíferos, Karapally y col., 1973, encontraron la existencia de varios clorofenoles en la orina de conejo, así como metabolitos del gamma-HCH. El 2-3-5, 2-4-5 y 2-4-6 triclorofenol fueron los principales metabolitos. La característica más acusada fue la formación de compuestos conjugados (Kurihara y Nakajima, 1974). Chadwick y Freal, 1972, demostraron que la excreción de lindano y sus metabolitos se incrementa después de una adaptación de los animales al tóxico.

Estudios "in vitro" indican que son, por lo menos, tres los mecanismos que pueden conducir a la formación de triclorofenoles:

1) hidroxilación directa del lindano y descomposición subsiguiente del compuesto intermedio con formación de 2,4,6-triclorofenol (mecanismo principal).

2) formación de pentaclorociclohexano por deshidrocloración o de hexaclorociclohexeno por deshidrogenación, adición subsiguiente de oxígeno y, después de deshidrocloración, formación de 2,4,5-triclorofenol y 2,3,4,6-tetraclorofenol (Freal y Chadwick, 1973).

3) hidroxilación del triclorobenceno intermedio (Tanaka y col., 1977) (ver cuadro en la página 70).

Bajo condiciones oxidativas los metabolitos identificados son el 2,4,6-triclorofenol y el 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexeno (gamma-HCCH), intermediario de tetraclorofenoles y pentaclorociclohexeno (gamma-PCCH) que dará lugar a triclorofenoles (Grover y Sims, 1965; Chadwick y col., 1975; Stein y col., 1977; Tanaka y col., 1979; Fitzloff y col., 1982). En la vía reductiva se ha propues-

ABREVIATURAS DEL CUADRO DE BIOTRANSFORMACION DEL LINDANO.

- 2,4,6-TCP = 2,4,6-triclorofenol.
2,4,5-TCP = 2,4,5-triclorofenol.
2,3,5-TCP = 2,3,5-triclorofenol.
2,3,4,6-TTCP = 2,3,4,6-tetraclorofenol.
2,3,4,5-TTCP = 2,3,4,5-tetraclorofenol.
2,3,4,6-TCCOL = 2,3,4,6-tetracloro-2-ciclohexeno-1-ol.
2,4,5,6-TCCOL = 2,4,5,6-tetracloro-2-ciclohexeno-1-ol.
PCCOL = 2,3,4,5,6-pentacloro-2-ciclohexeno-1-ol.
 γ -TCCH = γ -3,4,5,6-tetracloro-ciclohexeno-1.
 γ -HCCH = γ -1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexeno.
PCCH = 2,3,4,5,6-pentaclorociclohexeno.
TCPMA = ácido triclorofenilmercaptúrico.
DCPMA = ácido diclorofenilmercaptúrico.
CPMA = ácido clorofenilmercaptúrico.
MFO = oxidasa de función mixta.

to un carbono del radical central del pentaclorociclohexano como un intermediario para la formación de 3,4,5,6-tetraclorociclohexano (γ -TCCH) (Baker y col., 1985). Se ha demostrado que los policlorociclohexenos sufren fácilmente conjugación con GSH (Grover y Sims, 1965; Portig y col., 1979) con el resultado de compuestos conjugados que llegan a ser excretados en la bilis u orina principalmente como derivados del ácido mercaptúrico. También se ha sugerido que la posible acumulación del 2,3,4,6 TTCP (tetraclorofenol) y otros metabolitos inhiben la biotransformación del lindano (Conney, 1967).

El lindano induce mecanismos de detoxificación hepática (Baker y col., 1985), y se ha demostrado el requerimiento de un fosfolípido para los sistemas de monooxigenasas que metabolizan xenobióticos, así que este insecticida puede potenciar la actividad microsomal hepática por incidir en los contenidos de diacilfosfatidil colina, diacil-fosfatidil etanolamina y diacil-fosfatidil serina (Antunes-Madeira y Madeira, 1985).

. TRANSAMINASAS.

Un parámetro bioquímico que se encuentra directamente relacionado con el metabolismo hepático, es el de las transaminasas. Un método comprobado para diagnosticar alteraciones tisulares (principalmente en hígado, riñón, corazón y músculo) es la determinación en sangre de la actividad transaminasa. El daño y lisis celular provoca un aumento de transaminasas en sangre en cantidades relativamente altas (Nemcsok y col., 1981). GPT (glutamato-piruvato

transaminasa) o ALAT (alanina-transaminasa) y GOT (glutamato-oxalacetato transaminasa) o ASAT (aspartato transaminasa) se encuentran ampliamente distribuidos en tejidos animales y en suero como resultado de la normal destrucción de tejidos y el consiguiente recambio enzimático. El aumento en el nivel de estas enzimas indica un daño tisular general, incluidos hígado, riñón y músculo. También se ha visto que lesiones en el tejido del sistema nervioso central producen alteraciones significativas en SGOT y SGPT (Nydick y col., 1957).

Se han asociado aumentos en los niveles de SGOT con la hepatitis viral, hepatectomía parcial y con daño hepatocelular provocado por tetracloruro de carbono. El CCl₄ se ha considerado como prototipo de la toxicidad de los compuestos organoclorados. Produce una elevación de ambas enzimas en suero, alcanzando su máximo nivel a las 24 horas. Cuando cesa la exposición al tóxico, SGOT y SGPT decaen rápidamente al nivel normal de actividad.

En la intoxicación crónica por aldrín (organoclorado) en cabras se observó un aumento de SGOT a partir del decimosexto día, siendo el incremento gradualmente mayor durante la última semana (3^a) de administración. En la SGPT, también se produjo un aumento a partir del decimosexto día (Wroblewski y LaDue, 1956).

De acuerdo a los resultados obtenidos por Jeney y col., 1981, en un estudio con carpas, la determinación de la actividad transaminasa (GOT y GPT) en suero provee un método fiable para detectar daños en tejido, causado por factores ambientales adversos. El-

Gendy y col., 1986, observaron cambios en algunos parámetros bioquímicos tales como un aumento en los niveles de aminoácidos y proteínas totales en suero y alteraciones en la proporción albúmina/globulina, así como cambios en la actividad de algunas enzimas séricos como aldolasa, fosfatasa alcalina, SGOt y SGPT que se atribuyeron a los organoclorados por perturbar las funciones del hígado. Existe un trabajo de Wells y To, 1986, que apoya la hepatotoxicidad de los compuestos organoclorados.

1.7.4. NEUROTOXICIDAD. DOPAMINA.

El lindano produce, fundamentalmente, un efecto neurotóxico. En los mamíferos, la intoxicación va acompañada de disfunciones respiratorias, temblores generalizados, hipersalivación y convulsiones de tipo epiléptico. Estos síntomas vuelven a aparecer y desaparecer, si la muerte no sucede en las fases convulsivas.

La neurotoxicidad es difícil de explicar por una acción específica localizada en un centro preciso, pero el síntoma característico de la intoxicación aguda por lindano son las convulsiones que en casos extremos puede conducir a la muerte. La recuperación depende de muchos factores: tipo de organismo, edad, sexo, cantidad de dosis administrada e incluso el vehículo. Los primeros síntomas de envenenamiento aparecen durante la primera hora, si bien en algunos casos aislados, se manifiestan con posterioridad.

Cuando está presente en grandes concentraciones en todo el organismo, el lindano es un estimulante del SNC, y produce espasmos musculares y convulsiones. Entre los síntomas y signos de intoxicación por lindano puede presentarse también cefalalgia, náu-

seas, vómitos, vértigos, insuficiencia respiratoria y, finalmente, la muerte.

Se ha reconocido que muchas de las sustancias que poseen acción sobre el sistema nervioso, y en particular sobre el comportamiento, son fármacos o neurotoxinas, y deben su capacidad a la interferencia con ciertos aspectos de la transmisión química. Estos agentes pueden actuar, bien inhibiendo la síntesis de las monoaminas, bien estimulando e inhibiendo los neurotransmisores o bien bloqueando a los receptores.

Se ha observado que altas concentraciones de lindano en cerebro causan efectos neurotóxicos por su acción como agente convulsionante (Tusell y col., 1987), mientras que el alfa-HCH solamente produce débiles efectos estimulantes. Aunque el mecanismo neurotóxico de los isómeros del HCH no está totalmente esclarecido, Muñoz-Blanco y col., 1982, manifiestan en un trabajo de González y col., 1983, que la toxicodinamia de la intoxicación aguda por lindano, en ratas, produce en encéfalo una disminución acusada en el porcentaje de aminoácidos neurotransmisores inhibidores.

Se conoce la afinidad del alfa-HCH por la mielina cerebral (Stein y col., 1980) pero la heterogeneidad de la distribución del lindano en cerebro sigue creando controversias (Stein y col., 1980; Lievremont y Potus, 1981).

. DOPAMINA.

Las neuronas que contienen la monoamina transmisora, dopamina, se concentran en las regiones del encéfalo medio, conocidas como sustancia nigra y tegmentum ventral. Muchas de las neuronas que contienen dopamina proyectan sus axones hacia el sistema límbico, donde se cree que desempeñan un papel de regulación de las respuestas motoras. Otras fibras de dopamina terminan en el cuerpo estriado. Se supone que en éste, la dopamina desempeña un papel esencial en el control de los movimientos complejos. También hay un pequeño conjunto de neuronas de dopamina en el hipotálamo, que regula la secreción de hormonas de la glándula hipofisaria.

Se ha asociado a la dopamina con dos trastornos cerebrales en el hombre. Una deficiencia en el cuerpo estriado, que es la causa de la rigidez y los temblores en la enfermedad de Parkinson, y un exceso de la misma en la zona límbica del encéfalo anterior, que puede tener implicación en la esquizofrenia.

La dopamina es sintetizada a partir de la tirosina y transformada en dihidroxi fenil alanina (L-DOPA), por la enzima tirosina-hidroxilasa. Su descarboxilación conduce a la dopamina. La dopamina es un neurotransmisor propio, además de precursor de la noradrenalina y adrenalina, que se forma por beta-hidroxilación de la dopamina.

La inactivación de las catecolaminas cerebrales funcionales se lleva a cabo por dos procesos fundamentales :

Uno de transformación, por un mecanismo enzimático en productos prácticamente inactivos, y otro, por recepción del neurotransmisor en el terminal nervioso presináptico.

La velocidad de síntesis de la dopamina no está limitada al paso catalizado por la tirosina-hidroxilasa; pueden influir otros factores, como la disponibilidad del sustrato, la de coenzimas y la integridad estructural de las partículas intracelulares que intervienen en la biosíntesis.

La inhibición de la síntesis o el bloqueo de enzimas inciden en la transformación de la amina o de sus precursores en otra amina, como en el caso de la alfa-metil paratirosina, que sustituye a la tirosina, inhibe a la tirosina-hidroxilasa, bloqueando así la síntesis de noradrenalina y dopamina.

Joy, 1982, propuso que el lindano y los ciclodienos actuaban sobre las neuronas de una manera global intensificando la actividad sináptica y aumentando la liberación de los neurotransmisores desde el terminal sináptico, sin aparente predilección por los sistemas excitadores o inhibidores. Esta propuesta está basada principalmente en estudios electrofisiológicos. Una acción global en la liberación de los transmisores esta avalada indirectamente por estudios "in vitro" en cortes de cerebro que muestran, que estos insecticidas pueden estimular la liberación del ácido glutámico y de la acetilcolina (Antunes-Madeira y Madeira, 1985). Se ha sugerido una posible interacción entre estos insecticidas y la homeostasis del calcio en terminales sinápticos debido a la

demostración de que el lindano aumenta la recaptación de Ca^{++} hacia los sinaptosomas en encéfalo (Narbonne y Lievremont, 1983). Otros autores han observado que esto va a producir un incremento en la frecuencia del potencial de la placa terminal en las uniones neuromusculares de rana, una acción que consiste en una elevación en la concentración de calcio libre intracelular (Publicover y Duncan, 1979; Woolley y col., 1985; Joy y col., 1987).

Para Suñol y col., 1988, la acción del lindano produciendo hipotermia y anorexia, favorecería la explicación basada en una interacción específica con receptores de neurotransmisores, tales como la [3H]-picrotoxina en el receptor GABA-A. También los sistemas de neurotransmisores monoaminérgicos (particularmente noradrenalina y serotonina) en el hipotálamo están envueltos en la regulación de la temperatura del cuerpo y en el comportamiento alimentario. Los resultados indican que dosis subconvulsionantes de lindano inducen cambios en la actividad de serotonina en varias regiones del cerebro de rata. Tales cambios de temperatura del cuerpo y de comportamiento alimentario estarían mediatizados en parte por monoaminas hipotalámicas.

Hay estudios que sugieren una acción inhibitoria, por parte de ciclodienos y ciclohexanos sobre el receptor de GABA (Matsumura y Ghiasuddin, 1983). Se demostró que el endrín y el lindano bloquean la respuesta del GABA recogida en la membrana del soma de la neurona motora depresora coxal de la cucaracha, *Periplaneta americana*. Esta región de la membrana neuronal posee contactos no presinápticos, y esto simplifica la interpretación de interac-

ciones del insecticida con los receptores del GABA. Estos mismos autores, evidenciaron que estos organoclorados pueden actuar competitivamente en el lugar de la picrotoxina del complejo receptor del GABA del SNC de los vertebrados. Estos compuestos inhiben la salida de cloro estimulada por el GABA en las vesículas cerebrales de rata (Wafford y col., 1989).

La administración de agentes que aumentan la actividad GABA, como diazepam, clonazepam o fenobarbital, previenen las convulsiones inducidas por lindano. Ya que el GABA y los receptores del GABA han sido encontrados en el tracto gastrointestinal, Wooley y Griffith, 1989, sugirieron que la presencia de anorexia, después de la administración oral de lindano, se debería a un efecto directo de éste sobre el tracto gastrointestinal, así como sobre el SNC.

Muñoz-Blanco y col., 1982, han encontrado que en encéfalo, la administración de lindano provoca un descenso de los niveles de GABA, acompañado de una elevación de los niveles de glutamato y aspartato, lo que podría deberse a la inhibición de la GAD.

Se ha estudiado el efecto del lindano en insectos y se ha demostrado que actúa mejor sobre el ganglio que sobre el axón del nervio aislado (Wang y col., 1971; Shankland y Schroeder, 1973; Uchida y col., 1975). En el ganglio de cucaracha, se observó que el lindano producía un aumento espontáneo o provocaba la liberación de la ACh (Shankland y Schroeder, 1973; Uchida y col., 1975; Schroeder y col., 1977).

Sloley y col., 1985, trabajando con la cucaracha americana, *Periplaneta americana*, observaron incremento de dopamina y de n-acetil dopamina en ganglios cerebrales como respuesta a dosis bajas de lindano, sin que la serotonina mostrara alteraciones. Son muchos los estudios que evidencian la neurotoxicidad del lindano en dosis no letales, alterando la transmisión nerviosa a nivel de la membrana presináptica (Uchida y col., 1975; Joy, 1976; Portig y Stein, 1981; Magour y col., 1984; Joy y Albertson, 1985).

Dosis bajas de lindano conllevan una serie de variaciones en los niveles y en el metabolismo cerebral de las catecolaminas. Las catecolaminas son neurotransmisores relacionados con la termorregulación y más concretamente con la hipotermia. Aldegunde y col., 1981; Woolley y col., 1985; Camon y col., 1988 han informado sobre la hipotermia y la anorexia en ratas después de una única dosis de lindano.

Se han relatado tratamientos que alteran el triptófano cerebral e inducen variaciones correlativas en la concentración de serotonina (Fernstrom y Wurtman, 1971). La disponibilidad de triptófano en cerebro es el principal determinante de la cantidad de síntesis de serotonina. Así, se puede deducir que el incremento en los niveles de serotonina una hora después de la administración de una dosis alta del pesticida, pueden depender de la variación del triptófano en el encéfalo. La estimulación de neuronas serotoninérgicas produce un aumento en la síntesis de serotonina y es posible que variaciones en la síntesis de ésta pueden estar inducidas neuronalmente o por variación en la concentración ce-

rebral de triptófano o por ambas, dependiendo de las dosis (Aldegunde y col., 1983).

El efecto del lindano sobre el sistema nervioso central se traduce en una hiperactividad, que puede ser comprobada por métodos neurofisiológicos tales como la implantación de microelectrodos en determinadas zonas del SNC o mediante la cuantificación de los neurotransmisores catecolaminérgicos. Varios autores han comprobado que la frecuencia y la descarga espontáneas en las membranas postsinápticas son más prolongadas en animales tratados con lindano y ciclodienos que en animales control (Nash y Woolson, 1967; Greichus y col., 1978).

Las consecuencias de una alteración de la dopamina pueden provocar irregularidades en los mecanismos implicados en la transmisión nerviosa. Principalmente, hay dos sistemas que pueden verse alterados: la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa y los niveles de acetilcolina (Goto, 1971). La dopamina estimula la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa en el sistema nervioso central, aumentando la afinidad de la enzima por el ATP. En el mismo sentido Magour y col., 1984, estudiando el efecto del lindano sobre la bomba Na^+/K^+ , encontraron que, con una inyección intraperitoneal de 40 mg/kg de peso de lindano, se observaba un descenso de la ATPasa en un 23%. Estos autores atribuyen el descenso de la enzima a la interferencia del lindano sobre la naturaleza lipoprotéica de ésta.

1.7.5. TOXICIDAD AGUDA Y CRONICA.

En la actualidad se han realizado un gran número de investigaciones centradas en la toxicidad aguda del lindano. Sin embargo, estas investigaciones, que abarcan desde diversidad de especies hasta los efectos sobre parámetros fisiológicos, neurológicos o bioquímicos, pasando por gran variedad de dosis y a intervalos de tiempo diferentes, no se traducen sino en una escasa homogeneidad en los datos que dificultan su interpretación. En cuanto a la toxicidad crónica, además de existir menor información sobre la intoxicación a largo plazo, los efectos e incidencias de ésta en el organismo animal no se manifiestan de una manera tan patente como la toxicidad aguda, lo cual no quiere decir que no sea efectiva. A continuación se hace una breve reseña de estudios sobre la toxicidad aguda y crónica.

La penetración del lindano en los animales puede realizarse por diferentes vías. La aplicación tópica de una dosis de lindano (3 microg/g) en el último estadio larvario de la langosta africana, *Locusta migratoria*, indujo una secuencia de síntomas característicos : después de una fase inicial de hiperexcitación que duró alrededor de dos horas, los insectos presentaron convulsiones generalizadas, temblores y movimientos no coordinados. Es en este estadio, y a las 18 horas después de la aplicación de la dosis cuando se observaron efectos irreversibles; los individuos no recuperaron su comportamiento normal (Moreteau y Chaminade, 1983). En otro estudio sobre la langosta, *Locusta migratoria*, por estos mismos autores en 1988, observaron los efectos de este compuesto

neuroactivo en los niveles de aminas biógenas. Se comprobó que el lindano en dosis agudas aumentaba significativamente los niveles de dopamina (DA) y de 5-HT en los ganglios cerebrales. Estos resultados podrían estar relacionados con un descenso en la actividad de la N-acetiltransferasa.

Hanig, 1976, aplicando lindano al 1% (10 g/l) (en monoestearato de glicerol, alcohol metílico, ácido esteárico, etc.) a todo el cuerpo de ratones destetados y a conejos adultos jóvenes en una dosis de 60 mg/kg de peso corporal, obtuvo como resultado, anorexia y convulsiones en los ratones destetados, llegando a la conclusión de que los animales jóvenes tenían una mayor absorción percutánea o que eran más sensibles que los animales adultos.

Un estudio de O'Brien, 1967, con 60 mg/kg de peso de lindano, puso de manifiesto un aumento del contenido del citocromo P-450 en el hígado de rata. Este efecto, se acompañó de aumentos progresivos en la generación de O_2^- microsomal y en una peroxidación lipídica del hígado. En otro experimento, Videla y col, 1988, con la misma administración a ratas adultas, observaron también un aumento en la peroxidación lipídica del hígado después de 24 horas de tratamiento. El nivel de glutatión en los hepatocitos sufrió alteración así como el contenido y liberación biliar de sulfuro de glutatión que aumentó drásticamente, llevando a un descenso en las proporciones celulares y biliares de GSH/GSSG. Estos autores sugirieron que el tratamiento con lindano conduce a una capacidad oxidativa inducida, que, altera el contenido de glutatión en el tejido hepático. Otros trabajos realizados con

una dosis de lindano de 20,40,60 y 80 mg/kg llevaron a un aumento progresivo en el contenido microsomal del citocromo P-450 y en la cantidad generada del anión superóxido. Además, estos cambios se vieron reforzados por una progresiva esteatosis hepática. Los datos metabólicos se interpretaron en términos de una relación causal entre el aumento en la generación del radical superóxido, secundario a la inducción del citocromo P-450, y un incremento en la peroxidación lipídica. También se produjo un descenso en la actividad de la superoxido dismutasa y catalasa, lo que contribuyó al aumento de niveles de peroxidación lipídica en función de sus propiedades antioxidantes (Junqueira y col., 1986).

La toxicidad aguda de esta droga en ratas es de 125 mg/kg de peso para la DL₅₀ oral (Portig y Schnorr, 1988), y se ha establecido que el nivel mínimo de lindano en encéfalo de rata capaz de producir estimulación nerviosa es alrededor de 5 microg/g (Tusell y col., 1988).

Otro estudio realizado por Aldegunde y col. en 1981, con una dosis de 180 mg/kg produjo, en ratas, una disminución de la temperatura corporal, y se relacionó con una marcada alteración en el metabolismo de las catecolaminas en todo el cerebro y a nivel hipotalámico. Este insecticida actúa sobre el sistema aminérgico en el cerebro de mamíferos donde la administración de dosis agudas por vía oral (180 y 240 mg/kg) indujo una elevación de la concentración de serotonina y de su metabolito, el 5-hidroxiindol acético.

Muñoz-Blanco y col., 1985 y González-Rodríguez y col., 1987, observaron que la intoxicación aguda en ratas producía un aumento significativo en la actividad de la acetil colinesterasa en plasma y en fracciones sinaptosomales de distintas zonas del SNc. Este aumento puede deberse a una activación directa o indirecta en los sistemas de transmisión colinérgica centrales y periféricos que desencadenarían las convulsiones tónico-clónicas típicas de los animales intoxicados.

Según Ahdaya y Guthrie, 1982, la intoxicación a corto plazo con dosis llamadas convulsionantes (30 mg/kg) de lindano en ratones, no sólo va a afectar al triptófano cerebral por variación del triptófano libre, sino también va a variar el transporte de dicho aminoácido al cerebro.

Junqueira y col, 1986, administrando una única dosis de 20, 40, 60 y 80 mg/kg de peso de lindano a ratas, mostraron esteatosis hepática como signo más notable tras la administración. Esta alteración se evaluó histológicamente mediante la técnica del Sudan III, caracterizándose por la presencia de pequeñas gotas de grasa dispersas por todo el citoplasma de los hepatocitos periportales. Es interesante anotar que esta lesión parece ser progresiva con el aumento en las dosis de lindano (Junqueira y col., 1986).

Los estudios sobre intoxicación crónica han querido mostrar los efectos provocados mediante exposiciones permanentes. Estos se han realizado fundamentalmente en medios acuáticos y en animales de experimentación como la rata.

Una intoxicación crónica por lindano en la especie piscícola *Tilapia mossambica*, Basha y col., 1984, observaron al principio de la contaminación un aumento en el consumo de oxígeno seguido de una disminución en función del tiempo de exposición. Atribuyeron el aumento inicial a una aceleración del metabolismo oxidativo en respuesta a estímulos ya que después de cesar los síntomas de envenenamiento se produjo una disminución.

Hay poca información disponible acerca de los cambios inducidos en peces por intoxicaciones a largo plazo, y, especialmente, fijándose en los niveles de glucosa en sangre, se pudieron observar cambios en ésta por la alimentación, o por gluconeogénesis, la cual es estimulada fácilmente en peces mediante "stress" (Demaël y col., 1984). El lindano puede actuar sobre el hígado a través de un efecto como el que presenta el stress. Demaël y col., 1987, sometieron a carpas, *Cyprinus carpio*, a una intoxicación crónica con lindano (desde 10 a 1000 mg/kg) durante 109 días, llegando a la conclusión que el lindano afecta a la función de las estructuras celulares modificando las propiedades de la matriz de la membrana lipídica llevando a disfunciones metabólicas.

Otros estudios sobre toxicidad crónica han puesto en evidencia la degeneración celular en riñón de rata macho, el grado de estas lesiones está significativamente correlacionado con las cantidades de lindano encontradas en este órgano (Engst y col., 1977; Zhu y col., 1986). Hay investigadores que han sugerido que algunos componentes de la dieta tales como lípidos (Copeland y col., 1986), fibra (Joy, 1976) y proteínas (Tusell y col., 1987) ejer-

cen un efecto importante en el almacenaje e inducción del metabolismo del lindano. El efecto del lindano y otros organoclorados sobre el contenido lipídico hepático está modificado por los lípidos de la dieta.

El tratamiento crónico (20 y 40 mg/kg durante diez semanas) a ratas hembras recién destetadas con este insecticida indujo un incremento en el consumo de alimento, un aumento significativo en su peso corporal (Chadwick y col., 1988a).

Dosis crónicas a ratas con este pesticida causaron hipertrofia del retículo endoplasmático, y basofilia hepatocelular (Wester y col., 1985). En otros mamíferos se han observado efectos como modificaciones de la temperatura y del peso después de la administración de varias dosis de gamma-HCH, o bien en conejos a los que se administró lindano en dosis orales diarias de 3.75, 7.5 y 15 mg/kg de peso durante 12 semanas no se encontró sintomatología nerviosa. Solo con la dosis más elevada (15 mg/kg) se retrasó significativamente el crecimiento corporal, se engrosaron el hígado y las glándulas suprarrenales y algunas células hepáticas estaban hipertrofiadas con degeneración grasa (Ullmann, 1972).

Andrews y Gray, 1990, administraron dosis de 10 y 20 mg de lindano a ratas, durante 10 semanas. Los resultados mostraron una ossificación esquelética incompleta, afectación del metabolismo del calcio y lesiones histopatológicas (degeneración tubular y formación de gotas de grasa a nivel renal). El lindano se mos-

tró nefrotóxico como demostró el incremento de peso renal, en la proporción peso riñón/peso del cuerpo y la excreción urinaria de enzimas, así como la histopatología.

1.7.6. MUTAGENICIDAD Y CARCINOGENICIDAD.

Aunque existen controversias al respecto, se considera que el lindano posee potencial de mutagenicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad (Gopalaswamy y Aiyar, 1986). Nagasaki y col., 1971, aludieron al desarrollo de hepatomas en ratones tratados con gamma-HCH.

Sin embargo, en conejos a los que se administró lindano en dosis orales de 25 mg/kg de peso dos veces a la semana durante 5 semanas no se observaron cambios en la actividad tumorigena un año después de cesar la administración (Wurster, 1969b).

El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC), 1979a, evaluó los datos sobre mutagenicidad y carcinogenicidad y concluyó que hay pruebas suficientes de que el lindano es carcinógeno en ratones. También se ensayó el compuesto en ratas y se advirtió un ligero exceso de tumores en el tiroides de las hembras. En la evaluación de los datos sobre carcinogenicidad, el CIIC, 1979b, clasificó al lindano en el grupo de "pruebas insuficientes" en el ser humano (indicando que los estudios no pueden ser interpretados como demostrativos ni de la presencia ni de la ausencia de efectos carcinogénicos) y de "pruebas limitadas" en los animales (indicando que los datos que sugieren un

efecto carcinogénico son de valor limitado porque, entre otras razones, se refieren a una sola especie).

En la reunión conjunta FAO/OMS de Expertos en Residuos de Plaguicidas en los Alimentos (1978), se llegó a la conclusión de que los estudios en ratas practicados con lindano mucho más puro que en experimentos anteriores, no presentan prueba alguna de que la exposición a este xenobiótico produzca tumores o cáncer. Esta información está en contraposición a los resultados obtenidos por Nigam y col., 1984, en un experimento sobre toxicidad crónica en ratones entre seis y ocho semanas de edad. El estudio fue realizado para clarificar las alteraciones estructurales en el hígado de ratón después de la administración de gamma-HCH en dosis de 500 ppm mezclado en el alimento durante ocho meses. Al cabo de este tiempo se observó una excesiva presencia de glucógeno, excesiva proliferación de retículo endoplasmático liso con cambios estructurales en el retículo endoplasmático rugoso y gran acumulación de grasa con cambios en la membrana nuclear y en los nucleolos. El retículo endoplasmático rugoso juega un papel importante en la hepatocarcinogénesis y en este estudio mostró pronunciados cambios estructurales así como se confirmó que los cambios histológicos y ultraestructurales producidos por el lindano son similares a los descritos con otros hepatocarcinógenos.

Es importante señalar que los datos sobre carcinogenicidad se basan exclusivamente en estudios practicados con ratones. Sus resultados son demasiado limitados para extrapolarlos al riesgo de carcinogénesis para el hombre y otros organismos.

OBJETIVOS .

1.- ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO.

Un estudio realizado por encargo de la Dirección General del Medio Ambiente (Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo) (Martínez-Conde y col., 1983), sobre la presencia de pesticidas organoclorados en las cuencas de los ríos Riansares, Gigüela y Zán cara, nos evidenció, junto a otros pesticidas organoclorados, la presencia generalizada de lindano en el medio biótico y abiótico. El lindano aparecía, junto a sus isómeros y al HCB, en todas las muestras analizadas, con acumulación preferente en animales.

A partir de ahí parecía evidente tratar de inferir la problemática particular de este contaminante haciendo un diseño experimental que permitiera interpretar acerca de su acción sobre el organismo animal a corto y más largo plazo. Existe bibliografía exhaustiva sobre el tema, pero los estudios abordan aspectos parciales y fragmentarios de su acción, así como en algunos casos contradictorios, principalmente con dosis aguda y en menor cantidad con dosis crónica, por lo que era necesario abordar su estudio.

Posteriormente, ha surgido una gran controversia sobre su uso y la organización de carácter internacional Red de Acción contra

Pesticidas (PAN) le ha incluido como uno de los 12 pesticidas más peligrosos que existen.

Nuestro propósito es valorar los riesgos a corto medio plazo en los organismos afectados para prevenir los abusos en su utilización desde los presupuestos de los efectos indirectos, que muchas veces entrañan grandes riesgos o lesiones irreversibles, debido a su acumulación.

Este estudio propuesto como Tesis Doctoral ha significado un aporte útil e importante en la parcela de conocimiento como lo contrasta por un lado el interés manifestado por el Instituto de Salud de Navarra, que ha financiado el proyecto, con vistas a la utilización periódica o no del lindano como pesticida y por otro para poder valorar el riesgo potencial a que podrían estar sometidos los aplicadores y las poblaciones más próximas.

2.- OBJETIVOS CONCRETOS.

Como objetivos concretos se trata de poner de manifiesto las alteraciones funcionales que se producen cuando el insecticida organoclorado γ -HCH (lindano) se administra en dosis aguda (60 mg/kg de peso) y la misma cantidad en dosis subcrónica.

Para ello, utilizamos como animal de experimentación la rata, *Rattus norvegicus*, raza Wistar, variedad albina, recomendado para este tipo de estudios de toxicidad (C.E.E., 1979).

El estudio comprendió :

- 1) Sintomatología tras la administración.
- 2) Distribución y acumulación en diferentes órganos.
- 3) Cuantificación de catecolaminas: dopamina.
- 4) Valoración de transaminasas.
- 5) Alteraciones morfológicas en hígado y riñón.

- * En el primer apartado se pretendió inferir si las respuestas neurotóxicas se sucedían o no, con ambas dosis (aguda y subcrónica) y en qué medida.
- * Para cumplir el segundo de los objetivos, se eligieron el hígado, el riñón y el cerebro. El hígado, como paso obligado del xenobiótico; el riñón, como órgano excretor, suministrando información sobre la facilidad o dificultad en su eliminación; y el cerebro, como posible órgano de fijación con cierta permanencia del contaminante.
- * La acción neurotóxica del lindano nos llevó a elegir la dopamina para valorar posibles variaciones en sus concentraciones, por el hecho de ser un neurotransmisor e intermediario en la síntesis de la noradrenalina y de la adrenalina.
- * La valoración de las transaminasas (ASAT y ALAT) en suero, es un test obligado para interpretar trastornos metabólicos y puede ser indicativo de posibles daños en tejidos, en especial el tejido hepático.

- * El estudio de las alteraciones morfológicas de ambos tejidos (hígado y riñón), a la luz de los parámetros anteriores, puede evidenciar ingestas de lindano, que sin sintomatología aparente, causan efectos incluso irreversibles, de gran interés en la sanidad preventiva.

Todo ello, pensamos que nos podría poner en condiciones de interpretar una contaminación aguda y puntual frente a un envenenamiento solapado y crónico.

MATERIAL Y METODOS

2.1. MATERIAL.

. ANIMALES.

En este estudio se han utilizado ratas de la especie *Rattus norvegicus*, variedad albina, raza Wistar. Todos los animales, tanto controles como experimentales, tenían un peso inicial de 225 ± 25 gramos, con una edad comprendida entre 80 y 90 días.

Se dispusieron en grupos de animales controles y experimentales, machos y hembras, en un total de 128. En el caso de las hembras, todas eran nulíparas. Todos los animales dispusieron de agua y comida "ad libitum" y fueron sometidos a las mismas condiciones de luz (fotoperiodo natural) y temperatura (ambiente).

Del lote de animales, todos fueron pesados antes de iniciar la experimentación, y al final de la misma (dosis aguda y dosis subcrónica). Sacrificados los animales, se extrajeron los órganos (hígado, riñones y cerebro), fueron pesados y mantenidos a -20°C hasta su posterior análisis.

Se utilizaron 64 animales para la dosis aguda y 64 para la subcrónica.

Dosis aguda: de los 64 animales destinados a la experimentación, en 32 se realizó el estudio de la dopamina, acumulación del lindano en órganos y estudio morfológico (hígado y riñón). 16 controles y 16 experimentales, divididos por sexos (ocho machos y

ocho hembras). Los 32 restantes, se utilizaron para la valoración de transaminasas, y fueron distribuidos igualmente en dos grupos de 16 animales controles (ocho machos y ocho hembras) y 16 animales experimentales (ocho machos y ocho hembras). El test de transaminasas se realizó, después de la administración, a las 2, 6, 12, 24, 48 horas y en el 4º, 8º, 12º y 14º día para la dosis aguda.

Dosis subcrónica: se procedió de la misma forma, se tomaron 64 animales para la experimentación, de los que 32 se utilizaron para el estudio de la dopamina, la acumulación de lindano en órganos y el estudio morfológico. De estos se hicieron dos grupos de 16 animales, controles y experimentales, y a su vez estos se subdividieron en dos grupos de ocho animales cada uno (machos y hembras). De los 32 animales destinados a la valoración de transaminasas, 16 eran controles (ocho machos y ocho hembras) y 16 eran experimentales (ocho machos y ocho hembras). El test de transaminasas se realizó al 6º, 12º, 18º, 24º, y 30º día desde el comienzo del tratamiento para la dosis subcrónica.

Para el estudio morfológico se tomaron muestras de hígado y riñón tanto de animales controles como de experimentales y tanto de la dosis aguda como subcrónica, elegidos al azar. Se introdujeron en formol neutralizado a pH 7,4 al 10% para su posterior inclusión en parafina y tratamiento para microscopía óptica.

TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES :

. DOSIS AGUDA.

En la dosis aguda, se han seguido las normas propuestas para la determinación de la toxicidad por la C.E.E., 1979.

El lindano fue administrado por vía oral mediante sonda intragástrica, encontrándose los animales en ayunas desde 24 horas antes de la administración, con libre acceso al agua. La dosis fue la mitad de la dosis letal LD_{50} que para la rata es de 60 mg/kg de peso corporal de gamma-HCH (lindano) (Merck, Alemania) con un 99,5% de pureza, disuelto en 1 ml de aceite de maíz. Los animales controles recibieron el mismo volumen del vehículo utilizado.

El registro neurotóxico se realizó con todos los animales durante las primeras 12 horas, tras la administración del lindano, de manera continuada. A partir de las cuales, las observaciones fueron más distanciadas. Los animales fueron sacrificados a los 14 días desde la administración de la dosis.

Se establecieron diferentes pautas de comportamiento en los animales tras la administración de la dosis, permitiendo establecer seis tipos diferentes de sintomatología en base a las observaciones que se realizaron durante toda la experimentación y de manera ininterrumpida las 12 primeras horas.

- TIPO 0. Animales asintomáticos. Comprende los animales que no presentan signos apreciables de intoxicación, por lo que se comportan de forma similar a los controles.
- TIPO 1. Animales, únicamente, excitados.
- TIPO 2. Animales que sufrieron un solo ataque, pudiendo ocurrir éste, hasta 12 horas después de la administración de la dosis.
- TIPO 3. Animales que sufrieron ataques continuos y reiterados principalmente entre 20 y 80 minutos después de la administración.
- TIPO 4. Animales que sufrieron ataques espaciados durante las cuatro primeras horas. Entre dos ataques pueden sufrir espasmos sin alcanzar fases convulsivas.
- TIPO 5. Animales que sufrieron ataques espaciados durante las cuatro primeras horas con fases convulsivas.

DOSIS SUBCRÓNICA.

La dosis subcrónica se llevó a cabo mediante la administración de lindano con sonda intragástrica. Los animales recibieron, igualmente, 60 mg/kg de peso corporal (la mitad de la DL₅₀) en 30 días en un número total de 10 dosis, una cada 72 horas. Pasados los 30 días, se sacrificaron los animales.

En la observación realizada, estos animales no presentaron sintomatología alguna.

2.2. METODOS.

2.2.1. DETERMINACION DEL LINDANO EN ORGANOS.

El análisis de los pesticidas organoclorados presenta algunos problemas específicos en cuanto a la metodología a seguir. Por ser moléculas orgánicas liposolubles, estos pesticidas organoclorados se disuelven con facilidad en disolventes orgánicos. Esta propiedad plantea el problema de encontrar los disolventes más apropiados para extraer el pesticida del sustrato que lo contiene.

Algunos solventes muy eficaces en la extracción de pesticidas pueden presentar el inconveniente de aportar extractos demasiado ricos en sustancias orgánicas, lo que entraña una dificultad para conseguir un extracto final óptimo para el análisis por cromatografía. Por el contrario los solventes o mezclas de solventes con propiedades más selectivas, conducen inevitablemente a rendimientos más bajos. La acetona, menos tóxica que el acetonitrilo, permite las extracciones más completas y es actualmente la base del método múltiple utilizado, generalmente, por los expertos. Las excepcionales cualidades de este disolvente hacen posible la investigación de pesticidas muy diversos.

Toda técnica tiene sus hándicaps y las grandes propiedades disolventes de la acetona por el agua y los azúcares, en particular, entrañan a veces dificultades para eliminar las sustancias orgá-

nicas molestas, lo que puede traducirse en una disminución global del rendimiento del análisis para algunos productos.

Estos inconvenientes obligan a utilizar combinadamente otros disolventes tales como el hexano, acetonitrilo, éter de petróleo, con lo que se consigue una mayor purificación de la muestra. Otro problema se plantea en la identificación y cuantificación de los residuos de pesticidas obtenidos, ya que es preciso utilizar métodos analíticos con la suficiente sensibilidad para detectar las pequeñas cantidades de insecticidas extraídas de los diferentes matrices. Una de las técnicas analíticas adecuada la tenemos en la cromatografía de gases y, dentro de esta técnica general, se ha empleado el detector de captura de electrones que, además de ser lo suficientemente sensible (se pueden detectar hasta picogramos), presentan la ventaja de ser selectivos para dichos productos.

Las técnicas de extracción y purificación están basadas en las descritas en "Analytical Methods for Pesticides and Plant Growth Regulators Gas Chromatography" y su cuantificación se realizó por cromatografía de gases con captura de electrones, siguiendo los métodos descritos en la Association Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) por Mills, Onley y Gaither, (1969) con ligeras modificaciones por parte de la Agencia de Protección Ambiental (U.S.A.) (1980).

EXTRACCION DE LAS MUESTRAS:

- Se procedió a la extracción homogenizando de 1,5 a 3 gramos de tejido, con SO_2Na_2 anhidro y 40 ml de acetona agitando mecánicamente durante 30 minutos.
- A continuación se colocó el tejido macerado en papel Watmann nº1 y se recogió el filtrado en un embudo de decantación. Se prensó el residuo con una espátula y removió hasta conseguir extraer la mayor cantidad posible de líquido. Se recogió con 40 ml de acetona los residuos posibles del lavado del vaso, pasándolo de nuevo por papel Watmann nº1 para recogerlo en el embudo de decantación.
- Nuevo lavado con 20 ml de acetona, y presión del residuo, agitación del extracto con 50 ml de n-hexano y 20 ml de agua saturada de NaCl. Separación de las fases, recogiendo la de hexano.
- Se extrajo la fase de agua-acetona con 40 ml de hexano agitando y dejando separar las fases, recogiendo el hexano con el de la extracción anterior.
- A continuación purificación con acetonitrilo y columna de florisil.
- Reducción a un volumen final entre 7 y 10 ml.

PURIFICACION DE LAS MUESTRAS:

Se procedió según dos métodos:

- 1º. Partición líquido-líquido con acetonitrilo/éter de petróleo.
- 2º. Cromatografía sólido-líquido por columna con soporte de florisil.

1ª. Partición líquido-líquido.

Se basa en el diferente coeficiente de reparto que presentan los insecticidas en acetonitrilo/éter de petróleo.

Procedimiento:

- El extracto concentrado se transfirió a un embudo de decantación, añadiéndose 15 ml de acetonitrilo saturado con éter de petróleo y se agitó vigorosamente durante un minuto.
- Separación de las capas y se pasó el acetonitrilo a un embudo de decantación de 500 ml que contenía 300 ml de agua, 20 ml de solución saturada de NaCl y 50 ml de éter de petróleo.
- Se extrajo la solución de éter de petróleo inicial dos veces más con 15 ml de acetonitrilo.
- Se agitó el embudo de decantación durante 30 o 45 segundos y se dejó separar las capas. Se traspasó la capa acuosa a un segundo embudo, al que se añadió 50 ml de éter de petróleo agitándose vigorosamente durante 15 segundos, dejando separar las capas.
- Se desechó la capa acuosa y se filtró las capas etéreas a través de sulfato sódico anhidro, lavando los embudos con pequeñas cantidades de éter de petróleo.
- Se evaporó los extractos a un volumen determinado.

2ª. Cromatografía sólido-líquido.

Siendo insuficiente la purificación por cromatografía líquido-líquido, se utilizó, a continuación florisil (resina sintética de silicato magnésico de 60 a 100 mallas, que permite la retención de pigmentos, si los hubiere, o cualquier otra interferencia), previamente activado a 500/600°C durante dos horas y al que

El término "coeficiente de distribución o de reparto" se usa generalmente para describir como un compuesto se distribuye entre dos fases inmiscibles. Para un compuesto que se distribuye entre dos determinados disolventes, el valor de este coeficiente es una constante a una temperatura determinada, y la distribución de un compuesto puede describirse no sólo en términos de su distribución entre dos disolventes, sino también por su distribución entre dos fases cualesquiera, tales como sólido/líquido o gas/líquido.

La cromatografía de gases, debido al riguroso control a que se somete cada una de las variables que intervienen en el proceso, puede utilizarse no sólo para separar, sino también como método de identificación y determinación cuantitativa de cada compuesto (Dabrio, 1979).

Esta técnica, basada en la distribución de compuestos entre una fase líquida y otra gaseosa, se ha convertido en uno de los métodos preferidos para el análisis cualitativo y cuantitativo de una amplia gama de compuestos, debido a su rapidez y gran sensibilidad. El compuesto a analizar pasa a la corriente de un gas portador a través del inyector. Este consta de una cámara situada a la entrada de la columna y calentada independientemente de ésta (a temperatura superior al punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra), que suele tener una membrana de caucho a través de la cual se introduce la muestra con la ayuda de

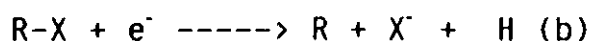
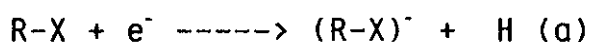
una microjeringa hipodérmica. La fase estacionaria de un material "líquido" está situada sobre un sólido granular inerte. Este material está embutido en una estrecha columna de vidrio o de acero de longitud variable y cuyo diámetro interior puede ser desde 0,1 a 50 mm, por la cual circula el gas inerte (la fase móvil), tal como nitrógeno o argón. La columna se mantiene en una estufa a una elevada temperatura, que volatiliza el compuesto a analizar, y debe poseer una buena regulación de la misma. La base de la separación de los compuestos que se analizan es la diferencia de coeficientes de reparto de los compuestos volatilizados entre las fases líquida y gaseosa, a medida que son transportados por el gas en la columna. Los compuestos pasan por un detector que está unido mediante un amplificador a un registrador, donde se acusan las señales (Williams y Wilson, 1981).

Los detectores empleados en cromatografía de gases son, en realidad, transductores de concentración. Se entiende por transductor todo instrumento capaz de convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal que ofrece información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física que incide en el transductor. Los transductores de concentración, la propiedad física que miden es la variación de concentración de las sustancias eluidas en el seno del gas portador, y la mayoría de ellos ofrecen una señal eléctrica proporcional, fácilmente medible y registrable en función del tiempo. La calidad en los detectores en cromatografía de gases viene marcada por tres conceptos primordiales: sensibilidad, linealidad y rapidez de respuesta.

Los detectores de elevada sensibilidad que tienen en la actualidad mayor interés son los de ionización. Existen diversos tipos de detectores de ionización y entre los detectores de ionización de fuente radioactiva se encuentra el detector de captura electrónica (Dabrio, 1979).

El detector de captura electrónica responde sólo a sustancias que captan electrones, particularmente a los compuestos halogenados. Este detector se utiliza, por tanto, especialmente en el análisis de compuestos policlorados, tales como los pesticidas DDT, dieldrín y HCH. Tiene una gran sensibilidad y puede detectar cantidades tan pequeñas como un picogramo de esos compuestos. El detector funciona por medio de una fuente radiactiva (^{63}Ni , ^3H) que ioniza el gas de la columna, y los electrones así producidos crean una corriente entre los electrodos, a los cuales se aplica un voltaje adecuado. Cuando sale de la columna un compuesto captador de electrones, los electrones ionizados son atrapados, la corriente baja y este cambio de corriente se refleja en el registrador.

Si se somete un compuesto a la acción de un elemento radiactivo son posibles muchas reacciones entre el compuesto y los diversos tipos de radiación. Uno de los procesos posibles es el que se esquematiza a través de las siguientes reacciones :

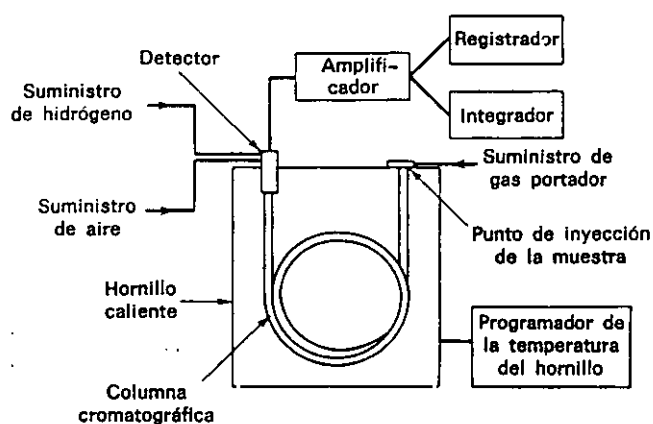


En este proceso de basaron Loveloch y Lipsky (1960) para diseñar un detector de elevada sensibilidad que supliera al detector de conductividad térmica y al de ionización de llama para la detección de sustancias (derivados halogenados) que se perciben difícilmente con el de ionización de llama.

Según las reacciones indicadas, una corriente eléctrica entre una fuente radioactiva y un cátodo quedará seriamente modificada al aparecer una sustancia del tipo R-X, pues los electrones libres son sustituidos en parte por iones que se mueven más lentamente. La probabilidad de captura por parte de la molécula R-X dependerá de la afinidad electrónica de los átomos de la misma y de la intensidad del campo.

El detector de captura de electrones es un detector selectivo, que da respuesta para compuestos con átomos de elevada afinidad electrónica, lo cual lo hace muy apropiado para la detección cromatográfica de plaguicidas gracias a la elevada sensibilidad de este detector, especialmente para los derivados halogenados. La sensibilidad y eficiencia de este detector dependen de la eficacia de la fuente radiactiva y del rendimiento de captura electrónica y recombinación de los iones. Para lograr unas condiciones óptimas de trabajo deben controlarse adecuadamente las siguientes variables, pues todas ellas influyen seriamente sobre el rendimiento: Voltaje de excitación, caudal y naturaleza del gas portador (N_2 , He, A), temperatura de trabajo y sangrado de fase estacionaria y naturaleza de la misma.

VALORACION:



Se utilizó un cromatógrafo VARIAN AEROGRAF, modelo 2.800, con detector de captura de electrones ^{63}Ni . Columna de vidrio de dimensiones: $2 \times 1/4 \times 1/8$ QF-1 GCQ 80/100 m.

Condiciones experimentales :

Temperatura del detector ----- 300°C

Temperatura de la columna ----- 180°C

Temperatura del inyector ----- 225°C

Flujo del gas portador ----- 40 ml/sg

La concentración del patrón empleado en todos los casos fue de $0,1 \text{ ng/ml}$.

Una vez realizada la extracción y la purificación de la muestra se procedió a su análisis cromatográfico. Se cromatografió una solución patrón y se identificó el lindano por su tiempo de retención.

La cuantificación se realizó por la medida de la altura del pico registrado, medida que se ha interpolado en una curva de calibrado, en la que se calculan los nanogramos de pesticida que contie-

ne la muestra. La cantidad de lindano se expresa en partes por millón (ppm). Para llegar a esta expresión cuantitativa, se aplica la fórmula:

$$\text{ppm} = p/G$$

donde : p = microgramos de pesticida que hay en la muestra.

G = gramos que se han tomado de la muestra para hacer la extracción.

CONFIRMACION:

Al ser el detector de captura de electrones un detector semiselectivo, nunca se tiene la certeza de que el pico de la muestra (aunque su tiempo de retención coincida plenamente con el tiempo de retención del insecticida) sea dicho insecticida. Por lo cual, se procedió a la confirmación de dichos picos mediante dos técnicas diferentes:

- Cambio de columna con diferente polaridad, por lo que cambiará el tiempo de retención del pesticida.
- Cambio de temperatura de la columna, con lo cual se alarga o disminuye su tiempo de retención.

Existen en la actualidad otros métodos alternativos para la identificación y cuantificación de lindano y otros pesticidas organoclorados, como pueden ser la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la espectrometría de masas que suele emplearse como confirmación a la cromatografía de gases con captura de electrones.

2.2.2. DETERMINACION DE AMINAS BIOGENAS: DOPAMINA.

Los animales se sacrificaron sin anestesia con el fin de evitar alteraciones de las catecolaminas, por decapitación con guillotina. La decapitación se realizó siempre a la misma hora para prevenir, en lo posible, los cambios producidos por el ritmo circadiano en los niveles de las aminas.

Inmediatamente después del sacrificio, se procedió a la extracción del encéfalo.

La disección del mismo se realizó según Glowinski e Iversen (1966) colocando el encéfalo en una placa Petri con hielo y se realizando cinco cortes: dos anteroposteriores a los lados del hipotálamo, uno perpendicular a estos por el quiasma óptico y otro, también perpendicular, por delante de los cuerpos mamilares. El quinto corte es horizontal, para separar la parte superior, correspondiente a la corteza. El encefalo se pesó y almacenó a -20°C hasta el momento de su valoración. El tiempo máximo de almacenaje fue de dos semanas.

La extracción de la dopamina (DA) se llevó a cabo por el método de Welch y Welch (1969). El encefalo se homogeneizó en un potter, introducido en un baño de hielo, con 3 ml de HCl 0,01N muy frío; y 0,1 ml de EDTA al 10% (agente quelante de iones Ca^{++} libres y otros cationes divalentes). El homogenado se virtió en un tubo de centrífuga de 40 ml de capacidad, que contiene 25 ml de buta-

anol y 4 g de NaCl, siendo a continuación agitados en un agitador magnético de varilla imantada recubierta de teflón e introducidos en un baño de hielo durante 10 minutos; posteriormente se centrifuga a 3000 rpm (1500 g) durante 10 minutos.

El butanol sobrenadante extraído, se puso en un tubo de centrifuga de 70 ml, en el que se añadieron 40 ml de heptano y 2 ml de tampón fosfato 0,5M y pH 7,3. Después de agitar los tubos durante 10 minutos se procedió a centrifugar por segunda vez a 2000 rpm (1000 g) durante 10 minutos.

Extraída la fase acuosa se acidificó con HCl 3N hasta pH 3,5-4; y se le añadió 20 ml de eter dietílico, agitando y centrifugando a 2000 rpm (1000 g) durante 8 minutos. A continuación se extrajeron alícuotas para la determinación fluorimétrica de la DA.

PATRONES:

Se preparó una solución madre de clorhidrato de DA de 100 ug/ml, que se conservó frío, con una vida media de un mes. En el momento de las valoraciones se preparó una solución de 1 ug/ml, a partir de la cual se realizaron las diluciones correspondientes obteniendo concentraciones que oscilaban entre 0,3 y 0,5 ug/ml.

Los patrones internos fueron preparados homogeneizando dos cerebros enteros en 8 ml de HCl 0,01N. Del homogeneizado se toman cuatro alícuotas de 2 ml. A dos de ellas se les añadió 1 ml de solución estandar de 0,5 ug/ml y 0,1 ml de EDTA al 10% (patrones

internos), mientras que a los otros dos se les añadió 1 ml de HCl 0,01N y 0,1 ml de EDTA al 10% (problemas normales). Los cuatro problemas fueron sometidos al proceso de extracción descrito anteriormente. La recuperación fue medida frente a patrones de 0,5 ug/ml.

BASES PARA EL ENSAYO FLUOROMETRICO.

La fluorescencia es el fenómeno por el que una molécula, al absorber radiación, emite otra radiación de mayor longitud de onda. Así, un compuesto puede absorber radiación de la región ultravioleta y emitir luz visible. Este incremento de longitud de onda se denomina desplazamiento de Stokes. El proceso de fluorescencia se caracteriza por dos espectros: el de absorción y el de fluorescencia.

Cuando un quantum de luz golpea a una molécula, es absorbido aproximadamente en 10^{-14} sg. Si la energía de la molécula aumenta lo suficiente, se llevará a cabo una transición electrónica hacia un estado electrónico superior. Estas transiciones son las responsables del espectro de absorción ultravioleta. Este estado excitado persiste por un tiempo finito, del orden de 10^{-8} a 10^{-9} sg. Durante este intervalo, cualquier energía absorbida en exceso, se disipa rápidamente. Pasado este corto lapso de tiempo, el cual es característico para la molécula, los electrones regresan al nivel electrónico normal.

La transición del estado singlete excitado a uno de los niveles vibracionales dentro del estado normal, lleva a una liberación de energía y hace surgir la emisión fluorescente. El espectro de la emisión fluorescente aparecerá en el lado de la frecuencia más baja que la banda de absorción.

La distribución espectral de la radiación de fluorescencia es una característica física absoluta para una sustancia determinada y es muy útil en determinaciones cualitativas. La intensidad de la emisión de fluorescencia a una determinada longitud de onda es proporcional a la concentración de la molécula, por lo que ofrece grandes posibilidades analíticas cuantitativas.

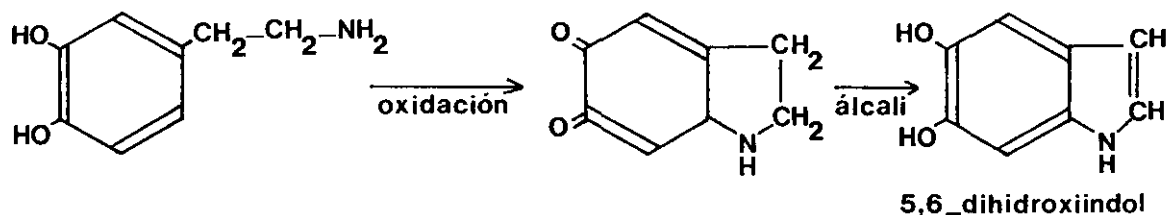
La fluorescencia se puede ver afectada por diversos factores, entre los cuales hay que tener presente las sustancias absorbentes y no fluorescentes, el medio físico circundante, el tiempo, el pH, agentes amortiguadores, etc.

Tanto el espectro de excitación como el espectro de emisión deben determinarse antes de hacer cualquier tipo de determinación experimental.

ENSAYO FLUORIMETRICO DE DOPAMINA (DA).

Método del dihidroxiindol: Introducido por Carlsson y Waldeck (1958) y usado para medir DA en cerebro. Este método está basado en la oxidación controlada de DA a un cromo-derivado, el cual su-

fre un reagrupamiento molecular en una solución fuertemente alcalina, en presencia de un agente reductor y estabilizante.



Carlsson y Waldeck establecen que acidificando la solución después de la formación del fluoróforo, había una fluorescencia muy intensa a longitudes de onda mucho más bajas que la A y NA.

El método hidroxindol para la DA introducido por Carlsson usaba solución de iodo como oxidante y sulfito como agente reductor y estabilizante, con una acidificación final. Este constituyó el primer y más convincente tipo de ensayo fluorimétrico para la DA con un alto grado, no sólo de especificidad, sino también de sensibilidad.

El método utilizado en el presente trabajo es el descrito por Welch y Welch (1969) para la determinación fluorimétrica de DA en cerebro. Este método está basado en el descrito por Carlsson y Waldeck en 1958, con algunas modificaciones.

MATERIAL:

Tampón acetato 2M, pH 6,8.

Solución de iodo 0,1N, mantenida a la temperatura de 6-7°C.

Solución sulfito alcalino/EDTA.

Reactivo HCl/ácido acético. HCl concentrado y ácido acético glacial fueron mezclados en la proporción 1:1.

Patrón de dopamina (3-hidroxitiramina) de 1 ug/ml.

H₂O destilada.

Todos los reactivos y el agua destilada fueron guardados en frascos de vidrio provistos de tapones del ismo material.

TECNICA:

El proceso lleva consigo tres etapas:

- 1) Oxidación de la muestra con iodo a un pH alrededor de 6,5.
- 2) Reestructuración intramolecular, por adición de una solución alcalina de sulfito sódico, en la que el sulfito sódico actúa como agente reductor para detener la oxidación y como protector del compuesto fluorescente formado en medio alcalino.
- 3) Ajuste del pH a 3,8. Este paso tiene por misión el aumento de la fluorescencia. Para la acidificación final se ha utilizado tanto el ácido acético (Carlsson y Waldeck, 1958) como el ácido clorhídrico (Anton y Sayre, 1964; Fleming y col., 1965).

Welch y Welch propusieron la utilización de una mezcla isovolumétrica de HCl y acético que permite conseguir una variabilidad pequeña en el pH de las muestras, con poca cantidad de ácido. Esto es de gran importancia, debido a que un pequeño cambio en el pH, va a hacer variar notablemente la intensidad de la fluorescencia.

El desarrollo de la fluorescencia es lento. Para acelerarlo se pueden introducir las muestras en un baño de agua hirviendo durante 45 minutos, ya que se comprobó que daba mayor fluorescencia.

que si se irradiaba. Pasado este tiempo, se sacan las muestras y se dejan enfriar. A continuación se leen a una longitud de onda de excitación y emisión respectivamente de 335/380.

El fluoróforo fue estable unas horas, pero normalmente la lectura se hizo a continuación. Este método permite detectar cantidades de DA superiores a 10 ng.

En el presente ensayo se emplean:

Blancos de oxidación (B_{r1}). Nos dan la fluorescencia debida a los reactivos.

Patrones externos (ST_{r1}) a los que se añaden 500 ng de DA. Sirven como referencia en la lectura espectrofluorimétrica.

Tubos de oxidación por cada muestra.

Uno experimental, M, otro el patrón interno en el que se añaden además de la muestra 500 ng de DA, y otro el blanco de tejido (B_t) donde se impide la oxidación de la muestra por adición de los reactivos en orden inverso.

El protocolo del ensayo fluorimétrico se describe a continuación.

PROTOCOLO PARA LA DETERMINACION FLUORIMETRICA DE DOPAMINA

Welch y Welch, 1969

	B ₁₁	M	ST ₁₁	B ₁
DOPAMINA 1 ug/ml	-	-	0,5	-
Buffer acetato *	0,5	0,5	0,5	0,5
H ₂ O	1	1	1	1
Iodo 0,1N *	0,1	0,1	0,1	-
Sulfito alcalino/EDTA	-	-	-	0,2
	ESPERAR 3 - 4 MINUTOS			
Sulfito alcalino/EDTA *	0,2	0,2	0,2	-
Iodo 0,1N	-	-	-	0,1
	ESPERAR 3 - 4 MINUTOS			
HCl/ácido acético *	0,25	0,25	0,25	0,25

Baño de agua hirviendo durante 45 minutos.

Enfriar a temperatura ambiente.

Leer a 335/380 nm.

Volúmenes expresados en ml.

* Agitar mecánicamente

La valoración se efectuó en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer 150, equipado con cubetas de cuarzo.

Las constantes fueron :

longitud de onda de excitación -----> 335 nm.

longitud de onda de emisión -----> 380 nm.

sensibilidad -----> 3

multiplicador -----> 10

Este método permite detectar cantidades de dopamina superiores a 10 ng.

2.2.3. DETERMINACION DE TRANSAMINASAS: ASAT Y ALAT.

El test de transaminasas correspondió a los enzimas : glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) o aspartato transaminasa (ASAT) y glutamato-piruvato transaminasa (GPT) o alanina transaminasa (ALAT).

Se extrajo 1 ml de sangre de la vena yugular, con aguja y jeringa estériles, previamente heparinizadas para evitar la coagulación. Se recogió en tubos con 1000 unidades de heparina, y se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, con objeto de separar el plasma. Una vez extraído este, se congeló a -20°C, situación en la que se mantuvo hasta el momento de la determinación.

Para compensar la extracción sanguínea y pérdidas en la cirugía se suministró 1 ml de solución isotónica (NaCl 9%).

Las transaminasas catalizan la transferencia del grupo amino del aspartato (GOT) o de la alanina (GPT) al α -cetoglutarato. El ce-to-ácido formado, oxalacético o pirúvico respectivamente, en presencia de 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNFH) da la hidrazona correspondiente con una coloración mensurable (Reitman y Frankel, 1957).

Una unidad Wróblewski (UW) de GOT o GPT se define como la cantidad de enzima que forma $4,82 \times 10^{-4}$ umol de glutamato/mn a 25°C. Esta unidad se la conoce también como la unidad Reitman-Frankel. Para convertir las UW a unidades internacionales (U/l), se multiplica por 0,482.

Las muestras se analizaron en un autoanalizador SMAC-20 (Technicon).

2.2.4. ESTUDIO MORFOLOGICO.

Para preservar las estructuras de los tejidos se procedió a la inmediata fijación del hígado y riñón, una vez extraídos del cuerpo del animal.

La finalidad de una buena fijación consiste en detener o interrumpir las alteraciones postmortem de los tejidos y estabilizar la organización celular, evitando de esta manera posibles alteraciones y modificaciones.

Los fijadores hacen insolubles los compuestos celulares, precipitando a las proteínas y otros compuestos, evitando de esta manera cambios que produzcan imágenes no superponibles a la realidad viva del tejido.

Como sustancia química fijadora se utilizó el formol al 10% neutralizado a pH=7,4, por considerarla la más apropiada para los métodos de tinción llevados a cabo.

Los órganos permanecieron en el líquido fijador de 5 a 7 días, al cabo de los cuales, se procedió a su inclusión en parafina.

El proceso de parafinado fue el siguiente :

- Se extrajo el órgano del fijador y se le lavó en agua corriente hasta que no desprendiera olor (de media hora a una hora).
- Se trató al órgano con alcoholes de concentración creciente (alcohol 40º, alcohol 60º, alcohol 80º, en cada uno de ellos durante 10 minutos; dos baños en alcohol de 96º, el primero de 30 minutos y el 2º de 60 minutos; dos baños en alcohol de 100º, de 60 minutos cada uno) y dos baños en tolueno, el primero de dos minutos y el segundo de tres minutos, y a continuación, se les sometió a tres baños de parafina de gradación creciente, cada uno de los cuales fue de tres horas, por considerarse que este tiempo era suficiente para que la parafina penetrara en el órgano impregnándolo.
- A continuación se procedió a realizar los bloques de parafina con el órgano incluido.

Los bloques se cortaron en un microtomo para microscopía óptica, marca ERMA, modelo 422 con una cuchilla plana a 5-6 micras de grosor.

Una vez cortados los bloques y colocados los cortes resultantes sobre portas albúmico-glicerados, se dejaron en una estufa a 37ºC durante 24 horas, al cabo de las cuales se procedió al tratamiento para su tinción.

En primer lugar se procedió al HIDRATADO de los cortes, para lo cual se sometió a los cortes a dos baños de xilol de 45 minutos cada uno, y a continuación, a baños sucesivos de 10 minutos cada uno, con alcoholes de concentración decreciente (100º, 96º y 50º), para finalizar con un baño de agua.

Una vez finalizada la hidratación se procedió a la TINCIÓN de los cortes con las técnicas histoquímicas utilizadas por nosotros para la visualización de los efectos producidos por el lindano (Kühnel, 1987 y Fawcett, 1989).

Las técnicas empleadas fueron :

- HEMATOXILINA-EOSINA.

Técnica de amplio espectro y de uso general que se utiliza para distinguir estructuras acidófilas y estructuras basófilas.

La hematoxilina utilizada fue la de Groat.

Los cortes fueron sometidos durante cinco minutos a la solución de hematoxilina, se lavaron en agua a continuación y se sometieron a la acción de la Eosina durante 30 segundos, lavados de nuevo, deshidratados y montados.

- SUDAN IV.

Método empleado para la observación de lípidos. Es el método más adecuado para tejido adiposo y para la detección de células grasas aisladas.

Los cortes se pusieron en etilen-glicol entre tres y cinco minutos y se realizó un cambio. A continuación se sometieron a una primera tinción de cinco minutos con dos cambios, se diferenciaron en glicol-agua durante cinco minutos y se lavaron en agua destilada. Una segunda tinción se realizó con hematoxilina durante cinco minutos, posteriormente lavados, deshidratados y montados.

Una vez teñidos los cortes, y antes de ser montados con DPX, fueron DESHIDRATADOS, se les trató con baños de alcoholes de dos minutos cada uno (96º y 100º), y con una mezcla al 50% de xilol-alcohol 100º, y por último con un baño de xilol.

A continuación se montaron y se observaron al microscopio óptico.

Para finalizar se realizaron fotografías de los cortes teñidos mediante un fotomicroscopio ZEISS KF2 con una cámara adaptable MC63A. Las microfotografías fueron realizadas a distintos aumentos (x166, x666, x1665).

2.2.5. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS.

Para el tratamiento estadístico de los datos se ha seguido el método descrito por Sokal y Rohlf en "Biometry", 2ª ed., Ed. W.H. Freeman and Co., 1981, para el análisis de la varianza, así como el test estadístico de comparación de medias propuesto por J.S.

Milton y J.O. Tsokos en "Statistic Methods in the Biological and Health Sciences", McGraw-Hill International Book Company, 1983.

Para la comparación de medias se utilizó la prueba de la t de Student. La aplicación de esta prueba es especialmente útil en el caso de comparar dos muestras de tamaño pequeño, cuando no se conoce la varianza de la población y por tanto tiene que ser estimada a partir de los datos de la muestra. El método se basa en la comparación de la diferencia entre dos medias con la desviación típica de esa diferencia.

Como test estadístico de comparación de medias, se utilizó:

$$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s_p^2 (1/n_1 + 1/n_2)}} = T_{n_1 + n_2 - 2}$$

\bar{x}_1 = media de la población 1. \bar{x}_2 = media de la población 2.

n_1 = número de elementos de la población 1.

n_2 = número de elementos de la población 2.

T_t = valor de t de Student para $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

s_p^2 = varianza conjunta (Pooled Variance). Sean s_1^2 y s_2^2 las varianzas muestrales de las poblaciones de clase n_1 y n_2 respectivamente. La varianza conjunta viene dada por :

$$\underline{s_p^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Si existen diferencias significativas entre las varianzas de las poblaciones cuyas medias queremos comparar, no es apropiada la

utilización de la varianza conjunta. Podemos comparar medias de poblaciones con varianzas diferentes usando una aproximación a T, modificando la variable a :

$$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}}$$

Este cambio exige una nueva estimación del número de grados de libertad a partir de los datos. Se han sugerido varios métodos para llevar a cabo dicha estimación. Conforme al procedimiento de Smith y Satterwaite, γ , el número de grados de libertad, es:

$$\gamma = \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1-1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2-1}}$$

El valor de γ podría no ser entero, en cuyo caso sería preciso redondearlo al número entero inmediatamente anterior.

Para determinar si las varianzas de las poblaciones son iguales, se realiza un contraste de hipótesis por ambos lados, utilizando como estadístico del test el valor de s_1^2/s_2^2 . El número de grados de libertad utilizados para calcular los valores críticos en la distribución de F de Fisher son $\gamma_1 = n_1 - 1$ y $\gamma_2 = n_2 - 1$.

El nivel mínimo de significación escogido fue el correspondiente al 5%. Es decir, que sólo se consideraban significativas las diferencias entre dos medias si el valor calculado de t correspondía a una probabilidad $p < 0,05$. Operando así, cuando decimos que existen diferencias significativas entre dos medias, la probabilidad de equivocarnos es menor del 5%.

Los valores de T y F utilizados son los que aparecen en las tablas de W.H. Beyer (Ed.), en "CRC Handbook of Tables for Probability and Statics", 2ª edición, p. 283 (Distribución acumulativa de F) y p. 294 (Distribución acumulativa de F).

RESULTADOS

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se presentan en tablas, figuras y microfotografías respectivamente de las dosis aguda y subcrónica, ordenadas a continuación de los diferentes apartados.

Se han distribuido en seis grupos de estudio : 1) Neurotoxicidad de los animales, 2) Variaciones en el peso de los animales y en los índices organosomáticos, 3) Acumulación de lindano en órganos, 4) Variaciones en los niveles de dopamina en diencéfalo, 5) Fluctuaciones en las transaminasas en suero y 6) Alteraciones morfológicas en los tejidos investigados (hígado y riñón).

3.1. NEUROTOXICIDAD.

DOSIS AGUDA : La figura I muestra las pautas de comportamiento de todos los animales tras la administración del lindano. Después de exhibir la pauta de comportamiento de tipo 5, murieron dos animales (un macho y una hembra).

Las figuras II y III, representan la frecuencia de los tipos de pautas observados en los animales experimentales (machos y hembras) y el porcentaje de aparición de estos síntomas con la dosis aguda.

La tabla nº1 refleja el número de animales que sufrieron los diferentes tipos de pautas.

Atendiendo al sexo, se aprecian diferencias en la respuesta a la intoxicación (figura III). Las hembras muestran una mayor sensibilidad al lindano, como evidencia el que ninguna de ellas haya sido asintomática. Un alto número de animales, 62,5% de machos y 100% de hembras, presentaron al menos signos de estimulación autónoma a consecuencia de la administración de lindano. Hubo animales, tanto machos como hembras, que sufrieron espasmos en la misma proporción, el 50%. Otro tipo de ataque, el efecto boxeador, fue algo más marcado en el caso de las hembras, 37,5% frente al 25% en el caso de los machos mientras que el 62,5% de las hembras sufrieron convulsiones por un 25% de los machos.

También se apreciaron diferencias en los tipos de pautas de comportamiento respecto al sexo. Solamente animales machos del tipo 0 (asintomáticos), tuvieron este tipo de comportamiento. Así como fue mayor la proporción del tipo de pauta 2 para los machos, mientras que en la pauta de tipo 5 (ataques más fuertes y con convulsiones) los machos presentaron un 25% menos de proporción que las hembras (25% frente al 50%). En la figura III se refleja y la tabla nº1 resume los resultados en valores absolutos.

Ninguno de los animales experimentales presentaba sintomatología aparente, 12 horas después de la administración de la dosis y hasta el final de la experimentación. Los controles no exhibieron ninguna sintomatología, tras administrarles el vehículo.

NEUROTOXICIDAD

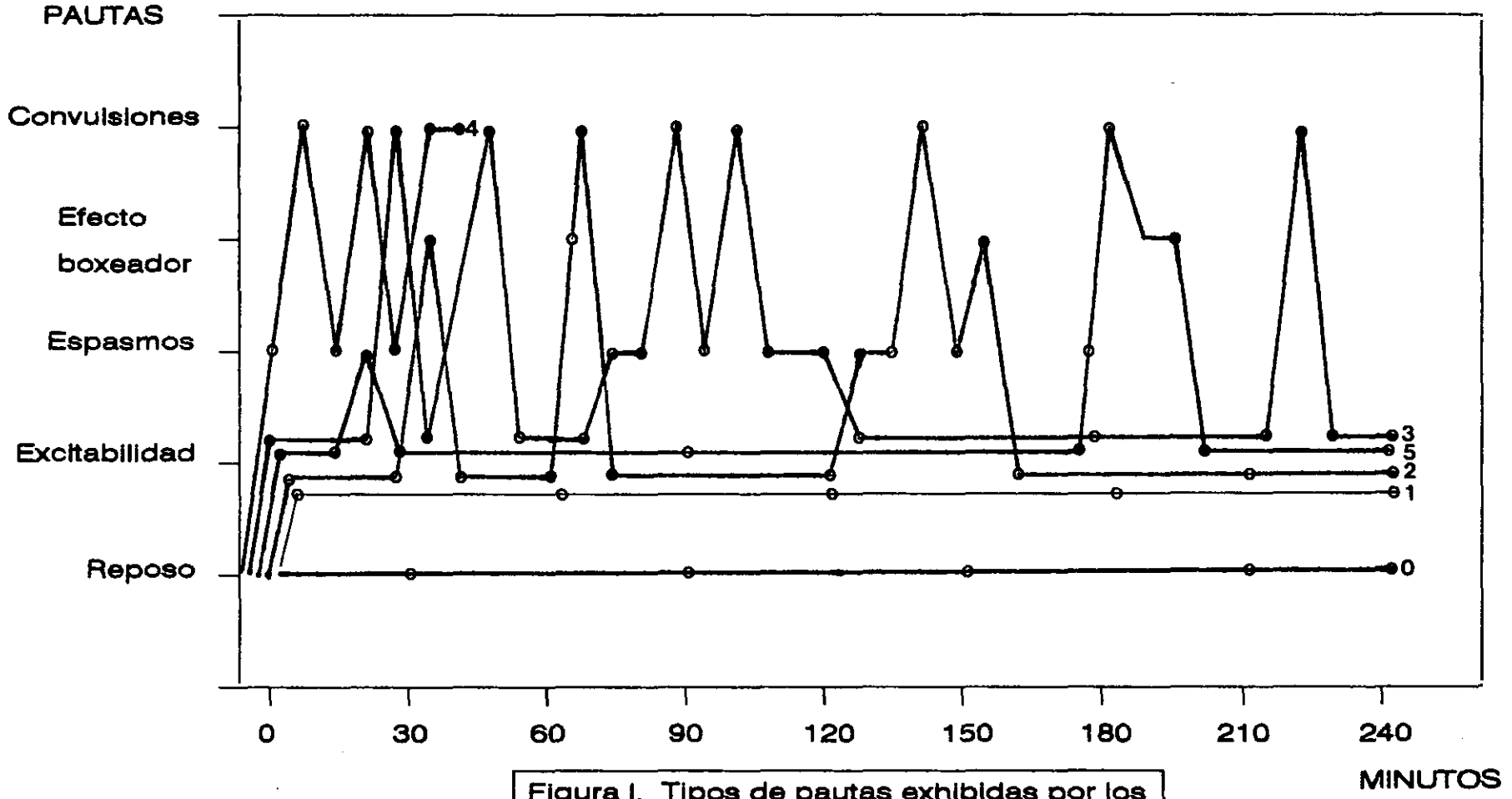
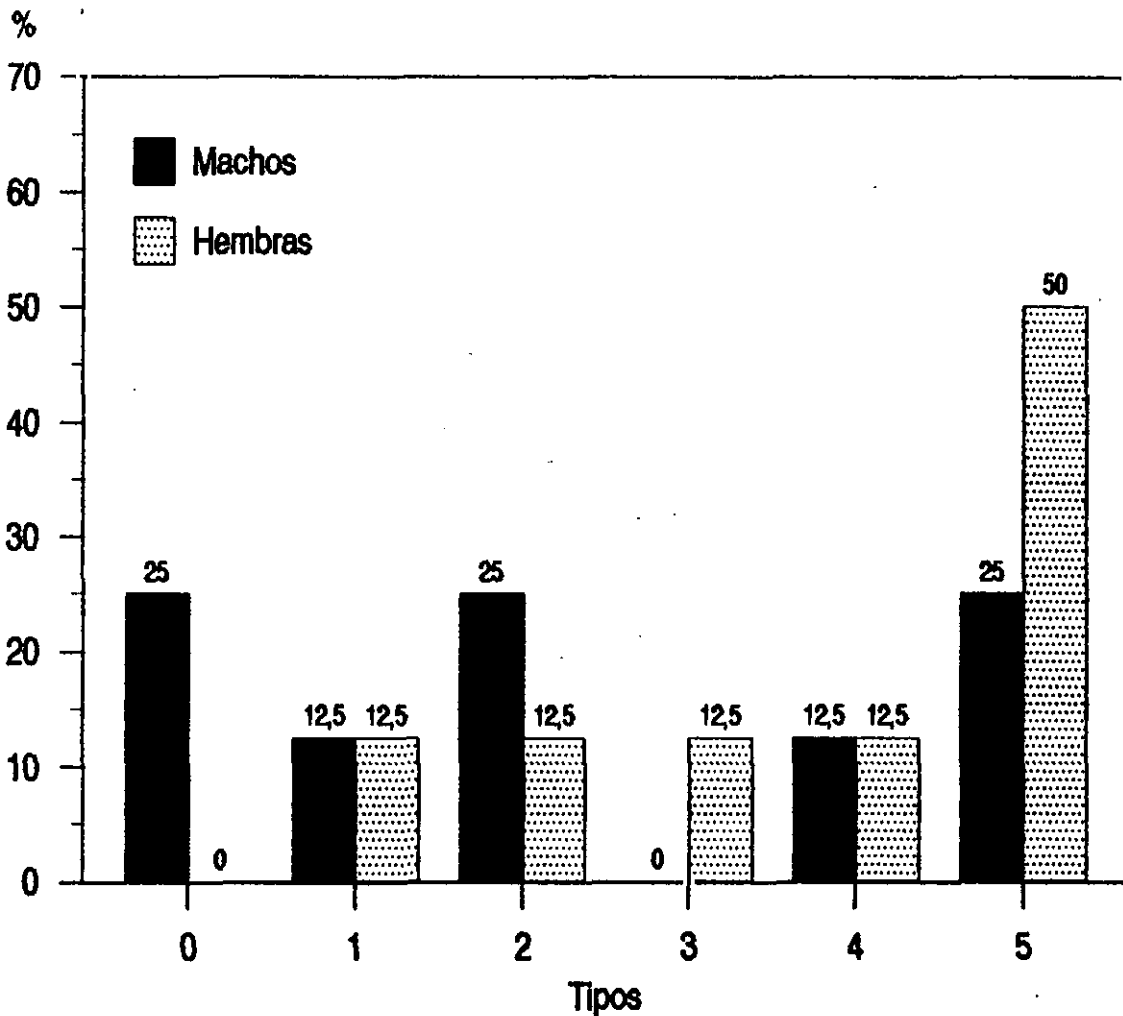


Figura 1. Tipos de pautas exhibidas por los animales con la dosis aguda.

NEUROTOXICIDAD



Tipo 0 = Asintomáticos. Tipo 1 = Animales excitados.

Tipo 2 = Un solo ataque, dentro las primeras 12 horas.

Tipo 3 = Ataques continuos y reiterados entre los primeros 20 y 80 mn.

Tipo 4 = Ataques espaciados en las cuatro primeras horas, con espasmos.

Tipo 5 = Ataques espaciados en las cuatro primeras horas, con convulsiones.

Figura II. Frecuencia de los tipos de pautas observados en los animales experimentales con la dosis aguda.

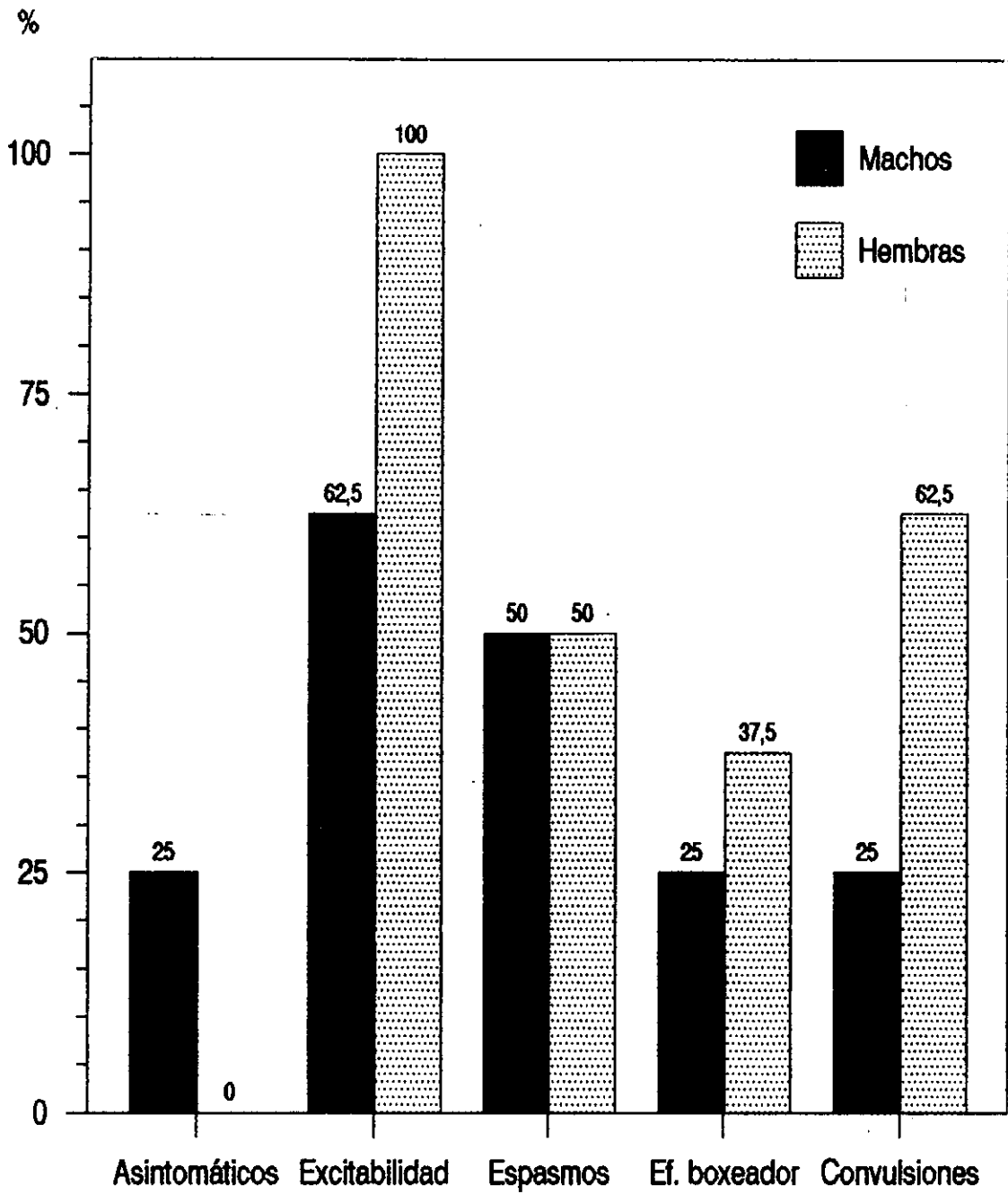
SINTOMATOLOGIA

Figura III. Porcentaje de aparición de los diversos síntomas de intoxicación aguda por lindano.

NEUROTOXICIDAD

	MACHOS		HEMBRAS	
	n	%	n	%
Tipo 0	2	25	-	-
Tipo 1	1	12,5	1	12,5
Tipo 2	2	25	1	12,5
Tipo 3	-	-	1	12,5
Tipo 4	1	12,5	1	12,5
Tipo 5	2	25	4	50

n = 16 muertos = 2 (1 macho y 1 hembra) (tipo 5).

<p>Tabla nº 1. Distribución de animales que sufrieron los distintos tipos de pautas con la dosis aguda.</p>

DOSIS SUBCRONICA : No se observó incidencia alguna durante todo el periodo de experimentación.

3.2. VARIACIONES EN EL PESO DE LOS ANIMALES.

DOSIS AGUDA : Las tablas nº 2 y nº3, reflejan los valores en cuanto a pesos iniciales y finales de los animales, así como de los órganos (hígado y riñón), que recibieron la dosis aguda. Se comprueba que existen diferencias en cuanto al sexo, en la tabla nº4 y figura IV, con un nivel de significación del 99,95%, tanto en controles como en experimentales de la dosis aguda.

DOSIS SUBCRONICA : Las tablas nº5 y nº6, reflejan los valores de los pesos iniciales y finales de los animales, y de los órganos (hígado y riñón) que recibieron la dosis subcrónica. La tabla nº7 y figura V corresponden como en la dosis aguda, a diferencias en relación al sexo, pero mientras que las diferencias significativas para la dosis aguda es entre animales controles y experimentales del mismo sexo, en la dosis subcrónica, la diferencia es entre machos y hembras, tanto controles como experimentales.

La tabla nº8 y la figura VI muestran las diferencias en el peso total entre controles y experimentales en la dosis aguda con diferencias significativas ($p < 0,005$) y sin diferencias significativas en la dosis subcrónica.

**DOSIS AGUDA
ANIMALES MACHOS**

CONTROLES				EXPERIMENTALES			
P. Inicial	P. Final	P. Hígado	P. Riñón	P. Inicial	P. Final	P. Hígado	P. Riñón
237	284	15,7020	2,1626	224	277	13,9402	2,2187
210	306	16,6106	2,1396	231	270	14,0355	2,7531
216	315	15,2166	2,0373	232	281	13,4717	2,1782
228	315	12,5361	2,6021	245	300	13,3203	2,1596
233	378	15,4673	3,0664	221	280	15,1695	2,3389
221	358	13,7300	2,8319	225	297	15,4588	2,0327
236	348	16,7488	2,3878	218	+	+	+
227	321	12,1515	3,0274	240	348	13,0058	2,8824

peso en g.

Tabla n° 2. Pesos iniciales, finales y de los
órganos de los animales machos utilizados
para la dosis aguda.

**DOSIS AGUDA
ANIMALES HEMBRAS**

CONTROLES				EXPERIMENTALES			
P. Inicial	P. Final	P. Hígado	P. Riñón	P. Inicial	P. Final	P. Hígado	P. Riñón
202	225	8,2594	+	209	237	9,7767	1,5741
194	229	9,0718	1,5720	215	+	+	+
200	238	10,2654	1,5026	228	256	9,6255	1,7874
221	264	11,2000	2,0700	209	234	7,3991	1,3424
224	253	10,0800	1,8900	209	240	6,9200	1,5600
218	261	10,1156	1,6296	200	241	8,1383	1,9348
221	275	10,7622	2,0073	228	258	10,1671	1,5220
226	284	11,4692	2,0612	207	232	9,5006	1,7956

peso en g.

Tabla nº 3. Pesos iniciales, finales y de los
órganos de los animales hembras utilizados
para la dosis aguda.

DOSIS AGUDA

	MACHOS	HEMBRAS
CONTROLES	n=7	n=7
(g)	100,714 ± 11,448	42,85 ± 3,588
EXPERIMENTALES	p<0.05 n=7	p<0.05 n=7
(g)	62,1428 ± 8,5258	29,9047 ± 2,0669

Tabla n- 4. Incremento medio ± e.s. de peso total en machos y hembras de la dosis aguda.

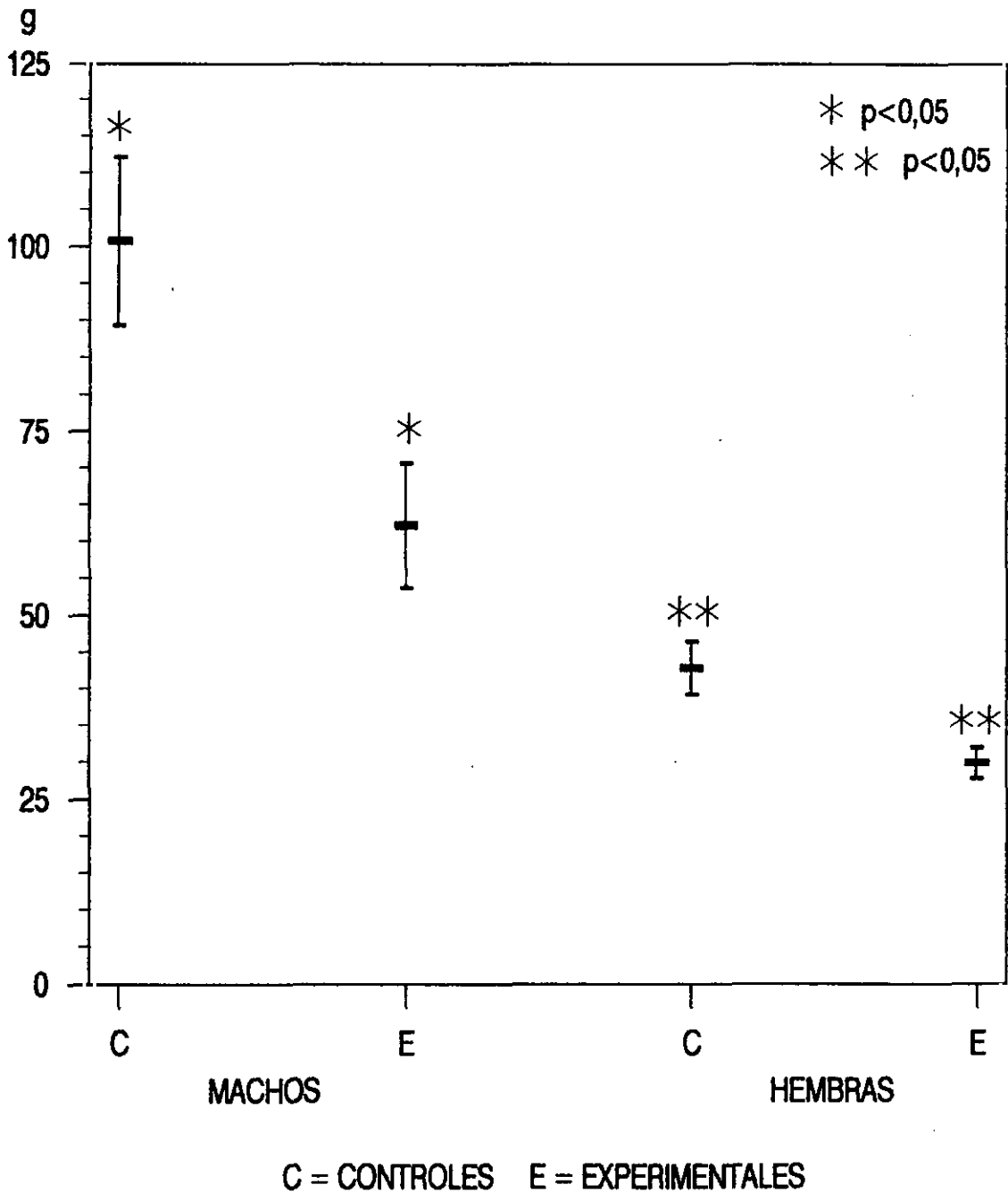
DOSIS AGUDA

Figura IV. Valores medios \pm e.s. del incremento de peso total en la dosis aguda.

**DOSIS SUBCRONICA
ANIMALES MACHOS**

CONTROLES				EXPERIMENTALES			
P. Inicial	P. Final	P. Hígado	P. Riñón	P. Inicial	P. Final	P. Hígado	P. Riñón
231	359	13,7921	2,6600	226	396	16,9354	3,0264
246	416	17,9785	3,4369	218	416	19,3855	3,1008
252	409	16,2599	2,7040	226	396	18,7624	3,0612
246	401	15,8650	3,1867	223	390	14,0226	3,3075
228	374	14,8724	2,9687	254	407	16,1922	3,3831
232	410	15,0978	3,4968	252	407	17,8325	3,6413
233	487	14,9461	3,1403	245	406	14,7772	3,8986
245	497	15,1304	3,1840	259	442	16,0057	3,0084

peso en g.

Tabla n° 5. Pesos iniciales, finales y de los
órganos de los animales machos utilizados
para la dosis subcrónica.

**DOSIS SUBCRONICA
ANIMALES HEMBRAS**

CONTROLES				EXPERIMENTALES			
P. Inicial	P. Final	P. Hígado	P. Riñón	P. Inicial	P. Final	P. Hígado	P. Riñón
195	258	8,6320	2,1763	231	266	10,1483	2,3178
204	286	9,8738	2,2033	217	252	9,3595	2,2063
192	234	7,8738	1,7390	227	260	8,6507	2,3511
199	242	9,2845	1,9151	244	284	10,4247	2,3317
226	251	7,2380	1,9827	238	288	11,0684	2,4608
225	277	7,9104	2,1571	223	259	8,8963	1,8370
218	262	9,1121	2,0488	215	275	9,5380	2,0524
227	262	8,5163	2,0119	219	251	9,0212	1,8574

peso en g.

Tabla nº 6. Pesos iniciales, finales y de los
órganos de los animales hembras utilizados
para la dosis subcrónica.

DOSIS SUBCRONICA

	MACHOS	HEMBRAS
CONTROLES	n=8	p<0,005 n=8
(g)	180 ± 15,7014	48,25 ± 6,2271
EXPERIMENTALES	n=8	p<0,005 n=8
(g)	169,625 ± 5,271	40,125 ± 3,4817

<p>Tabla nº 7. Incremento medio ± e.s. de peso total en machos y hembras de la dosis subcrónica.</p>
--

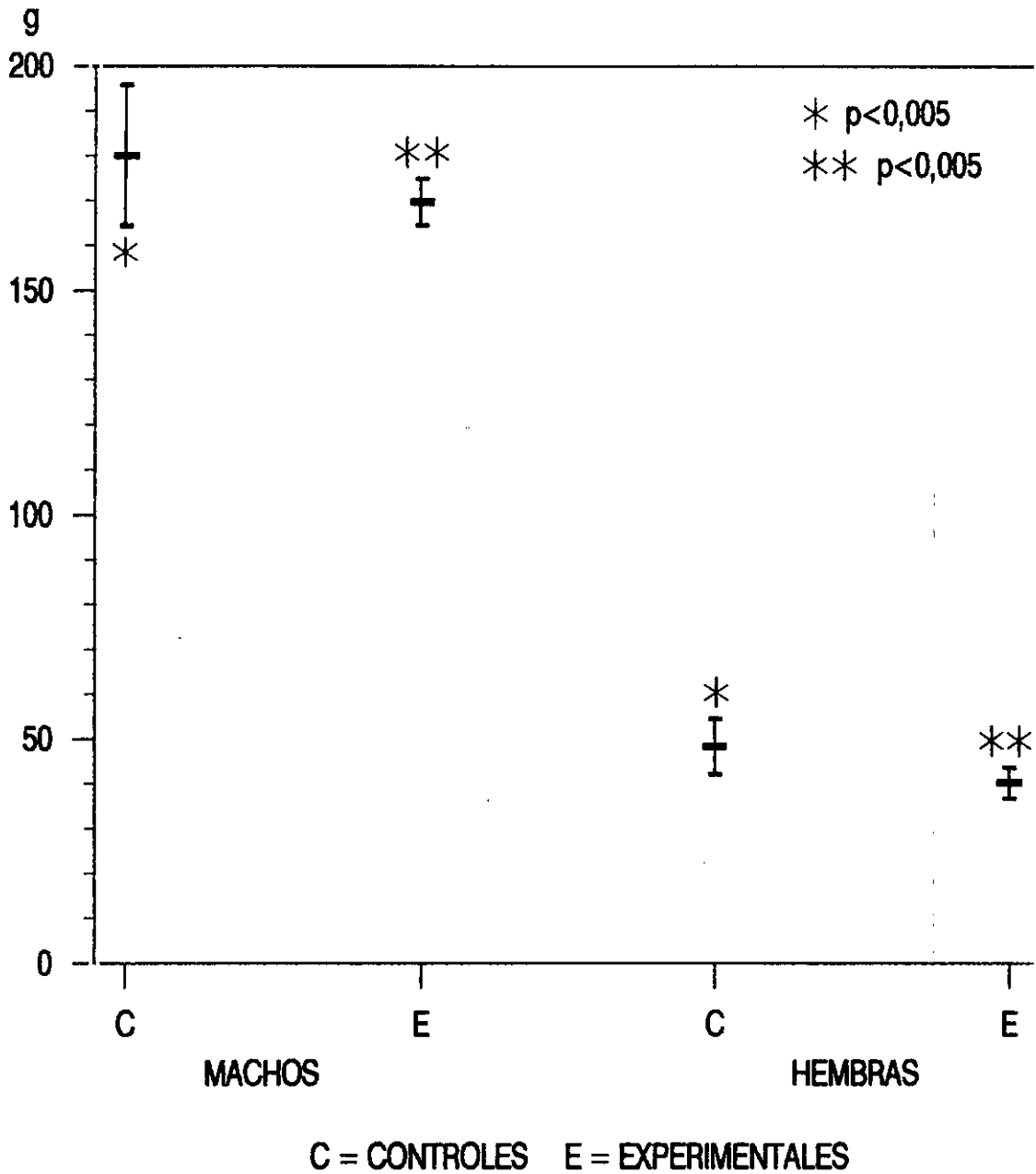
DOSIS SUBCRONICA

Figura V. Valores medios \pm e.s. del incremento de peso total en la dosis subcrónica.

**DIFERENCIAS EN EL INCREMENTO
DE PESO TOTAL**

	DOSIS AGUDA	DOSIS SUBCRONICA
CONTROLES	n=14	n=16
(g)	71,78 ± 9,7856	114,125 ± 19,0811
EXPERIMENTALES	p<0.005 n=14	n=16
(g)	45,9285 ± 6,1631	104,875 ± 16,9945

Tabla nº 8. Diferencias medias ± e.s. en el incremento de peso total entre dosis aguda y dosis subcrónica.

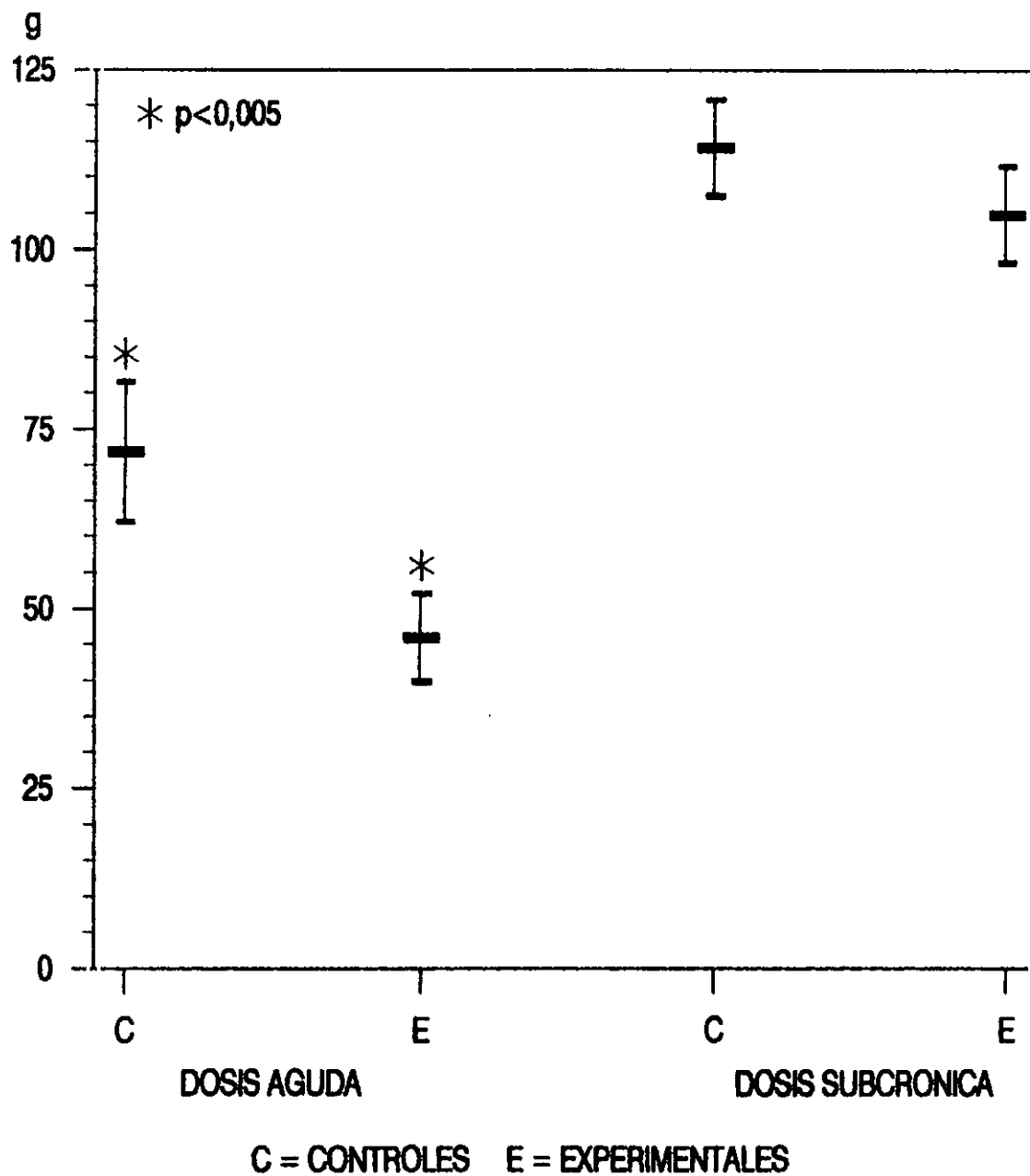
INCREMENTO DE PESO TOTAL

Figura VI. Valores medios \pm e.s. del incremento de peso en la dosis aguda y dosis subcrónica.

DOSIS AGUDA

		MACHOS	HEMBRAS
		n=7	n=7
CONTROLES			
(g)	Hígado	0,0449 ± 0,0025	0,0404 ± 0,0006
	Riñón	0,0078 ± 0,0003	0,0069 ± 0,0002
EXPERIMENTALES		n=7	n=7
(g)	Hígado	0,0482 ± 0,0020	0,0361 ± 0,0017
	Riñón	0,0080 ± 0,0003	0,0067 ± 0,0003

<p>Tabla n° 9. Índice organosomático: peso del hígado/peso total peso del riñón/peso total.</p>

DOSIS SUBCRONICA

		MACHOS	HEMBRAS
CONTROLES		n=8	n=8
(g)	Hígado	0,0373 ± 0,0015	0,0330 ± 0,0010
	Riñón	0,0074 ± 0,00028	0,0077 ± 0,00009
EXPERIMENTALES		n=8	n=8
(g)	Hígado	0,0411 ± 0,0015	0,0360 ± 0,0006
	Riñón	0,0081 ± 0,0003	0,0081 ± 0,00024

<p>Tabla nº 10. Índice organosomático: peso del hígado/peso total peso del riñón/peso total.</p>
--

INDICE ORGANOSOMATICO

	DOSIS AGUDA	DOSIS SUBCRONICA
CONTROLES	n=14	n=16
(g)	0,0426 ± 0,0014	0,0352 ± 0,0010
	0,0074 ± 0,00022	0,0076 ± 0,0019
EXPERIMENTALES	n=14	n=16
(g)	0,0422 ± 0,0020	0,0385 ± 0,0010
	0,0074 ± 0,0003	0,0081 ± 0,00015

Tabla nº 11. Peso Hígado/Peso Total Peso Riñón/Peso Total
--

Las tablas nº9 y nº10 reflejan los índices organosomáticos (peso del hígado/peso total y peso del riñón/peso total) por sexos, donde se observa que no hay diferencias significativas, así como la tabla nº11 muestra la relación entre el peso del hígado y del riñón (controles y experimentales) con respecto al peso del cuerpo en la dosis aguda y subcrónica.

3.3. ACUMULACION DE LINDANO EN ORGANOS.

DOSIS AGUDA : Las tablas nº12 y nº13 muestran la acumulación del lindano en ppm en órganos (cerebro, hígado y riñón) de machos y hembras, y la tabla nº14, la acumulación media + error standard y el nivel de significación en la dosis aguda. La figura VII re-ja la media + e.s. y las diferencias significativas.

La tabla nº15 y figura VIII, muestran la acumulación media + e.s. y las diferencias significativas entre órganos (cerebro, hígado y riñón) de controles y experimentales. La tabla nº16 muestra el nivel de significación entre los órganos de animales experimentales para la dosis aguda.

Dos órganos de los animales controles (un hígado y un riñón) contenían una cantidad inicial de lindano. No es de extrañar dada la ubicuidad de este compuesto.

DOSIS SUBCRONICA : Las tablas nº17 y nº18 muestran la acumulación del pesticida en cerebro, hígado y riñón en ppm de machos

**DOSIS AGUDA
ANIMALES MACHOS**

CONTROLES			EXPERIMENTALES		
Cerebro	Hígado	Riñón	Cerebro	Hígado	Riñón
0	0	0,0000	0,1573	0,2469	2,3831
0	0	0,0000	0,0876	0,1667	2,7641
0	0	0,0000	0,0925	0,1333	2,5976
0	0	0,0000	0,3580	2,0000	1,6307
0	0	0,0000	0,4280	0,0916	2,4370
0	0	0,0000	0,9272	0,1000	3,1198
0	0	0,0384	0,0207	0,1168	2,8915
0	0	0,0000	+	+	+

ppm

n = 16 muertos = 1

**Tabla nº 12. Acumulación de lindano en
órganos de animales machos.**

**DOSIS AGUDA
ANIMALES HEMBRAS**

CONTROLES			EXPERIMENTALES		
Cerebro	Hígado	Riñón	Cerebro	Hígado	Riñón
0	0,0737		0,3780	0,4958	1,6412
0	0,0000	0,000	0,0365	0,2044	0,2808
0	0,0000	0,000	1,1634	0,2805	0,7849
0	0,0000	0,000	0,3945	0,3963	0,7712
0	0,0000	0,000	0,2396	0,1827	0,6279
0	0,0000	0,000	0,1726	0,2110	2,0710
0	0,0236	0,000	0,5212	0,3690	1,7183
0	0,0000	0,094	+	+	+

ppm

n = 16 muertos = 1

**Tabla n° 13. Acumulación de lindano en órganos
de animales hembras.**

DOSIS AGUDA

	CEREBRO	HIGADO	RIÑON
MACHOS	n=7	n=7	n=7
(ppm)	0,2959 ± 0,292	0,4079 ± 0,651	2,5462 ± 0,443
HEMBRAS	n=7	n=7	p<0,05 n=7
(ppm)	0,4151 ± 0,339	0,3071 ± 0,108	1,1264 ± 0,6213

<p>Tabla n- 14. Acumulación media ± e.s. por sexos de lindano en órganos.</p>

DOSIS AGUDA

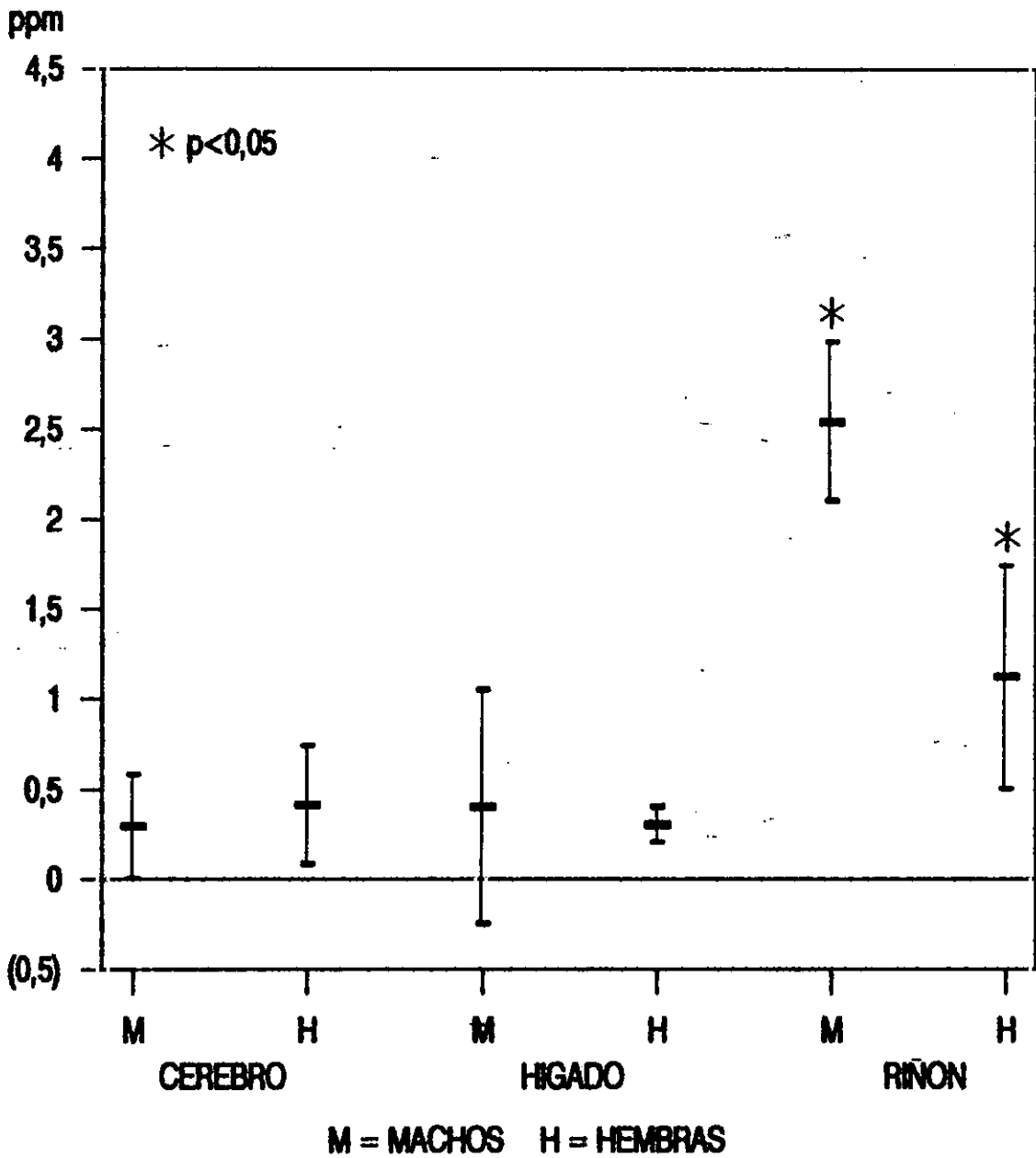


Figura VII. Acumulación media \pm e.s. de lindano en órganos en la dosis aguda.

DOSIS AGUDA

	CEREBRO	HIGADO	RIÑON
CONTROLES	n=14	n=14	n=14
(ppm)	0	0,0017 ± 0,0016	0,0068 ± 0,0065
EXPERIMENTALES	p<0.0005 n=14	p<0.025 n=14	p<0.0005 n=14
(ppm)	0,2840 ± 0,0649	0,3575 ± 0,1303	1,8370 ± 0,3726

animales muertos = 2

<p>Tabla n- 15. Acumulación media ± e.s. de lindano en órganos.</p>

DOSIS AGUDA

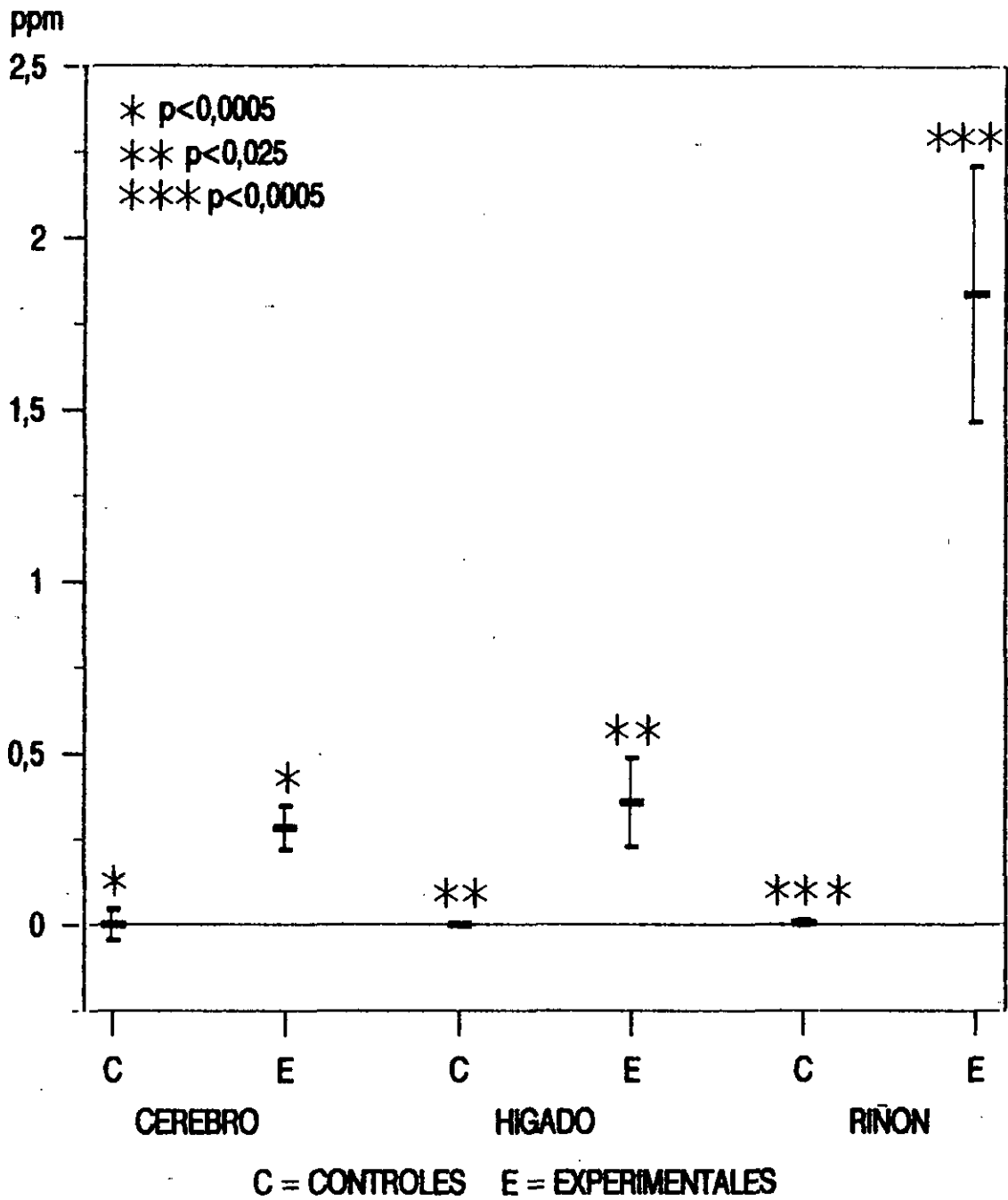


Figura VIII. Acumulación media \pm e.s. de lindano en órganos en la dosis aguda.

DOSIS AGUDA

	CEREBRO	HIGADO	RIÑON
CEREBRO	X	—	$p < 0,0005$
HIGADO	—	X	$p < 0,0005$
RIÑON	$p < 0,0005$	$p < 0,0005$	X

Tabla n- 16. Nivel de significación entre los órganos de animales experimentales.

**DOSIS SUBCRONICA
ANIMALES MACHOS**

CONTROLES			EXPERIMENTALES		
Cerebro	Hígado	Riñón	Cerebro	Hígado	Riñón
0	0,0000	0,0000	0,1608	0,2192	0,2708
0	0,0000	0,0000	0,1274	0,1988	1,2308
0	0,0000	0,0000	0,2984	0,8571	0,8986
0	0,0548	0,0707	0,1331	0,2573	0,7456
0	0,0000	0,0000	0,1360	0,1829	0,1172
0	0,0000	0,0000	0,1861	0,2703	0,5190
0	0,0000	0,0000	0,1489	0,2317	0,3988
0	0,0000	0,0553	0,1072	0,0955	0,0821

ppm

n = 16

Tabla n- 17. Acumulación de lindano en órganos.
en animales machos.

**DOSIS SUBCRONICA
ANIMALES HEMBRAS**

CONTROLES			EXPERIMENTALES		
Cerebro	Hígado	Riñón	Cerebro	Hígado	Riñón
0	0	0	0,1490	0,0439	1,8217
0	0	—	—	0,2236	1,6358
0	0	0	0,1023	0,1366	1,4712
0	0	0	0,1488	0,6530	1,6125
0	0	0	0,1389	0,6666	1,0139
0	0	0	0,3315	—	1,3651
0	0	0	0,3582	0,5102	0,9757
0	0	0	0,3561	0,4779	1,3367

ppm

n = 16 muestras sin analizar = 3

**Tabla n- 18. Acumulación de lindano en órganos
en animales hembras.**

DOSIS SUBCRONICA

	CEREBRO	HIGADO	RIÑON
MACHOS	n=7	n=7	n=8
(ppm)	0,1427 ± 0,023	0,3167 ± 0,222	0,5328 ± 0,375
HEMBRAS	n=7	n=7	n=8
(ppm)	0,2219 ± 0,111	0,3874 ± 0,232	0,5503 ± 0,374

<p>Tabla n- 19. Acumulación media ± e.s. por sexos de lindano en órganos.</p>

DOSIS SUBCRONICA

	CEREBRO	HIGADO	RIÑON
CONTROLES	n=15	n=15	n=15
(ppm)	0	0,0036 ± 0,0035	0,0085 ± 0,0054
EXPERIMENTALES	p<0,0005 n=15	p<0,0005 n=15	p<0,0005 n=15
(ppm)	0,1821 ± 0,0892	0,3349 ± 0,0619	0,4703 ± 0,0771

muestras sin analizar = 3

<p>Tabla n- 20. Acumulación media ± e.s. de lindano en órganos.</p>

DOSIS SUBCRONICA

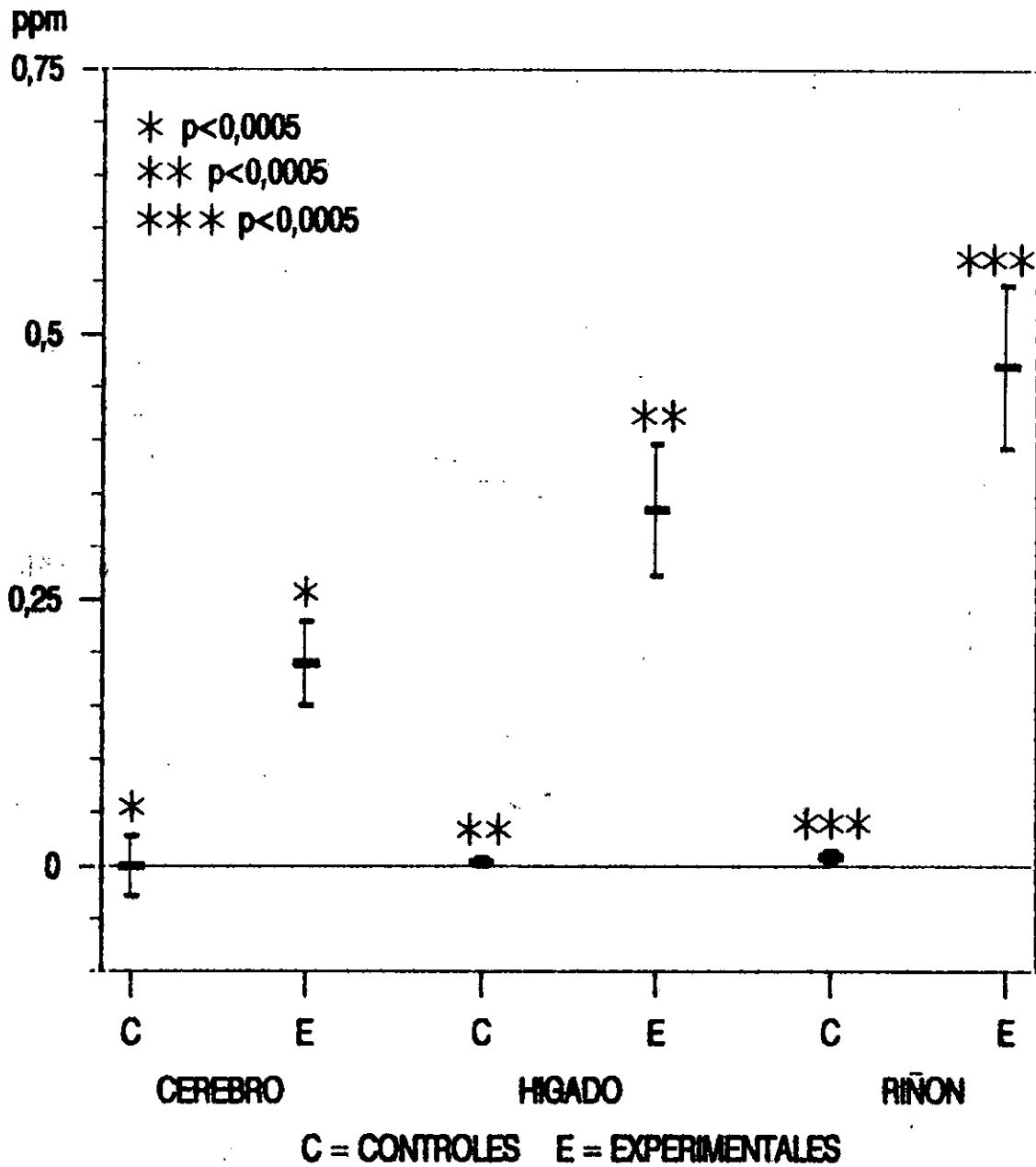


Figura IX. Acumulación media \pm e.s. de lindano en órganos en la dosis subcrónica.

DOSIS SUBCRONICA

	CEREBRO	HIGADO	RIÑON
CEREBRO	X	—	p<0,05
HIGADO	—	X	—
RIÑON	p<0,05	—	X

<p>Tabla n- 21. Nivel de significación entre los órganos de animales experimentales.</p>

COMPARACION DE DOSIS EXPERIMENTALES

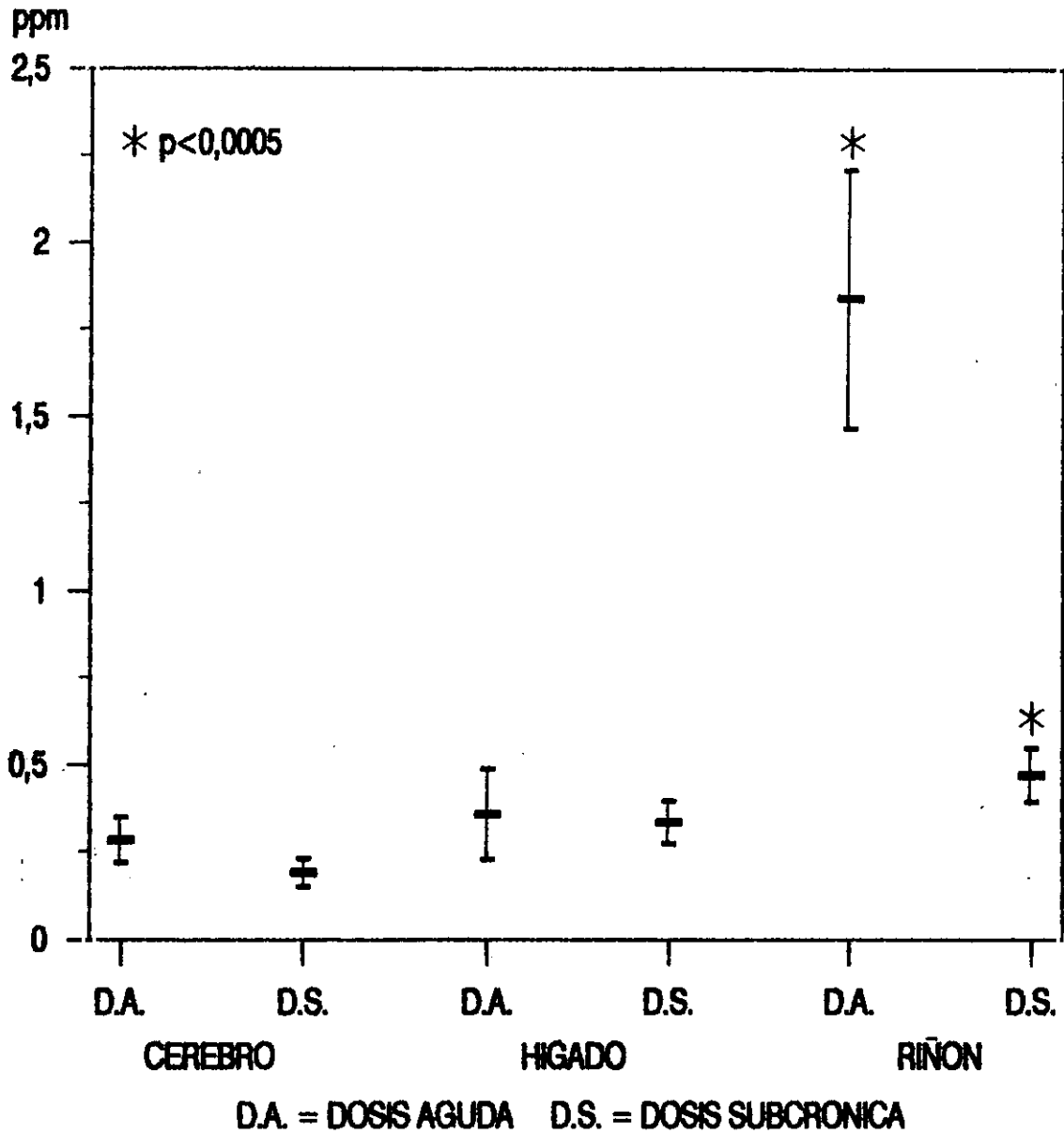


Figura X. Acumulación media \pm e.s. de lindano en órganos de dosis aguda y dosis subcrónica.

y hembras y la tabla nº19, la acumulación media + e.s. en dichos órganos.

En la tabla nº20 y en la figura IX, se muestra la acumulación media de lindano en cerebro, hígado y riñón en ppm, encontrando un nivel de significación del 99,99% entre animales controles y experimentales en cualquiera de los órganos. La tabla nº 21 muestra el nivel de significación entre los órganos de animales experimentales para la dosis subcrónica.

La figura X representa las diferentes concentraciones medias en cada órgano entre la dosis aguda y dosis subcrónica.

3.4. DOPAMINA.

DOSIS AGUDA : La tabla nº22 muestra los niveles medios + e.s. de dopamina y la significación (del 99,9995 % en machos y del 99,995 en hembras), que se reflejan en la figura XI.

DOSIS SUBCRONICA : La tabla nº23 muestra los niveles medios + e.s. de dopamina y la significación (del 99,9995 %, tanto en machos como en hembras), así como la figura XII que los refleja.

La tabla nº24 y figura XIII reflejan los valores medios + e.s. y niveles de significación de los animales controles y experimentales en la dosis aguda y dosis subcrónica, siendo en las dos mayor del 99,9995 %. También se refleja el porcentaje de descenso entre controles y experimentales en las dos dosis.

**CONCENTRACION DE DOPAMINA
EN DIENCEFALO**

	MACHOS	HEMBRAS
CONTROLES (microg/g)	n=7 1,755 ± 0,142	n=7 1,579 ± 0,124
EXPERIMENTALES (microg/g)	p<0,0005 n=7 0,760 ± 0,142	p<0,0005 n=7 0,781 ± 0,176

Tabla n- 22. DOSIS AGUDA.
Niveles medios ± e.s. de dopamina.

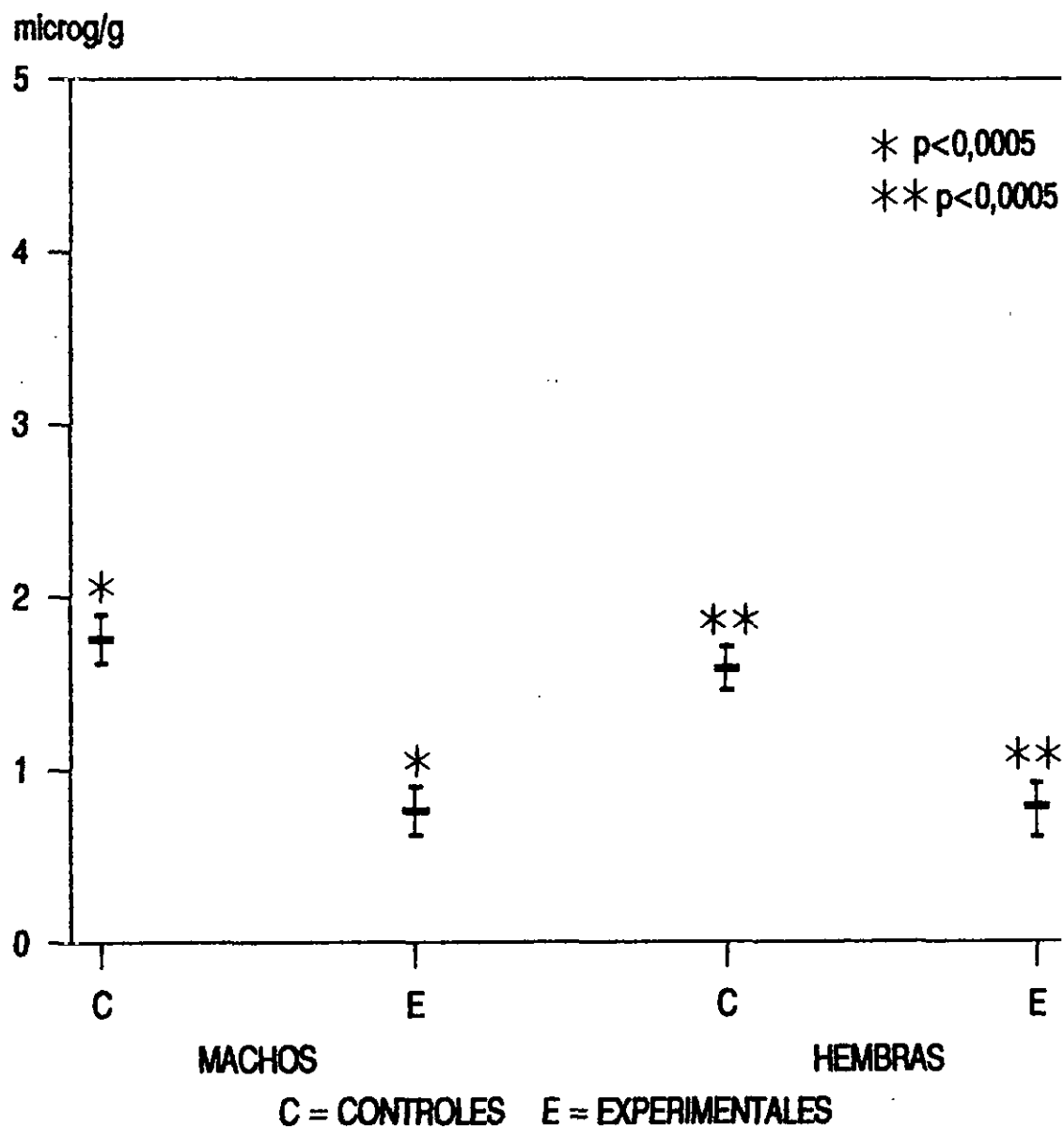
**CONCENTRACION DE DOPAMINA
EN DIENCEFALO**

Figura XI. DOSIS AGUDA.
Niveles medios \pm e.s. de dopamina.

**CONCENTRACION DE DOPAMINA
EN DIENCEFALO**

	MACHOS	HEMBRAS
CONTROLES (microg/g)	n=8 1,724 ± 0,123	n=8 1,428 ± 0,216
EXPERIMENTALES (microg/g)	p<0,0005 n=8 0,732 ± 0,119	p<0,0005 n=8 0,744 ± 0,039

Tabla n- 23. DOSIS SUBCRONICA.
Niveles medios ± e.s. de dopamina.

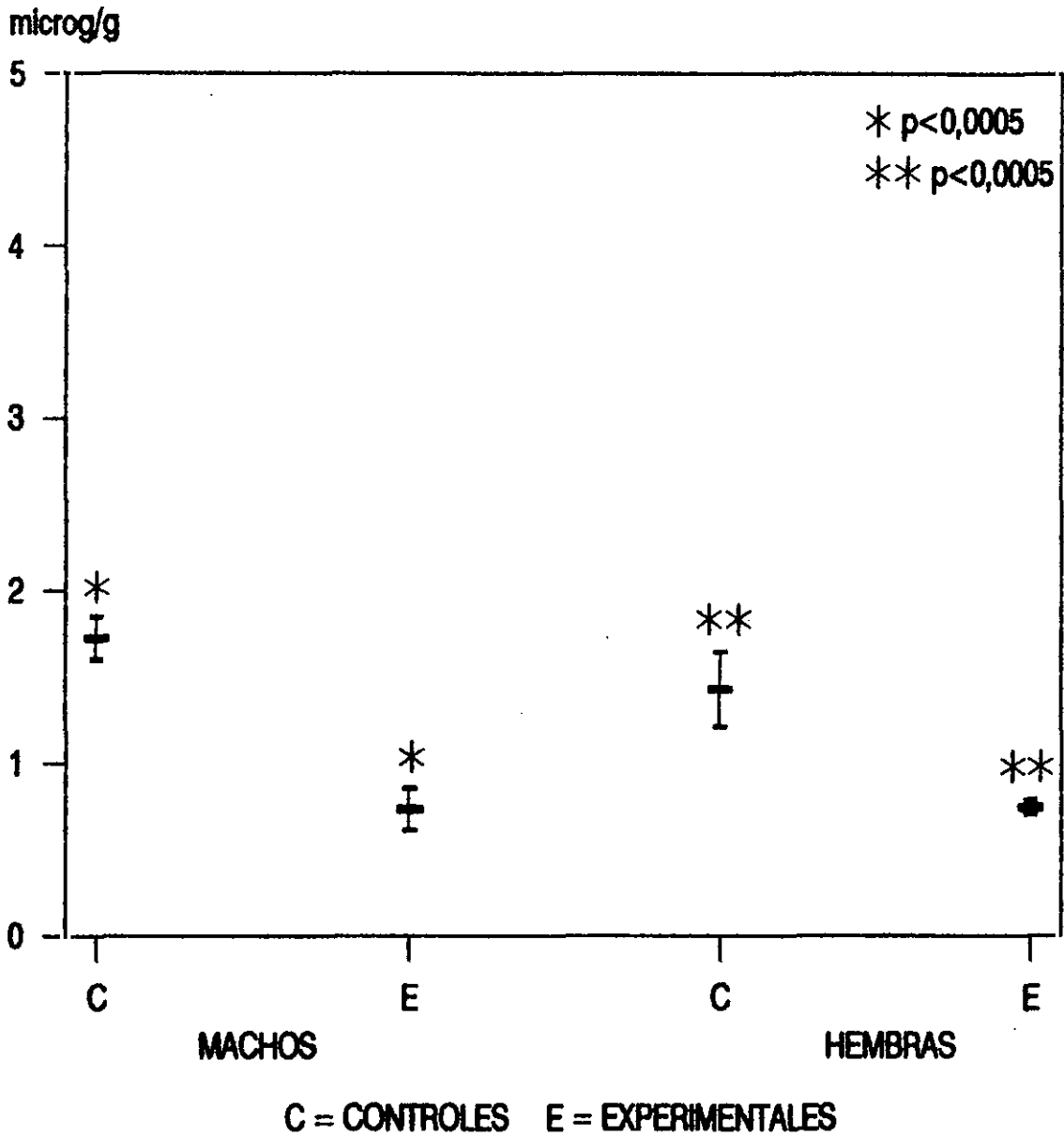
**CONCENTRACION DE DOPAMINA
EN DIENCEFALO**

Figura XII. DOSIS SUBCRONICA.
Niveles medios \pm e.s. de dopamina.

**CONCENTRACION DE DOPAMINA
EN DIENCEFALO**

	DOSIS AGUDA	DOSIS SUBCRONICA
CONTROLES (microg/g)	n=14 1,667 ± 0,159	n=16 1,576 ± 0,229
EXPERIMENTALES (microg/g)	p<0.0005 n=14 0,771 ± 0,160	p<0.0005 n=16 0,738 ± 0,089
% DESCENSO	46,47	46,82

Tabla n- 24. Niveles medios \pm e.s. de dopamina y porcentaje de descenso en la dosis aguda y dosis subcrónica.

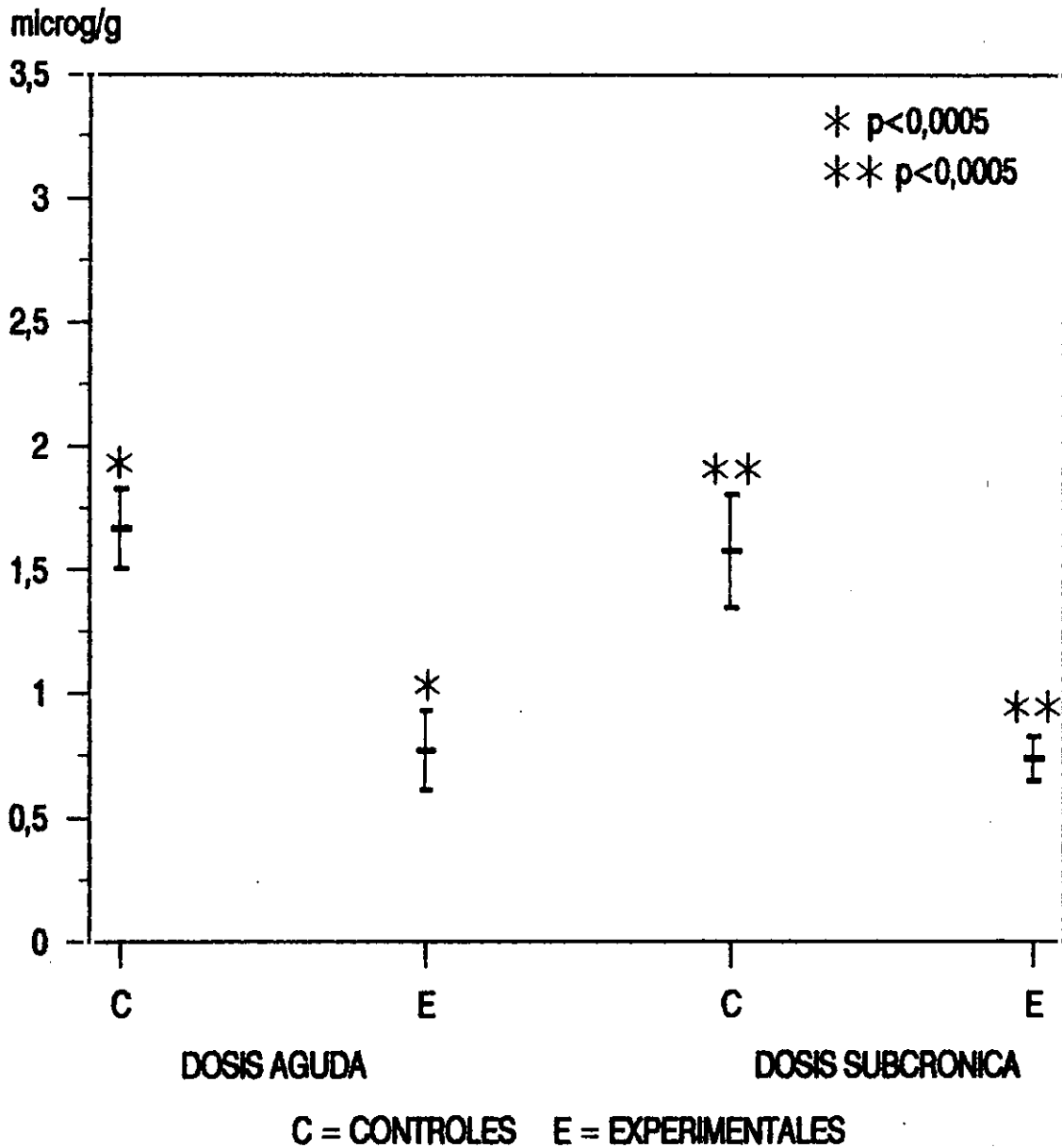
**CONCENTRACION DE DOPAMINA
EN DIENCEFALO**

Figura XIII. Niveles medios \pm e.s. de dopamina en la dosis aguda y dosis subcrónica.

3.5. TRANSAMINASAS: ASAT Y ALAT.

DOSIS AGUDA : Se presentan las figuras XIV y XV, que corresponden a los niveles medios + e.s. y el nivel de significación (si existió), de ASAT y ALAT en cada una de las extracciones para

los animales controles y experimentales. A pesar de las fluctuaciones en los días de la extracción, es de reseñar que los valores medios de los experimentales siempre estuvieron por encima de los controles.

DOSIS SUBCRONICA : En las gráficas XVI y XVII se reflejan los niveles medios + e.s. y el nivel de significación (si lo hubo), de ASAT y ALAT en cada una de las extracciones para controles y experimentales. Es de destacar que para la ALAT, en todos los días de la extracción hay diferencias significativas del 99,9995 %.

3.6. ESTUDIO MORFOLOGICO.

Se presentan microfotografías de tejido hepático y renal de animales controles que corresponden de la nº1 a la nº7. De la nº1 a la nº3 son de tejido hepático, el resto de renal. Las microfotografías de animales experimentales corresponden desde la nº8 a la nº23.

DOSIS AGUDA : ASAT

mU/ml

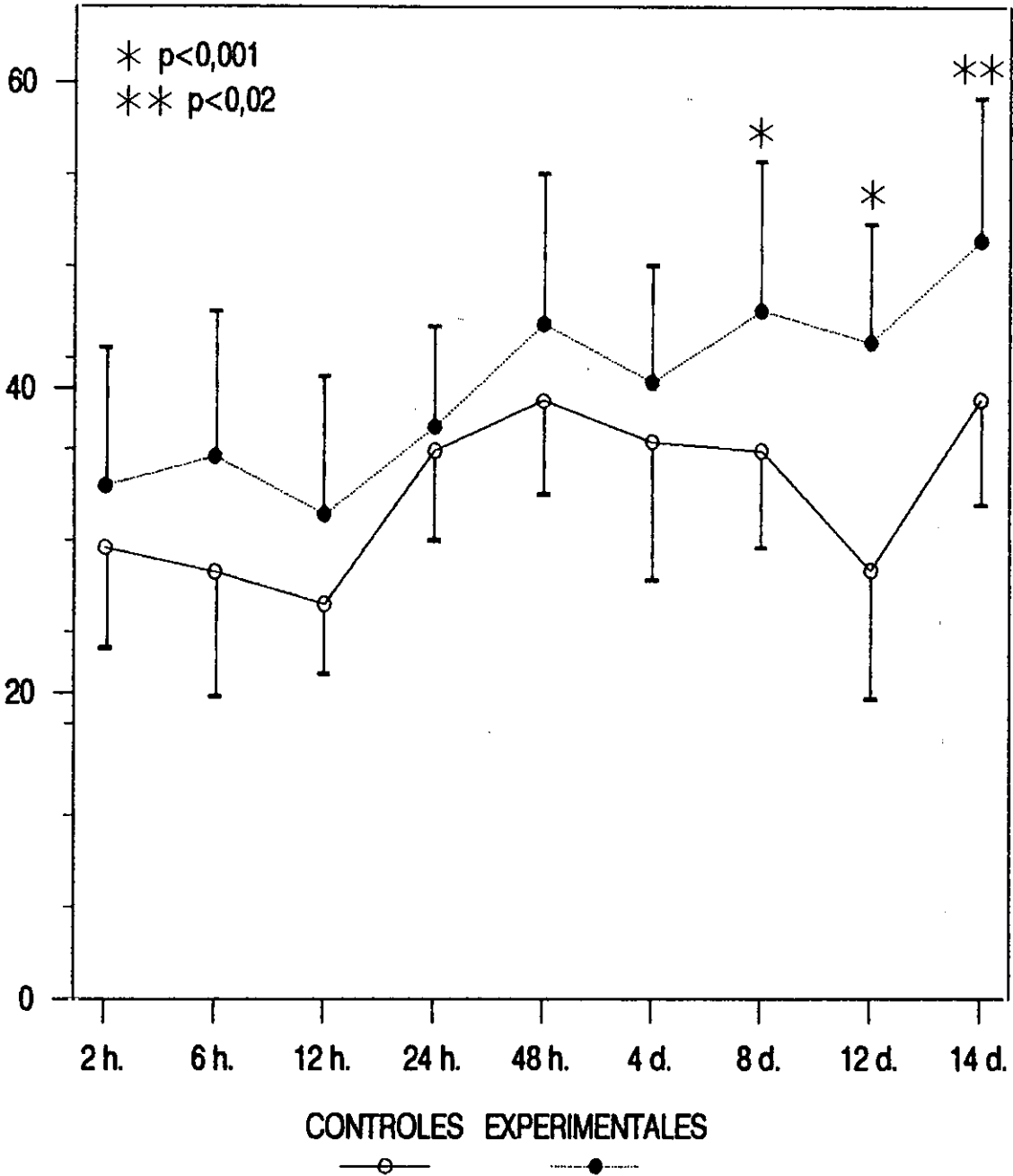


Figura XIV. Niveles medios \pm e.s. de ASAT en suero. Comparación entre controles y experimentales.

DOSIS AGUDA : ALAT

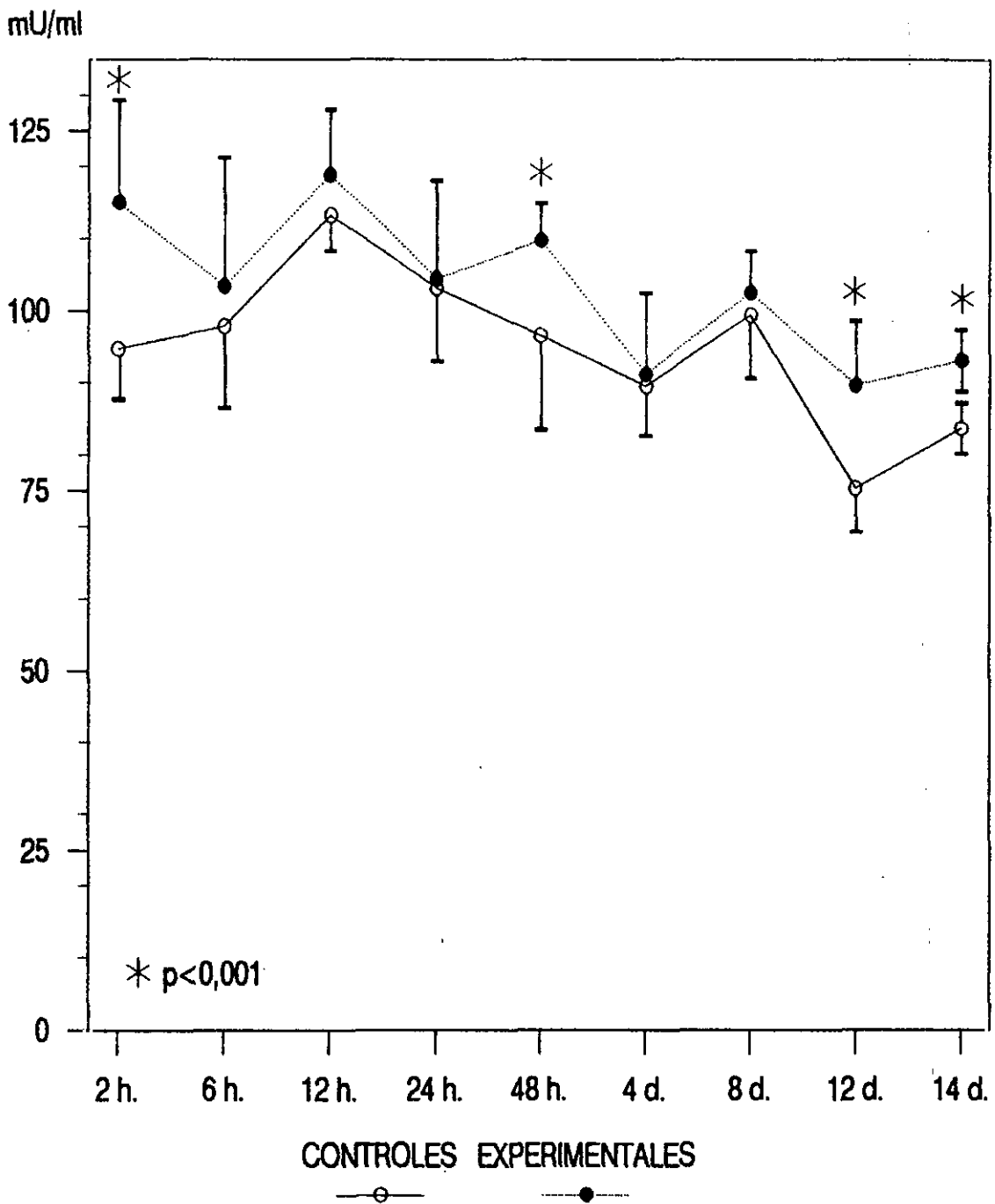


Figura XV. Niveles medios \pm e.s. de ALAT en suero. Comparación entre controles y experimentales.

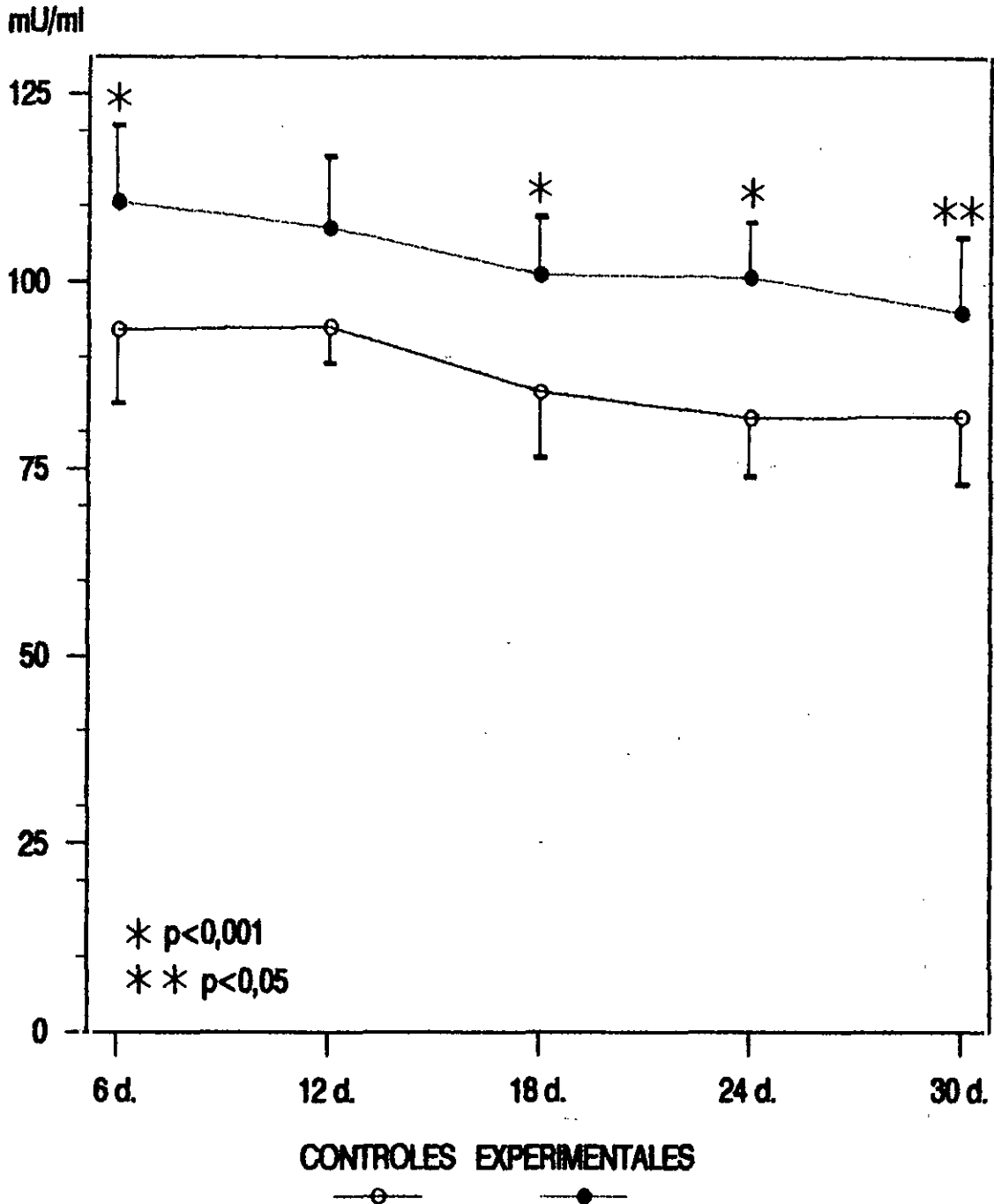
DOSIS SUBCRONICA : ASAT

Figura XVI. Niveles medios \pm e.s. de ASAT en suero. Comparación entre controles y experimentales.

DOSIS SUBCRONICA : ALAT

mU/ml

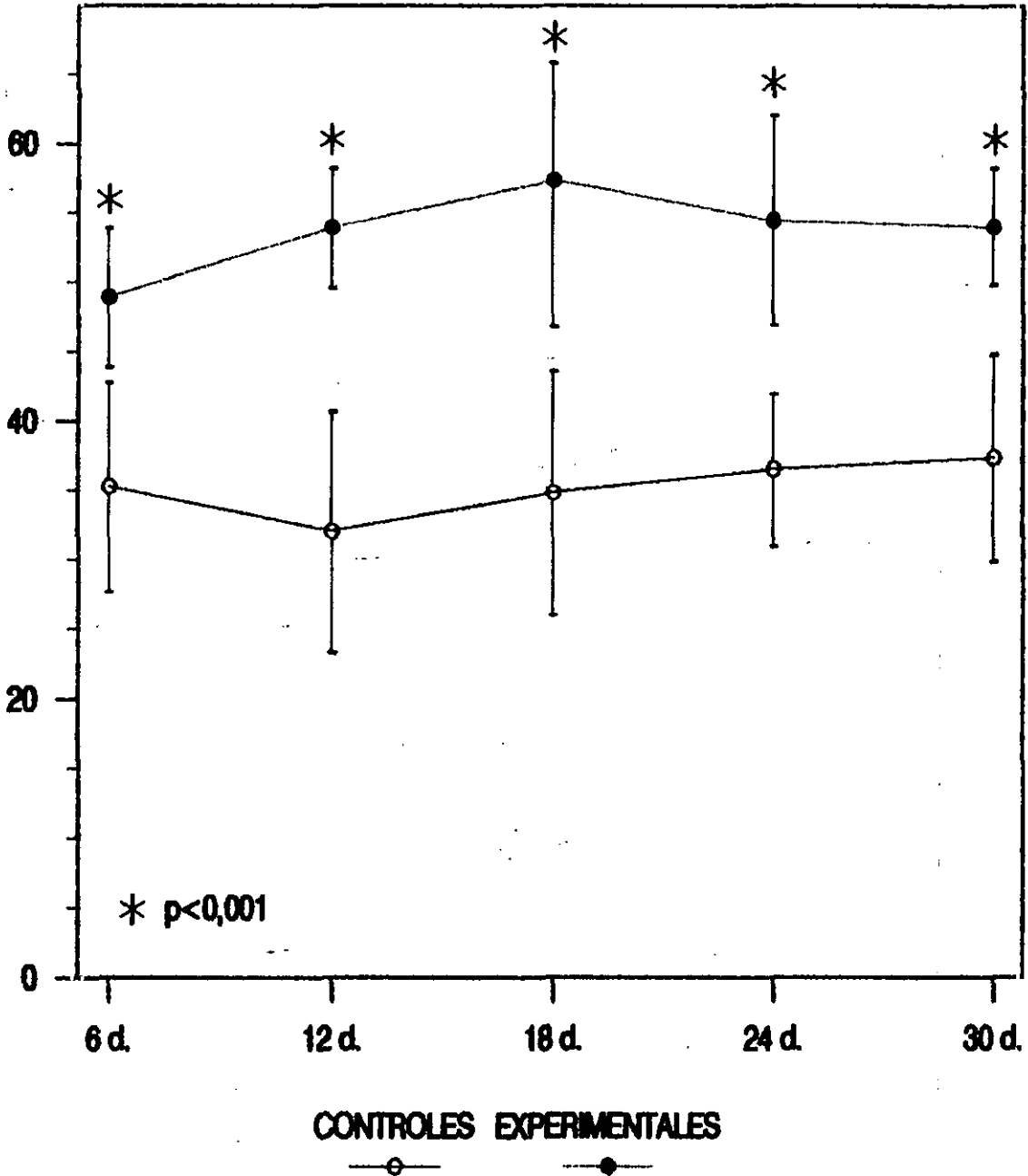


Figura XVII. Niveles medios \pm e.s. de ALAT en suero. Comparación entre controles y experimentales.

DOSIS AGUDA: Comprende las microfotografías de la nº8 a la nº14, ambas inclusive. Tinción con Hematoxilina-Eosina: la nº8 y la nº9 corresponden a tejido hepático y la nº10 y nº11 a tejido renal. Tinción con Sudán IV: nº12 y nº13 son de tejido renal y la nº14 de tejido hepático.

DOSIS SUBCRONICA: Comprende las microfotografías de la nº15 a la nº23. Tinción con Hematoxilina-Eosina: De tejido renal son la nº15, nº18 y nº19 y a tejido hepático corresponden la nº16 y nº17. Tinción con Sudán IV: la nº20 es de tejido hepático, de la nº21 a la nº23, de tejido renal.

En las microfotografías nº8, nº9, nº14, nº16, nº17 y nº20 se observa una profunda vacuolización lipídica de hepatocitos, llegando a romper la membrana celular y extravasando el contenido lipídico al exterior (nº9, nº16 y nº20), al espacio entre los cordones de hepatocitos.

En las microfotografías de la nº10 a la nº13, ambas incluidas y la nº18, nº19, nº22 y nº23 se contempla una obliteración de los túbulos contorneados proximales y distales, desorganización del epitelio tubular (nº10, nº11, nº13, nº15, nº18, nº19, nº22 y nº23, cromatina en forma de rueda de carro (nº21 y nº23), y extravasación de núcleos hacia la luz tubular (microfotografías nº11, nº13, nº18, nº21, nº22 y nº23) provocado por la rotura de la membrana plasmática debido al gran número de vacuolas en el interior celular.

MICROFOTOGRAFIAS

Lista de abreviaturas correspondientes a las microfotografías :

V.H. = Vena Hepática.

E.IH. = Espacio entre los cordones de hepatocitos.

HP = Hepatocito. G = Glomérulo.

TCP = Túbulo contorneado proximal.

TCD = Túbulo contorneado distal.

N.H. = Núcleo del Hepatocito.

VC.LP. = Vacuola Lipídica.

S.H. = Sinusoide Hepático.

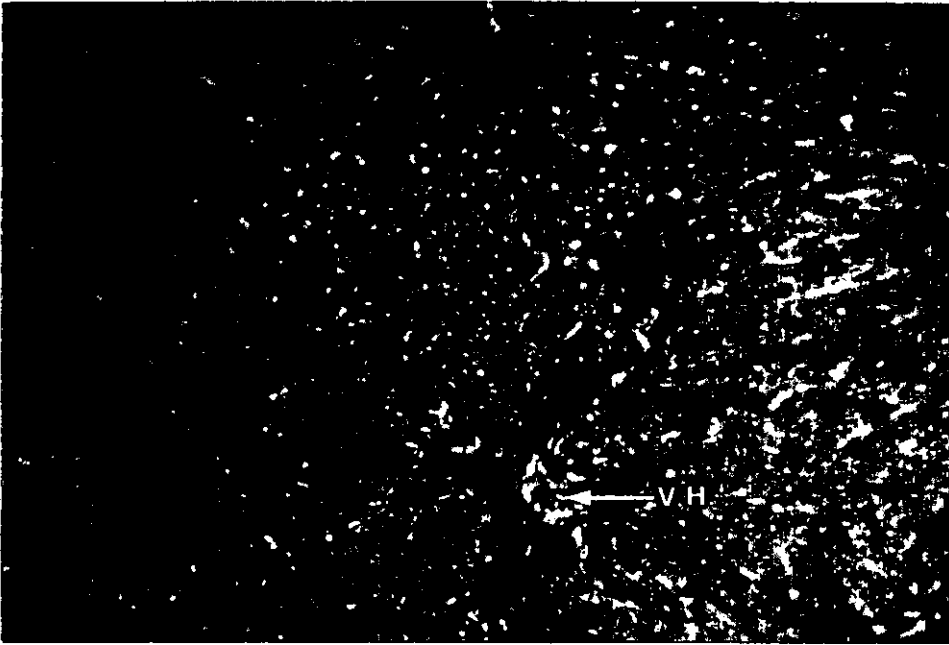
N.R.C. = Nucleolo en forma de Rueda de Carro.

A -----> Obliteración de TCP o TCD.

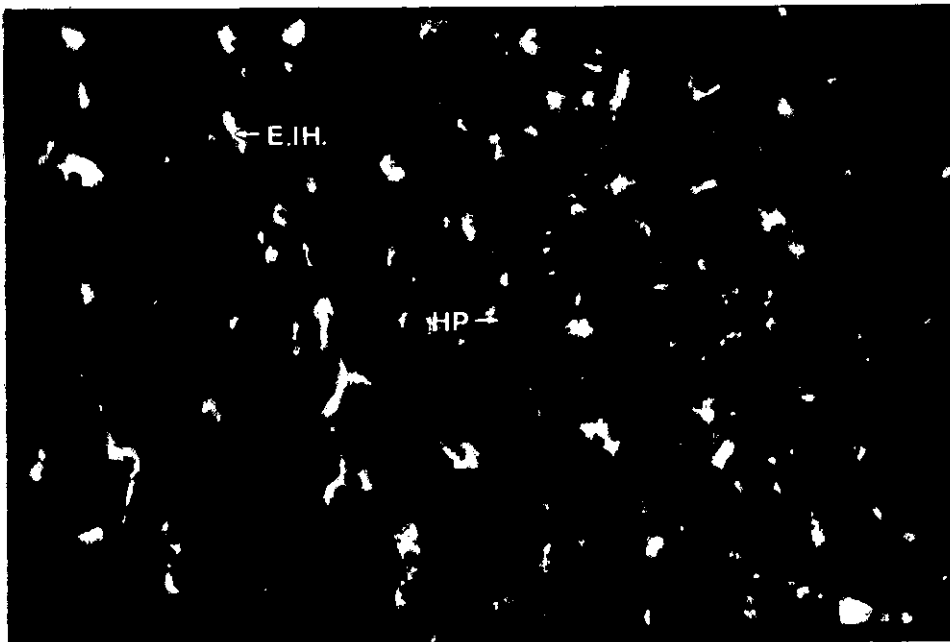
B -----> Rotura de membrana plasmática.

C -----> Extravasado de núcleos.

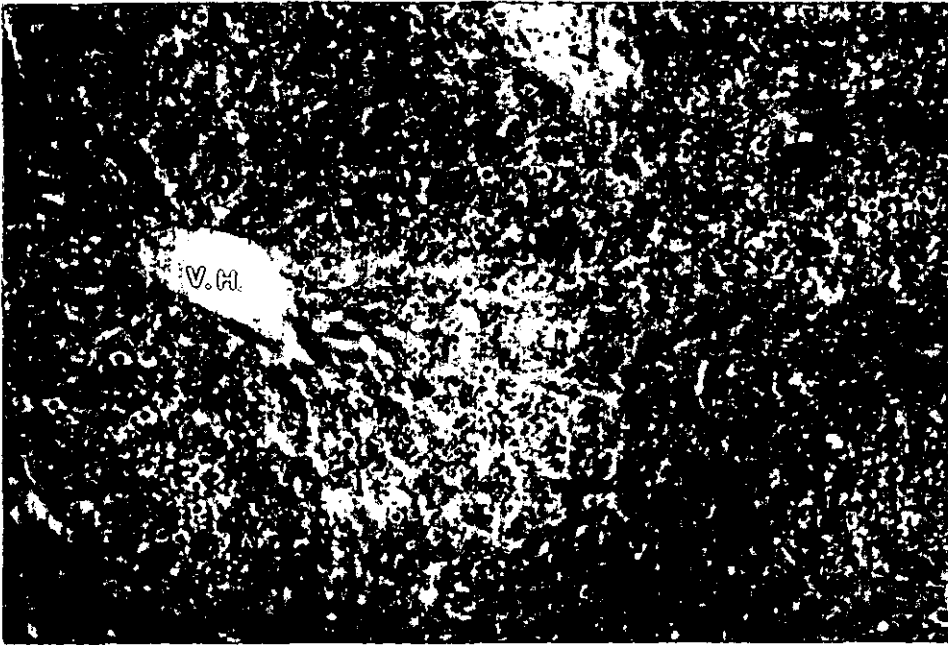
D -----> Vacuolas en el interior de las células epiteliales
de los túbulos contorneados.



**Nº 1. Animal control. Organo: Hígado.
Tinción: Hematoxilina-Eosina. 10 aumentos.**



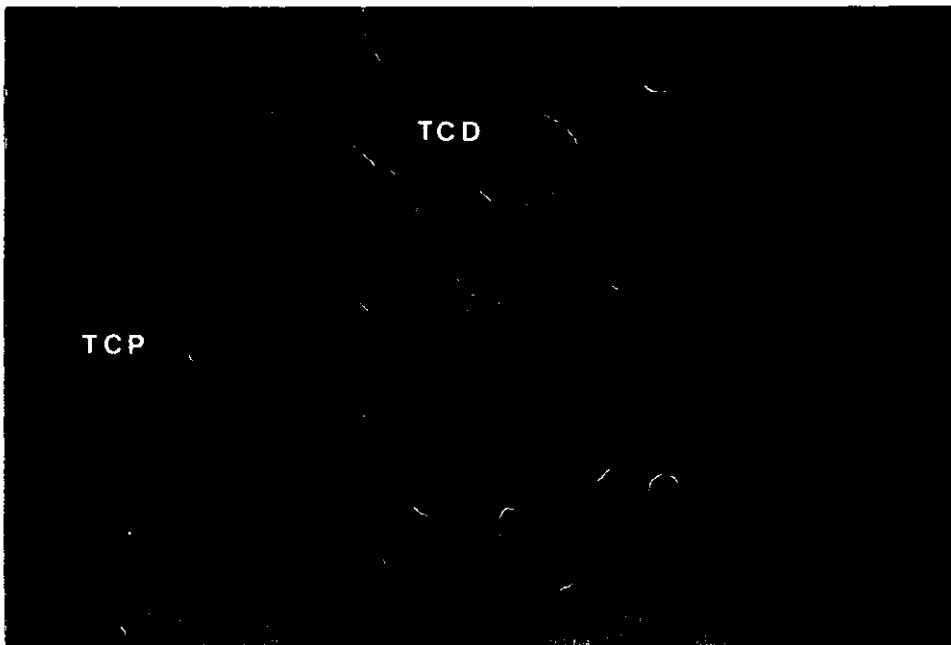
**Nº 2. Animal control. Organo: Hígado.
Tinción: Hematoxilina-Eosina. 40 aumentos.**



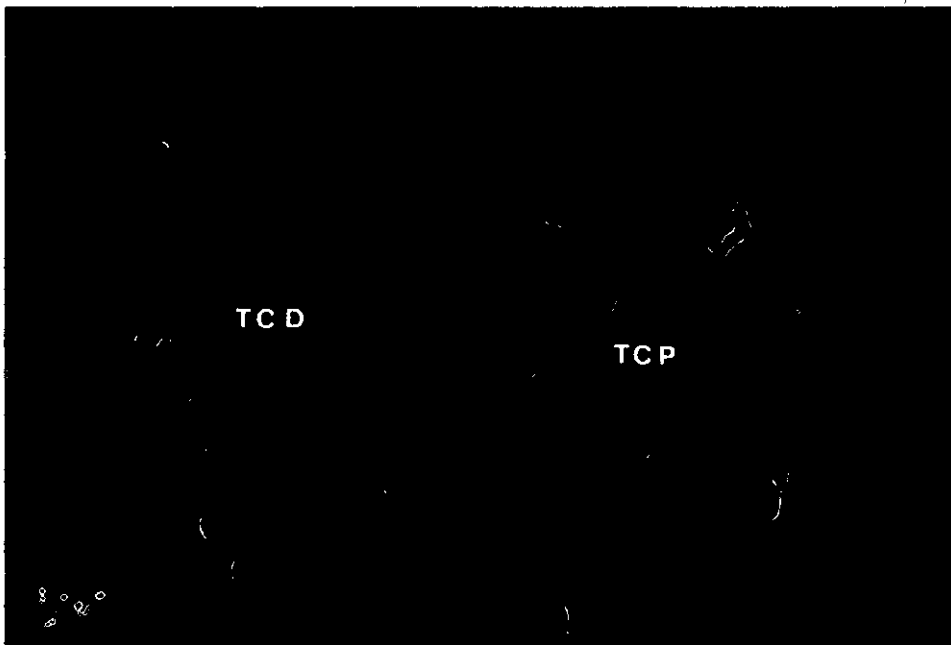
Nº 3. Animal control. Organo: Hígado.
Tinción: Sudán IV. 10 aumentos.



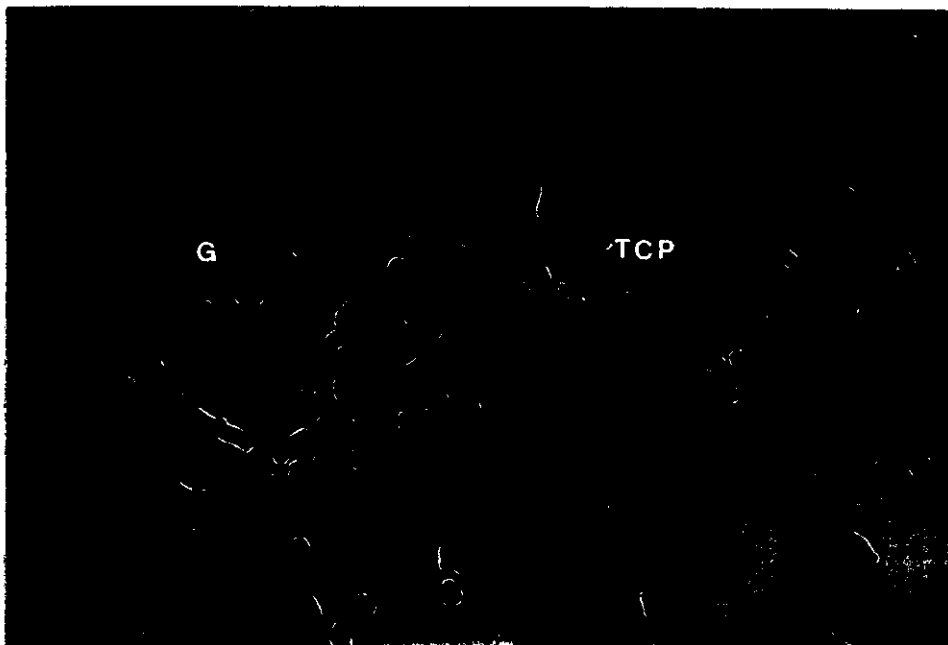
Nº 4. Animal control. Organo: Riñón.
Tinción: Sudán IV. 10 aumentos.



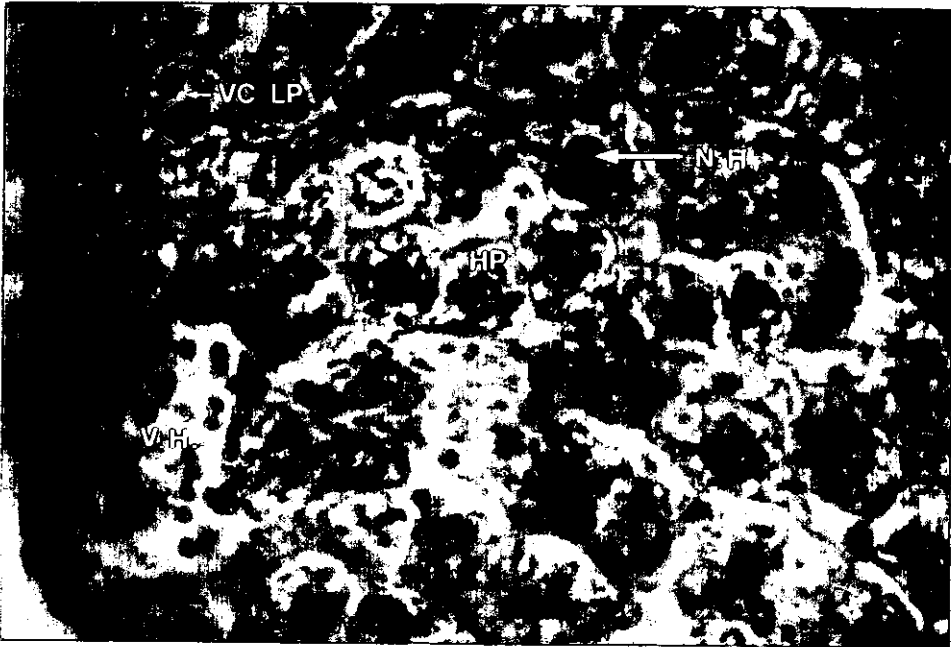
Nº 5. Animal control. Organo: Riñón.
Tinción: Hematoxilina-Eosina. 40 aumentos.



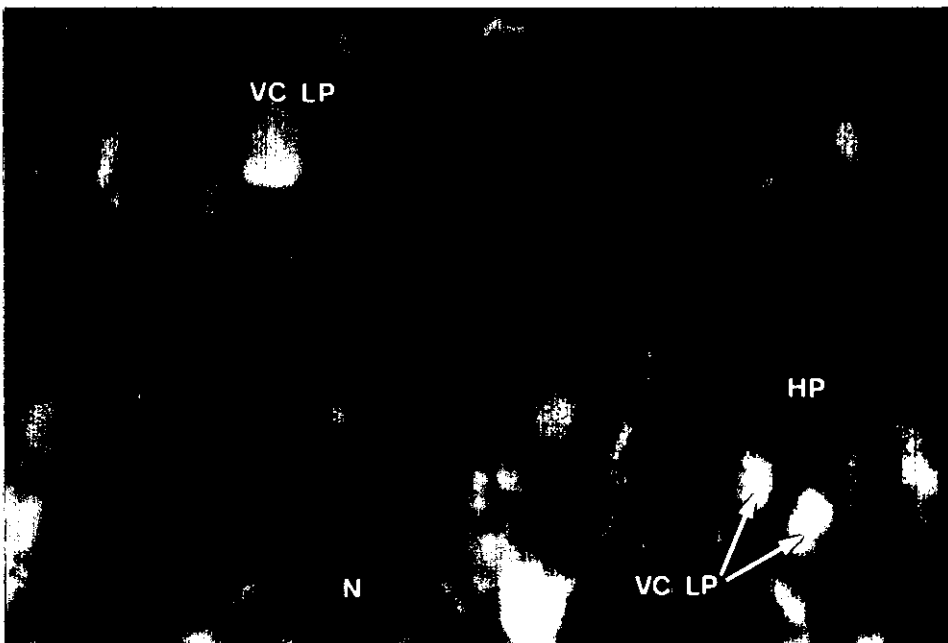
**Nº 6. Animal control. Organo: Riñón.
Tinción: Sudón IV. 40 aumentos.**



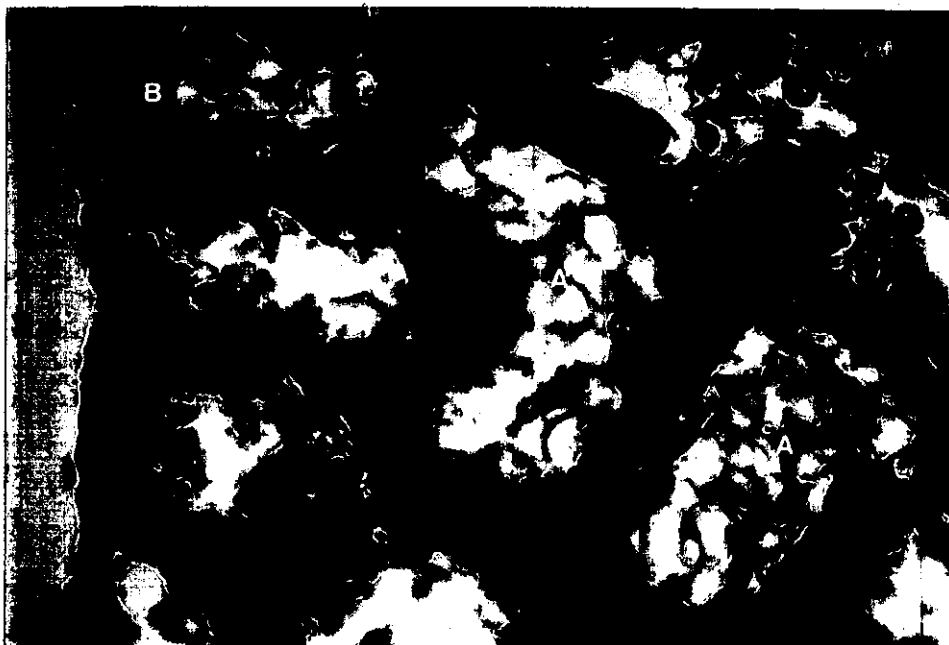
**Nº 7. Animal control. Organo: Riñón.
Tinción: Sudón IV. 40 aumentos.**



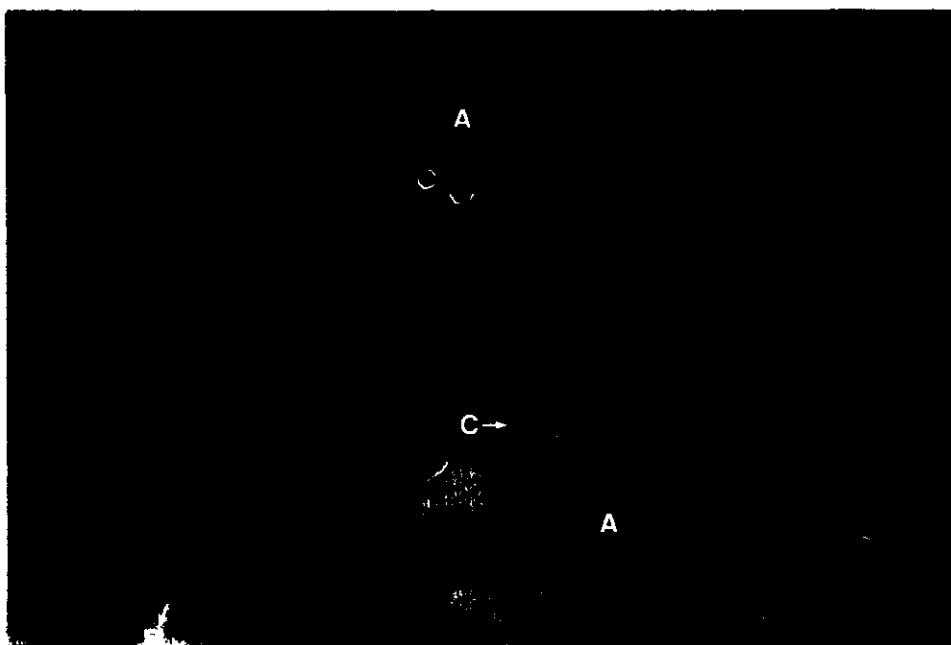
**Nº 8. Dosis aguda. Animal experimental. Organo: Hígado.
Tinción: Hematoxilina-Eosina. 40 aumentos.**



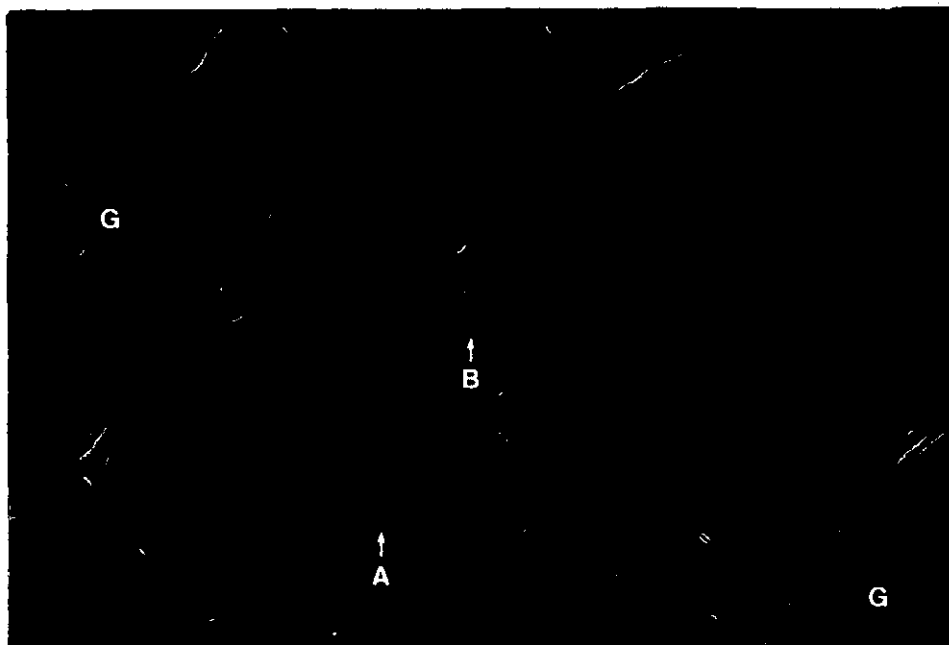
**Nº 9. Dosis aguda. Animal experimental. Organo: Hígado.
Tinción: Hematoxilina-Eosina. 100 aumentos.**



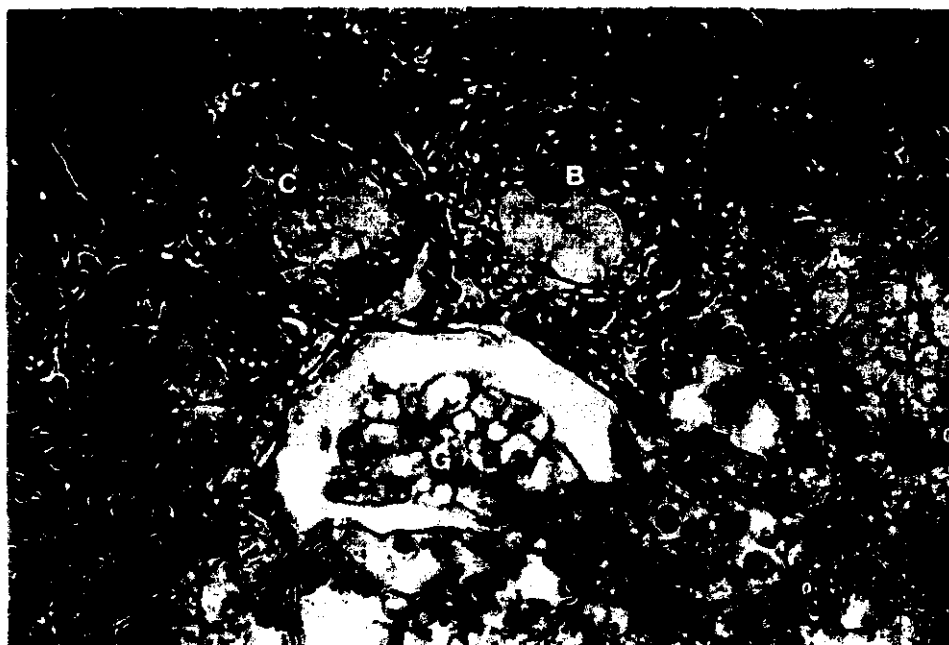
**Nº 10. Dosis aguda. Animal experimental. Organo: Riñón.
Tinción: Hematoxilina-Eosina. 40 aumentos.**



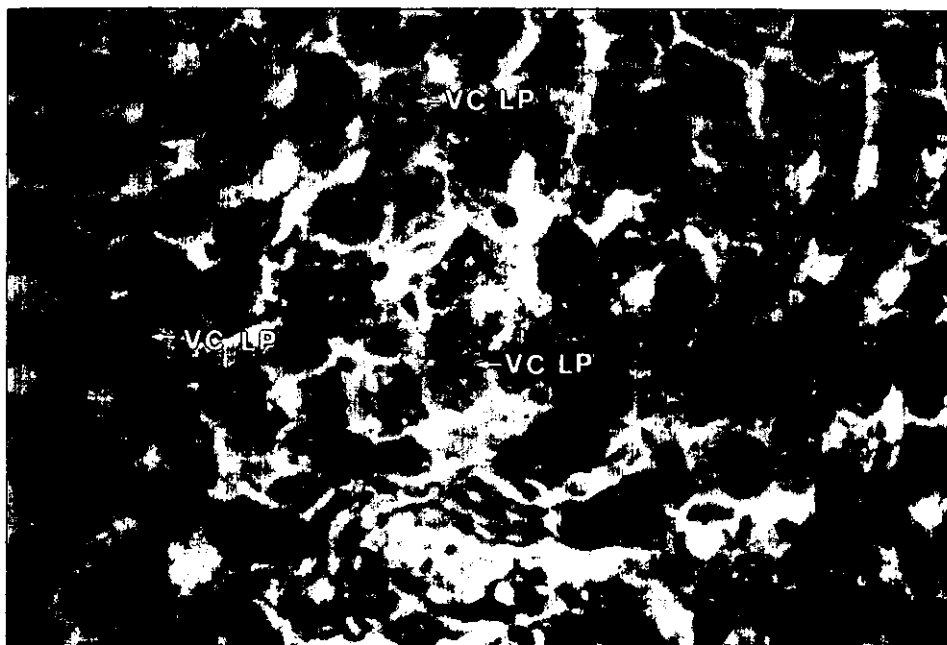
**Nº 11. Dosis aguda. Animal experimental. Organo: Riñón.
Tinción: Hematoxilina-Eosina. 100 aumentos.**



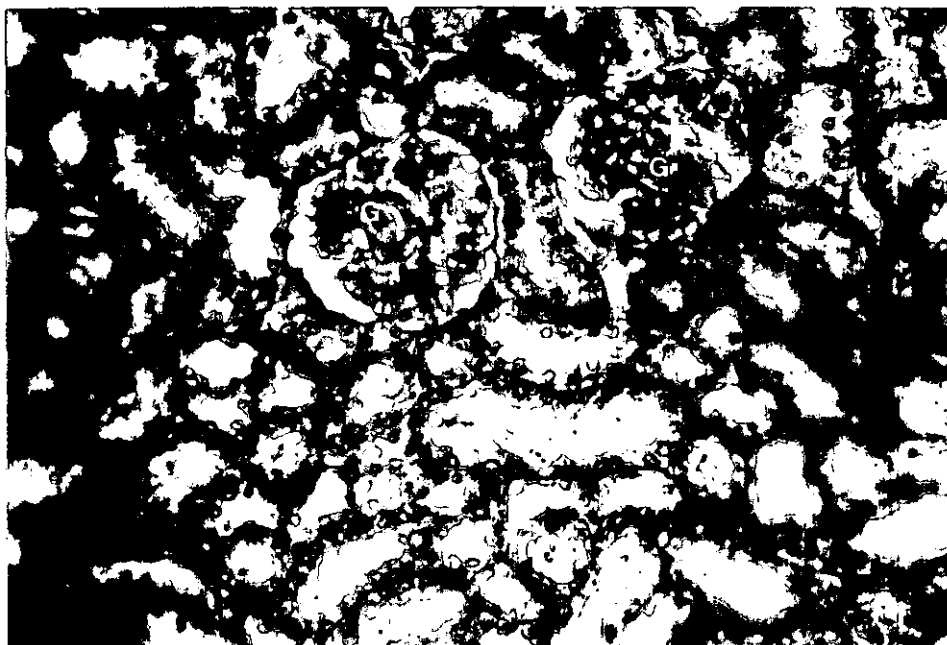
**Nº 12. Dosis aguda. Animal experimental. Organo: Riñón.
Tinción: Sudán IV. 40 aumentos.**



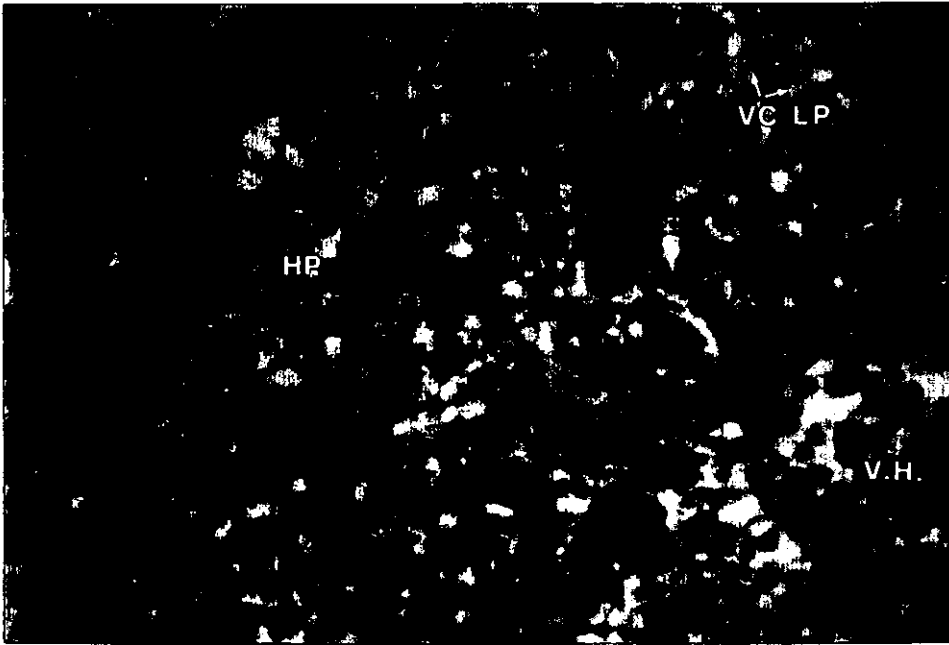
**Nº 13. Dosis aguda. Animal experimental. Organo: Riñón.
Tinción: Sudán IV. 40 aumentos.**



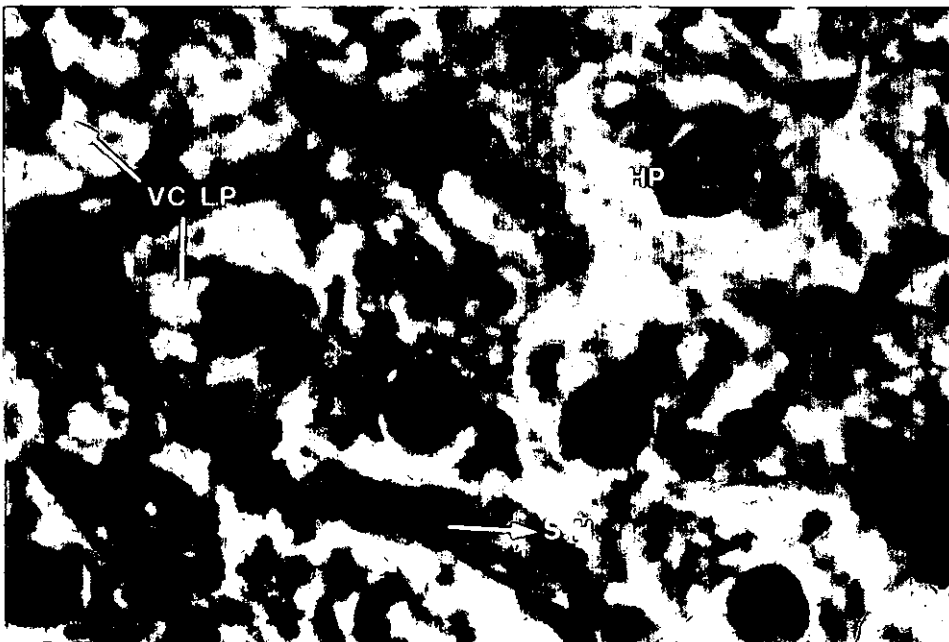
**Nº 14. Dosis aguda. Animal experimental. Organo: Hígado.
Tinción: Sudán IV. 40 aumentos.**



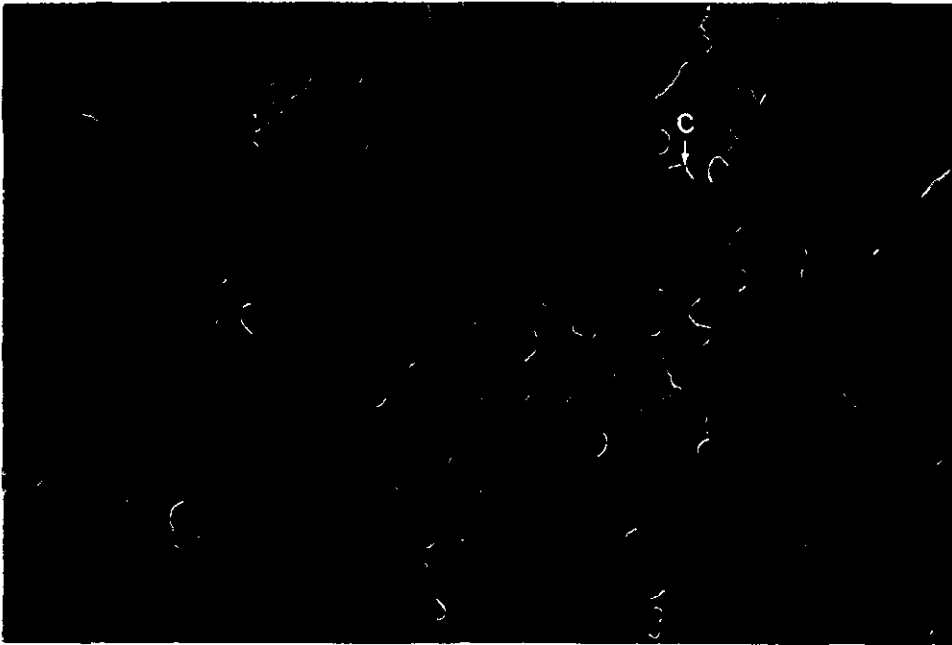
**Nº 15. Dosis subcrónica. Animal experimental. Organo: Riñón.
Tinción: Hematoxilina-Eosina. 10 aumentos.**



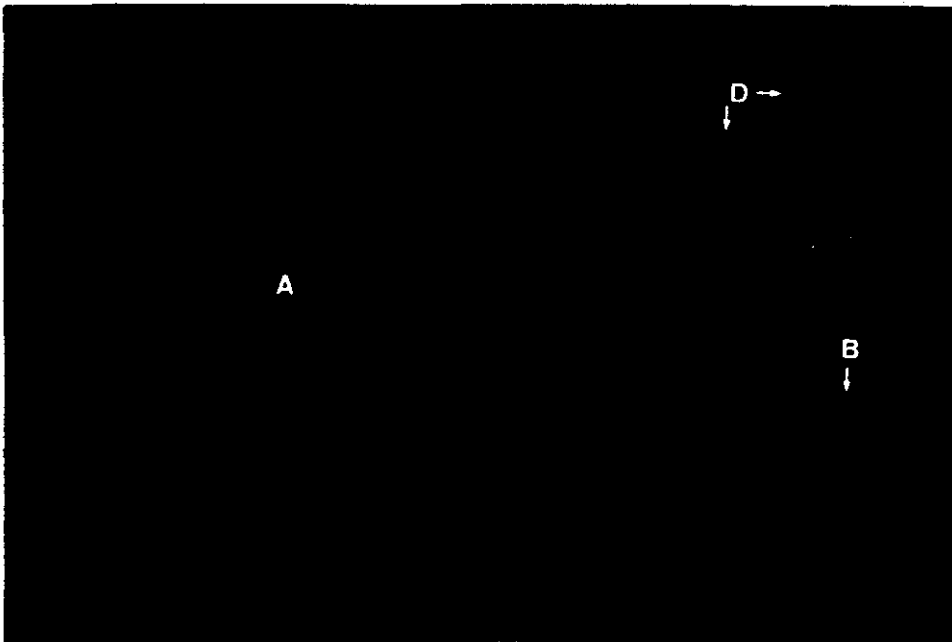
Nº 16. Dosis subcrónica. Animal experimental. Organó: Hígado.
Tinción: Hematoxilina-Eosina. 40 aumentos.



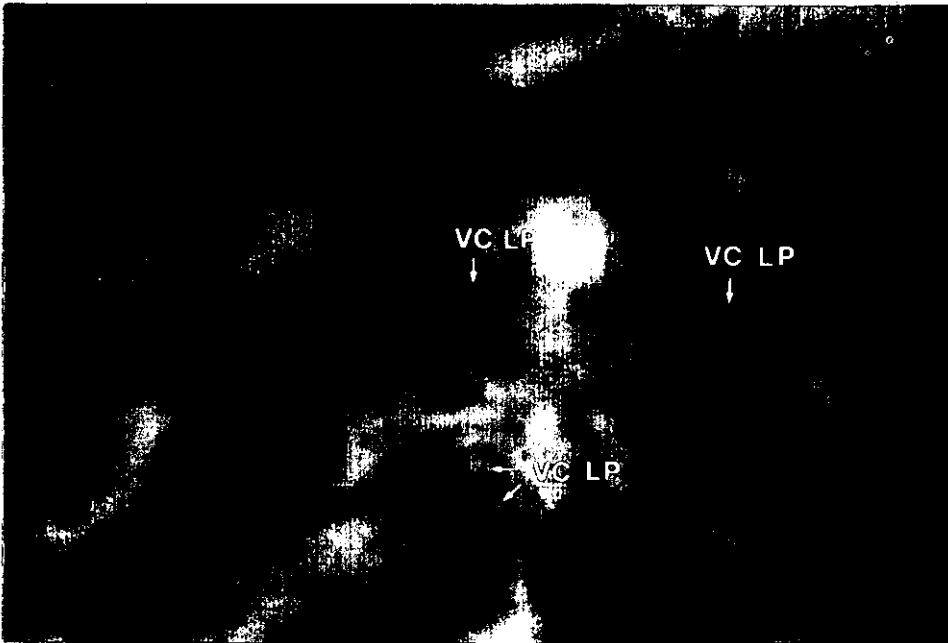
Nº 17. Dosis subcrónica. Animal experimental. Organó: Hígado.
Tinción: Hematoxilina-Eosina. 100 aumentos.



Nº 18. Dosis subcrónica. Animal experimental. Organo: Riñón.
Tinción: Hematoxilina-Eosina. 40 aumentos.



Nº 19. Dosis subcrónica. Animal experimental. Organo: Riñón.
Tinción: Hematoxilina-Eosina. 100 aumentos.



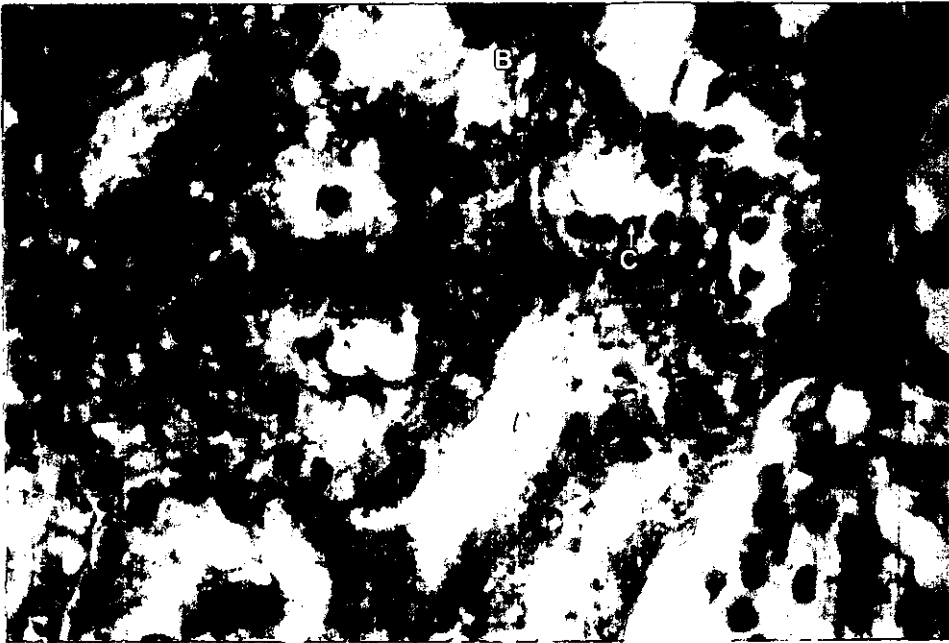
Nº 20. Dosis subcrónica. Animal experimental. Organo: Hígado.
Tinción: Sudán IV. 100 aumentos.



Nº 21. Dosis subcrónica. Animal experimental. Organo: Riñón.
Tinción: Sudán IV. 100 aumentos.



Nº 22. Dosis subcrónica. Animal experimental. Organo: Riñón.
Tinción: Sudán IV. 40 aumentos.



Nº 23. Dosis subcrónica. Animal experimental. Organo: Riñón.
Tinción: Sudán IV. 40 aumentos.

DISCUSSION

DISCUSION.

4.1. NEUROTOXICIDAD.

En la intoxicación aguda observamos que el desarrollo de los síntomas comporta el cuadro clínico característico de un envenenamiento producido por insecticidas organoclorados (Joy, 1982; Desi, 1983 y González-Rodríguez y col., 1987). El 25% de los machos no ha mostrado sintomatología alguna. En los casos en los que aparece, tanto machos como hembras, su desarrollo es rápido, lo que confirma la potente actividad convulsiva del lindano, demostrada incluso en dosis mucho menores (Joy, 1973). Si, según Tussell y col., 1988, 5 microg/g de lindano en encéfalo producen estimulación nerviosa, el 87,5% de nuestros animales experimentales tendrían al menos esa fijación en cerebro.

Existe una marcada diferencia de comportamiento con el pesticida respecto a los sexos, las hembras muestran una mayor intensidad en algunas etapas, especialmente en las de excitabilidad y de convulsiones (tipo 1 y tipo 5), mientras que ninguno de los machos presentó la pauta tipo 3..

Estas observaciones coinciden con Tussell y col., 1987, para los que altas concentraciones de lindano causan efectos neurotóxicos, principalmente, convulsiones. Asimismo las observaciones en nuestros animales concuerdan con los de Muñoz-Blanco y col., 1985 y 1987, que obtenían, en ratas, con dosis agudas (225 mg/kg de peso), crisis convulsivas tónico-clónicas. Nuestro estudio, con do-

sis más bajas (60 mg/kg de peso), ya presenta un cuadro neurotóxico más completo.

Hay que resaltar, que en ningún momento, los animales presentaron sintomatología alguna con la dosis subcrónica, a pesar de que la dosis total suministrada fue la misma (60 mg/kg de peso corporal).

4.2. VARIACIONES EN EL PESO DE LOS ANIMALES E INDICES ORGANOSOMATICOS.

Con respecto a la dosis aguda, hemos encontrado diferencias significativas ($p < 0,005$) en el incremento de peso entre controles y experimentales a lo largo de la experimentación. Woolley y col., 1985 y Woolley y Griffith, 1989, observaron junto al descenso en la temperatura y alimentación ingerida, un descenso también en el peso.

Las diferencias en la ganancia de peso corporal son más espectaculares en los machos, que representa un 38,6% en los 14 días con un grado de significación del 99,95%, que en las hembras, con un 30% y un grado de significación también del 99,95%.

Estas diferencias sexuales en cuanto a la ganancia de peso corporal están descritas por Camón y col., 1988, aunque existen diferencias en las dosis y en los intervalos de tiempo.

En la intoxicación subcrónica, con dosis fraccionadas de 60 mg/kg de peso los animales no experimentaron diferencias significativas entre controles y experimentales en el incremento de peso. Los, ya citados Camón y col., 1988, trabajando con periodos de tiempo de siete días y a dosis inferiores a las nuestras, encontraron un descenso significativo en la ganancia de peso corporal y un descenso en el apetito, en los días iniciales del experimento.

Nuestros resultados nos hacen suponer un mecanismo adaptativo que podría ser la inducción de la actividad microsomal hepática y/o el desarrollo de la actividad compensatoria que el SNC adquiriría con el tiempo. Los efectos anoréxicos serían muy patentes inicialmente, descendiendo paulatinamente. Un estudio de Chadwick y col., 1988) señalaba a un incremento de peso en animales tratados con lindano, pero se trata de animales en un periodo álgido de crecimiento (21 días) en dosis muy bajas.

En el estudio de la variación de los pesos con respecto a los índices organo-somáticos, no se han encontrado diferencias significativas tanto en la dosis aguda como en la subcrónica, ni entre controles y experimentales, coincidiendo con Desi, 1983, aunque otros autores (Andrews y Gray, 1990), sí las han encontrado, pero en tratamientos más largos.

4.3. DISTRIBUCION Y ACUMULACION DE LINDANO EN ORGANOS.

Con la dosis aguda, a los 14 días de la administración, la máxima concentración se encontró en riñón (74,11% del total en los tres órganos), con un nivel de significación máximo (99,9995%) y con una gran variabilidad dependiendo de los individuos. Parece lógico pues se trata de un órgano excretor dependiente de la dieta y el momento fisiológico.

Le sigue en acumulación, el hígado (14,42%), con una significación también máxima (99,9995%), explicable por ser un órgano de tránsito; existiendo la menor concentración en cerebro, que después de los 14 días de la administración su porcentaje fue del 11,45% (99,9995%).

Respecto a la fijación del lindano en este último tejido, hay autores que consideran que se elimina a partir de las 24 horas (Lievremont y Potus, 1981), mientras que otros consideran que existe fijación, principalmente en la sustancia blanca (Joy y Albertson, 1985). Para Stein y col., 1980 y Kramer y col., 1980, el lindano también se acumula en cerebro. Nuestros resultados, confirman estas tesis, ya que tanto con la dosis aguda como con la subcrónica existe fijación en el cerebro.

Comparada la acumulación entre los tres órganos, existen diferencias significativas entre cerebro y riñón ($p < 0,0005$) e hígado y riñón ($p < 0,0005$).

En la dosis subcrónica, encontramos que el riñón ha sido el órgano con mayor concentración (47,63%), le sigue el hígado (33,92%) y a continuación el cerebro (18,44%).

El que el riñón sea el órgano con mayor acumulación viene a confirmar los resultados obtenidos por Zhu y col., en 1986 y por López-Aparicio y col., en 1988, que con dosis crónicas también alcanzan las concentraciones más altas en este órgano.

Comparando la acumulación entre los tres órganos, solamente se ha encontrado diferencias significativas entre el cerebro y el riñón, aunque en menor grado que en la dosis aguda ($p < 0,05$).

Si se compara la acumulación en los diferentes órganos en la dosis aguda y dosis subcrónica, no existen diferencias significativas con respecto al cerebro, ni tampoco las hay con respecto al hígado, pero sí son manifiestamente significativas ($p < 0,0005$) con respecto al órgano excretor, fácilmente explicable por el intervalo de tiempo transcurrido.

4.4. DOPAMINA.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que una exposición oral aguda al lindano, produce un descenso significativo ($p < 0,0005$) en la concentración de dopamina en el diencéfalo de rata adulta, tanto en controles como en experimentales y por sexos.

Este descenso ha sido del 46,47%, lo que viene a confirmar los resultados obtenidos por Magour y col., 1984, que obtuvieron descensos en los niveles de dopamina con una dosis de 40 mg/kg de peso y por Goto, en 1971, que describió alteraciones en la dopamina como consecuencia de la existencia de irregularidades en los mecanismos implicados en la transmisión nerviosa.

Sin embargo, Moreteau y Chaminade, 1983, trabajando con langosta, observaron un incremento en los ganglios cerebrales de dopamina y 5-HT. Nuestro trabajo concuerda más con Greichus y col., 1978, que observaron que la frecuencia y descarga en las neuronas post-sinápticas es más prolongada en animales tratados con lindano.

Los resultados obtenidos con la intoxicación subcrónica corroboran el descenso producido en la dosis aguda. Este es del 46,82% en los animales experimentales con respecto a los controles, con un nivel de significación del 99,9995%.

Existen trabajos (Sharma, 1973; Wagner y Greene, 1978 y Heinz y col., 1980) que, así como nosotros, también encuentran un descenso de los valores normales de dopamina y noradrenalina trabajando con dosis crónicas.

Según Heinz y col., 1980, el lindano disminuye los niveles de dopamina y noradrenalina. Para Aldegunde y col., 1980, la intoxicación con este pesticida produce variaciones en los niveles encefálicos de los neurotransmisores, lo que sugiere la posibilidad de una acción inespecífica del lindano sobre los diferen-

tes sistemas neurotransmisores centrales, dependiendo de la dosis.

El descenso que hemos observado en las concentraciones de este neurotransmisor se puede deber a varias causas: a la dificultad en la recaptura de la dopamina formada, a su menor disponibilidad a partir de su precursor, la tirosina, o a un incremento en el catabolismo de la amina. Estudios con animales (Chisolin y Silbergeld, 1980 y Leegal y col., 1985) expuestos a plomo y a pesticidas organoclorados parece que van en esa dirección.

4.5. VALORACION DE TRANSAMINASAS.

Refiriendonos a las variaciones en los niveles de transaminasas, es un método probado, que éstas se deben a alteraciones hepáticas y renales provocadas por distintos agentes. De esta forma, nuestros resultados sobre la actividad transaminasa de las dos enzimas estudiadas (ASAT y ALAT), ponen de manifiesto diferencias significativas entre los animales experimentales y controles para ASAT y ALAT con la dosis aguda administrada.

Para las dos enzimas, los valores en los animales experimentales siempre estuvieron por encima de los controles. Para ALAT se produjo un aumento significativo del 99,999% a las 2 horas, así como para las dos, ASAT y ALAT, en los dos últimos días de la experimentación, los aumentos volvieron a ser máximos.

Los resultados para la dosis subcrónica reflejan, al igual que en la dosis aguda, valores más altos en animales experimentales en todos los días del estudio. Es de señalar que no existen las fluctuaciones en los valores que existían en la dosis aguda y que la uniformidad en estos valores estuvo remarcada por la existencia de diferencias significativas en casi todos los días de la valoración ($p < 0,001$ y $p < 0,05$).

Parece evidente, según nuestros resultados, que la intoxicación en dosis subletales por lindano, produce una afectación en el metabolismo hepático que se manifiesta por la elevación en los niveles enzimáticos de ASAT y ALAT de los animales intoxicados.

La inexistencia de diferencias significativas en los valores enzimáticos de ASAT y ALAT en algunos de los puntos de la administración aguda, y de ASAT, en un único punto en la administración subcrónica, no altera, a nuestro juicio, la tendencia general reseñada de elevación enzimática en los grupos experimentales.

No se ha encontrado en la bibliografía, ningún estudio parecido al que aquí se presenta; únicamente, Wroblewski y Ladue, 1956, administrando aldrín (pesticida organoclorado) a cabras, observaron un incremento en ASAT y ALAT en la 3ª semana del tratamiento que puede coincidir perfectamente con nuestros resultados a los 18 o 24 días de la experimentación subcrónica. Estos mismos autores también encuentran un incremento enzimático por la acción del CCl_4 , compuesto prototipo de la toxicidad de compuestos organoclorados.

De la misma forma, los trabajos de Jeney y col., en 1981, trabajando con carpas y de Nemcsok y col., en 1981, también con carpas, indicaron que se producía un incremento en los niveles de transaminasas como consecuencias del daño o lisis celular.

4.6. ESTUDIO MORFOLOGICO.

El test morfológico realizado pone de manifiesto que en el hígado, se ha encontrado una intensa vacuolización lipídica en el interior del citoplasma de los hepatocitos y una frecuente rotura de la membrana plasmática con extravasación del contenido lipídico al espacio intercordonal de los hepatocitos.

Estudios puntuales de Videla y col., 1988, con dosis de 20, 40, 60 y 80 mg/kg de peso, encontraron esteatosis hepática en sus animales y Junquiera y col., 1986, también en ratas, observaron esteatosis, con una importante acumulación de gotas de grasa a nivel del citoplasma, indicando Videla y col. que la lesión era progresiva con la dosis.

Asimismo, Nigam y col., 1984, en estudios ultraestructurales y de microscopía óptica del hígado de ratas a las que suministraron 500 ppm de isómeros de HCH en la dieta de forma crónica, encontraron a los cuatro meses, células con núcleos hipercromáticos, nucleolos muy grandes con partículas de heterocromatina con desorganización de cromatina y nucleolos, células altamente vacuolizadas con una elevada cantidad de gotas lipídicas en su citoplasma. Estos cambios y alteraciones son en todo caso muy simi-

lares a los obtenidos en nuestros animales a los 30 días de tratamiento.

Con respecto al tejido renal, se ha encontrado una obliteración de los túbulos contorneados proximales y distales con desorganización del epitelio tubular, cromatina nuclear en forma de rueda de carro y una extravasación hacia la luz tubular de los núcleos de las células epiteliales tubulares por rotura de la membrana plasmática. Estos resultados concuerdan con los de Engst y col., 1977 y Zhu y col., 1986, que encontraron degeneración a nivel renal y con los de Andrews y Gray, 1990, que hallaron degeneración tubular y formación de gotas de grasa en ratas a las que se administró lindano en dosis crónicas.

En nuestro estudio, los cambios morfológicos observados con las dosis subcrónicas muestran aparentemente los mismos daños que con la dosis aguda.

CONCLUSIONES

. CONCLUSIONES.

- * El cuadro neurotóxico refleja que existen diferencias entre la dosis aguda y dosis subcrónica, lo que explica que a determinadas concentraciones existen manifestaciones y que la eliminación y acomodación al tóxico juega un importante papel.
- * Las pérdidas en la ganancia de peso de los animales sometidos a dosis aguda, consideramos que se debe fundamentalmente a los efectos anoréxicos del lindano con esta dosis (60 mg/kg), y el periodo subsiguiente, relativamente corto (14 días), para su recuperación. Apoya esta hipótesis los datos de ganancia de peso respecto a la dosis subcrónica en la que no hay diferencias significativas entre controles y experimentales después de 30 días.
- * La acumulación máxima de lindano se da en el riñón, intermedia en el hígado y en menor concentración en cerebro, lo que se ciñe a las previsiones de nuestros objetivos como órganos de excrección, circulación y fijación, siendo fuertemente significativas las diferencias halladas en riñón con respecto al cerebro en ambas dosis, lo que podría aventurar una fijación con cierta permanencia.
- * Los drásticos descensos en la dopamina son similares, tanto en la dosis aguda como en la subcrónica, lo que apuesta a que las mismas cantidades de lindano mantienen el descenso de la amina.

CONSIDERACIONES GENERALES

CONSIDERACIONES GENERALES

A la vista del trabajo realizado, es preciso valorar la incidencia que un contaminante como el pesticida lindano puede tener en el medio dada su persistencia, bioacumulación y toxicidad, para todos los organismos, máxime cuando en nuestro país, la legislación no es muy estricta al respecto.

Este estudio pone de manifiesto lo que representa una intoxicación aguda y puntual que exhibe un cuadro alarmante, respecto de un envenenamiento progresivo y crónico que solapa toda sintomatología, pero que ocasiona los mismos daños.

Piense en el descenso de un neurotransmisor, como la dopamina, que regula variados mecanismos, desde la temperatura corporal de los animales, hasta su comportamiento, por citar algunos. Sin tratar de minimizar los efectos del lindano sobre el metabolismo en general o la irreversibilidad en el daño producido en los tejidos.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA.

- * ABBOT, D.C.; R. GOULDING y J. O'G. TATTON. 1968. "Organochlorine pesticide residues in human fat in Great Britain". Br. Med. J., vol.3, pgs. 146-149.
- * ADAMOVIC, V.M.; B. SOKIC y M. JOVANOVIC-SMILJANSKI. 1978. "Some observations concerning the ratio of the intake of organochlorine insecticides through food and amounts excreted in the milk of breast-feeding mothers". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 20, pgs. 280-285.
- * AHDAYA, S.M. y F.E. GUTHRIE. 1982. "Uptake of insecticides by intestinal epithelial cell suspensions isolated from mice". Bull. Environm. Contam. Toxicol., vol. 29, pgs. 76-83.
- * AKERA, T.; T.M. BRODY y N. LEELING. 1971. "Insecticide inhibition of Na-K-ATPase activity". Biochem. Pharmacol., vol. 20, pgs. 471-473.
- * ALDEGUNDE, M.; I. MARTIN; I. MIGUEZ y P. FERNANDEZ. 1981. "Estudios sobre el mecanismo de acción hipotermizante del gamma-hexaclorociclohexano". Acta Científica Compostelana, vol. XVIII (3), pgs. 145-154.
- * ALDEGUNDE, M.; M. PARAFITA y M.P. FERNANDEZ. 1983. "Effect of gamma-hexachlorocyclohexane on serotonin metabolism in rat brain". Gen. Pharmac., vol. XIV (2), pgs. 303-305.
- * ALLEN, J.R.; W.A. HARGRAVES y M.T. HSIA. 1984. "Comparative toxicology of chlorinated compounds on mammalian species" en: "Differential toxicities of insecticides and halogenated aromatics". Ed. F. Matsumura, Pergammon Press, Nueva York, pgs. 469-504.

- * ANDERSON, D.W. y J.J. HICKEY. 1972. "Eggshell changes in certain North American birds". Proc. XV Int. Ornithol. Cong., pgs. 514- 540.
- * ANDREWS, J.E. y L.E. GRAY. 1990. "The effects of lindane and linuron on calcium metabolism, bone morphometry and the kidney in rats". Toxicology, vol. 60, pgs. 99-107.
- * ANGSUBHAKORN, S.; N. BHAMARAPRAVATI; A. PRADERMWONG; N. IMEM-GAMOL y S. SAHAPHONG. 1989. "Minimal dose and time protection by lindane (gamma-isomer of 1,2,3,4,5,6 hexachlorocyclohexane) against liver tumors induced by aflatoxin B₁". Int. J. Cancer., vol. 43, pgs. 531-534.
- * ANTON, A.H. y D.F. SAYRE. 1964. J. Pharmacol. Exptl. Therap., vol. 145, pg. 326.
- * ANTUNES-MADEIRA, M.C.; A.P. CARVALHO y V.M.C. MADEIRA. 1981. Pestic. Biochem. Physiol., vol. 15, pgs. 79-89.
- * ANTUNES-MADEIRA, M.C. y V.M.C. MADEIRA. 1985. "Partition of lindane in synthetic and native membranes". Biochem. et Biophys. Acta, vol. 820, pgs. 165-172.
- * APPLE, J.L. 1977. "The theory of disease management", en: "Plant disease: an advanced treatise. Vol I. How disease is managed". Ed. Academic Press, Nueva York, pgs. 79-101.
- * BAKER, M.T.; R.M. NELSON y R.A. VAN DYKE. 1985. "The formation of chlorobenzene and benzene by the reductive metabolism of lindane in rat liver microsomes". Arch. Biochem. Biophys., vol. 236, pgs. 506-514.
- * BASHA, S.M.; K.S. PRASADA RAO; K.R.S. SAMBASIVA RAO y K.V. RAMANA RAO. 1984. "Respiratory potentials of fish (*Tilapia mo-*

- ssambica*) under malathion, carbaryl and lindane intoxication". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 32, pgs. 570-574.
- * BECKER, P.H. y H. SPERVESLAGE. 1989. "Organochlorines and heavy metals in herring gull (*Larus argentatus*) eggs and chicks from the same clutch". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 42, pgs. 721-727.
- * BEDDING, N.D.; A.E. MCINTYRE; R. PERRY y J.N. LESTER. 1982. "Organic contaminants in the aquatic environment. I Sources and Occurrence". Sci. Tot. Environ., vol. 25, pgs. 143-167.
- * BERTLER, A.; A. CARLSSON y E. ROSENGREN. 1958. Acta Physiol. Scand., vol. 44, pg. 273.
- * BILDEMAN, T.F.; E.J. CHRISTENSEN; W.N. BILLINGS y R. LEONARD. 1981. "Atmospheric transport of organochlorines in the North Atlantic gyre". J. Mar. Res., vol. 39, pgs. 443-464.
- * BLUS, L.J.; A.A. BELISLE y R.M. PROUTY. 1974. "Relations of the brown pelican to certain environmental pollutants". Pest. Monit. J., vol. 7, pgs. 181-194.
- * BLOTHGEN, VON, A.; W. VON HEESCHEN; A. TOLLE y J. HAMANN. 1977. "Tierexperimentelle Untersuchungen zum Carryover Chlorierter Kohlenwasserstoffe aus Futtermittel in die Milch". Milchwissenschaft, vol. 32, pgs. 57-66.
- * BLÜTHGEN, VON, A.; H. NIJHUIS; W. HEESCHEN Y J. HAMANN. 1979. "Parasitenbekämpfung und Rückstände in der Milch". Dtsch. Milchwirtsch., vol. 36, pgs. 1314-1319.
- * BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO. 1982. "Real Decreto 1423/1982 de 18 de Junio de 1982". B.O.E. de 29-VI-1982.
- * BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO. 1984. "Real Decreto 3349/1983 de 30 de Noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técni-

co-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas". B.O.E., nº20 1791, 24-I-1984.

- * BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO. 1989. "Orden de 27 de Octubre de 1989, sobre límites máximos de residuos de plaguicidas en productos vegetales. Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas aprobada por Real Decreto 3349/1983 de 30 de Noviembre (BOE de 24-I-84).
- * BOSCH VAN DEN, R. 1978. "The Pesticide Conspiracy". Ed. Doubleday and Company, Inc., Nueva York.
- * BOWMAN, M.C. 1964. "Chlorinated insecticides: fate in aqueous suspensions containing mosquito larvae". Science, vol. 146, pgs. 1480-1481.
- * BOWMAN, M.C. 1984. "A century of analytical excellence. Pesticides, their analysis and the AOAC: an overview of a century of progress (1884-1984)". J. Assoc. Off. Anal. Chem., vol. 67, pgs. 205-209.
- * BOYD, E.M. y C.P. CHEN. 1968. "Lindane toxicity and protein-deficient diet". Arch. Environ. Health., vol. 17, pgs. 156-163.
- * BROCHINSKIJ, K.K.; A.V. GRIB y I.V. GRIB. 1970. Hydrobiol, vol. 6, pgs. 107-109, 1970.
- * BROOKS, G.T. 1974. "Chlorinated Insecticides. Vol. II. Biological and Environmental Aspects". C. R. C. Press, Inc. Cleveland, 197 pgs.
- * BUNCK, C.M.; J.W. SPANN; O.H. PATTEE y W.J. FLEMING. 1985. "Changes in eggshell thickness during incubation: implications for evaluating the impact of organochlorine contaminants on

- productivity". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 35, pgs. 173-182.
- * CAMPBELL, M.A.; J. GYORKOS; B. LEECE; K. HOMONKO y S. SAFE. 1983. "The effects of twenty two organochlorine pesticides as inducers of the hepatic drug-metabolizing enzymes". Gen. Pharmacol., vol. 14, pgs. 445-454.
- * CAMON, L.; E. MARTINEZ; F. ARTIGAS; C. SOLA y E. RODRIGUEZ-FARRE. 1988. "The effect of non-convulsant doses of lindane on temperature and body weight". Toxicology, vol. 49, pgs. 389-394.
- * CANTON, J.H. & W. SLOOF. 1977. Water Res., vol. 11, pgs. 117-121.
- * CARLSON, L.A. y B. KOLMODIN-HEDMAN. 1972. Acta Med. Scand., vol. 192, pgs. 29-32.
- * CARLSSON, A. y B. WALDECK. 1958. "A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine)". Acta Physiol. Scand., vol. 44, pgs. 293-298.
- * CENTRO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIONES SOBRE EL CANCER. 1979a. "Hexachlorocyclohexane (technical HCH and lindane)" en Some halogenated hydrocarbons. (IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 20). Lion, pgs. 195-239.
- * CENTRO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIONES SOBRE EL CANCER. 1979b. Chemicals and industrial processes associated with cancer in humans. IARC Monographs, volumes 1 to 20, Lyon, pg. 16.
- * COCKS, J.A. 1973. Env. Poll., vol. 5, pgs. 149-151.
- * CONNEY, A.H. 1967. "Pharmacological implications of microsomal enzyme induction". Pharmacol. Rev., vol. 19, pgs. 317-366.

- * COOPER, R.L.; R.W. CHADWICK; G.L. REHNBERG; J.M. GOLDMAN; K.C. BOOTH; J.F. HEIN y W.K. MCELROY. 1989. "Effect of lindane on hormonal control of reproductive function in the female rat". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 99, pgs. 384-394.
- * COPELAND, M.F.; R.W. CHADWICK; N. COOKE; D.A. WHITEHOUSE y D.M. HILL. 1986. "Use of gamma-hexachlorocyclohexane (lindane) to determine the ontogeny of metabolism in the developing rat". *J. Toxicol. Environ. Health*, vol 18, pg. 527.
- * CREMLYN, R. 1982. "Plaguicidas Modernos y su Acción Bioquímica". Ed. Limusa, Mexico, D.F. 356 pgs.
- * CHADWICK, R.W.; M.F. CRANMER y A.J. PEOPLES. 1971. "Comparative stimulation of gamma-HCH metabolism by pretreatment of rats with gamma-HCH, DDT y DDT + gamma-HCH". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 18, pgs. 685-695.
- * CHADWICK, R.W. y J.J. FREAL. 1972. "Comparative acceleration of lindane metabolism to chlorophenols by pretreatment of rats with lindane or with DDT and lindane". *Food Cosmet. Toxicol.*, vol. 10, pgs. 789-795.
- * CHADWICK, R.W.; L.T. CHUANG y K. WILLIAMS. 1975. "Dehydrogenation: A previously unreported-pathway of lindane metabolism in mammals". *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 5, pgs. 575-586.
- * CHADWICK, R.W.; M.F. COPELAND; G.L. WOLFF; A.G. STEAD; M.L. MOLE y B.A. WHITEHOUSE. 1987. "Saturation of lindane metabolism in chronically treated (YSXVY)F₁ hibrid mice". *J. Toxicol. Environ. Health*, vol. 20, pg. 411.
- * CHADWICK, R.W.; R.L. COOPER; J. CHANG; G.L. REHNBERG y W.K. MCELROY. 1988a. "Lindane-induced obesity and lesions in the

reproductive system of female Fisher 344 rats". *The Toxicologist*, vol. 8, pg. 237.

- * CHADWICK, R.W.; R.L. COOPER; J. CHANG; G.L. REHNBERG y W.K. MCELROY. 1988b. "Possible antiestrogenic activity of lindane in female rats". *J. Biochem. Toxicol.*, vol. 3, pgs. 147-158.
- * CHAKRAVARTY, S. y P. LAHIRI. 1986. "Effect of lindane on egg-shell characteristics and calcium level in the domestic duck". *Toxicology*, vol. 42, pgs. 245-258.
- * CHISOLIN, J.S. y E.K. SILBERGELD. 1980. "Increased excretion of homovallinic acid (HVA) in urine by young children with increased lead absorption". *Neurosci. Abst.*, vol. 6, pg. 508.
- * CHOWDHURY, A.R.; H. VENKATAKRISHNA-BHATT y A.K. GAUTAM. 1987. "Testicular changes of rats under lindane treatment". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 38, pgs. 154-156.
- * DABRIO, M.V. 1979. "Cromatografía de gases I y II". Ed. Alhambra, Madrid, 405 pgs.
- * DAVID, D. 1976. "Anomalies structurales et dégénérescence des cellules germinales sous l'effet d'un pesticide organochloré: le DDT". *Bull. Soc. Zool. Fr.*, vol. 101(2), pgs. 341-347.
- * DAVID, D. 1977a. "Influence du DDT sur la population germinale gonádique d'embryons de Caille de cinq générations succesives". *C. R. Acad. Sci. Paris*, vol. 284(D), pgs. 949-952.
- * DAVID, D. 1977b. "Detection du DDT dans l'oeuf de Caille. Analyse quantitative". *C. R. Acad. Sci. Paris*, vol. 285(D), pgs. 1347-1350.
- * DAVIES, J.E.; H.V. DEDHIA; C. MORGADE; A. BARQUET y H. MAIBACH. 1983. "Lindane poisonings". *Arch. Dermatol.*, vol. 119, pgs. 142-144.

- * DEMAEL, A.; P. GUSTIN y D. LEPOT. 1984. "Influence d'une baisse modérée du pH de l'eau sur quelques activités enzymatiques du foie et sur certains composants sanguins de la Tanche (*Tinca tinca* L.). Ichthyophysiol. Acta, vol. 8, pgs. 75-91.
- * DEMAEL, A.; D. LEPOT; M. COSSARINI-DUNIER y G. MONOD. 1987. "Effect of gamma-hexachlorocyclohexane (lindane) on carp (*Cyprinus carpio*). II. Effects of chronic intoxication on blood, liver enzymes, and muscle plasmic membrane". Ecotoxicol. and Environ. Saf., vol. 13 (3), pgs. 346-351.
- * DEMOZAY, D. 1976. "Definition of lindane (nomenclature)" en: "Lindane II. Supplement 1976/77". Ed. E. Ulmann, Schillinger, Friburgo, pg. 8.
- * DESI, I. 1983. "Neurotoxicological investigation of pesticides in animals experiments". Neurobehavioural Toxicology and Teratology, vol. 5, pgs. 503-515.
- * DIKSHITH, T.S.S.; S.K. TANDON; K.K. DATTA; P.K. GUPTA y J.R. BEHARI. 1978. "Comparative response of male rats to parathion and lindane: Histo-pathological and biochemical studies". Environ. Res., vol. 17, pgs. 1-9.
- * DIKSHITH, T.S.S. 1986. "Interaction of hexachlorocyclohexane and malathion in male guinea pigs after repeated dermal applications". Vet. Hum. Toxicol., vol. 29 (2), pgs. 138-143.
- * DIKSHITH, T.S.S.; R.B. RAIZADA; M.K. SRIVASTAVA; S.N. KUMAR; R.A. KAUSHAL; R.P. SINGH; K.P. GUPTA y K. SREE LAKSHMI. 1989. "Dermal toxicity of hexachlorocyclohexane (HCH) in rabbit". Indian J. of Experim. Biol., vol. 27, pgs. 252-257.
- * EDWARDS, C.A. 1966. "Insecticide residues in soils". Residue Rev., vol. 13, pgs. 83-132.

- * EDWARDS, C.A. 1975. "Persistent pesticides in the environment". C.R.C. Press.
- * EEC DIRECTIVE 79/831. 1979. "Part. B: Methods for the determination of toxicity. Acute toxicity oral". Annex V, pgs. 200-207.
- * ECKERT, R.; D. RANDALL y G. AUGUSTINE. 1990. "Fisiología animal. Mecanismos y Adaptaciones". 3ª edición. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill, 683 pgs.
- * EL-GENDY, K.S.; A.S. EL-BAKARY y N.S. AHMED. 1986. "Effect of pesticides on some liver function tests in workers occupationally exposed and others not exposed to pesticides". J. Agric. Sci. Mansoura Univ. II (2), pgs. 821-825.
- * ELLIOT, J.E.; R.J. NORSTROM y J.A. KEITH. 1988. "Organochlorines and eggshell thinning in gannets from eastern Canada, 1968 to 1984". Environ. Pollut., vol. 52, pgs. 81-102.
- * ENGST, R.; R.M. MACHOLZ y M. KUJAKA. 1977. "Recent state of lindane metabolism". Residue Rev., vol. 68, pg. 59.
- * ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1980. "Manual of Analytical Methods for the Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples". Modification of Mills, Onley and Gaither method for the determination of multiple organochlorine pesticides and metabolites in human or animal adipose tissue. EPA-600/2-81-011. Section 5, 4, (1), (a), pgs. 1-19.
- * D'ERCOLE, A.J.; R.D. ARTHUR; J.D. CAIN & B.F. BARRENTINE. 1976. Pediatrics, vol. 57, pgs. 869-874.
- * FALANDYSZ, J. 1986. "Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in livers of cod from the southern Baltic, 1983". Z. Lebensm Unters Forsch, vol. 182, pgs. 224-227.

- * FAO/OMS. 1978. "Residuos de plaguicidas en los alimentos, 1977". Roma, FAO, pgs. 39-40.
- * FARIAS, E.; E. FOGEL; M.C. ALONZO; C. DECIA; R. ANTONAZ y C. SARROCA. 1980. "A correlation of levels of organochlorine pesticides in the blood and adipose tissue of non-exposed population of Montevideo-Uruguay".
- * FAWCETT, D.W. 1989. "Tratado de histología". 11ª edición. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill, 1026 pgs.
- * FELDMANN, R.J. y H.I. MAIBACH. 1974. "Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man". Toxicol. and appl. Pharmacol., vol. 28, pgs. 126-132.
- * FERNSTROM, J.D. y R.J WURTMAN. 1971. "Brain serotonin content: Physiological dependence on plasma tryptophan levels". Science, vol. 173, pgs. 149-152.
- * FITZLOFF, J.F.; J. PORTIG y K. STEIN. 1982. "Lindane metabolism by human and rat liver microsomes". Xenobiotica, vol. 12, pgs. 197-202.
- * FLEMING, R.M.; W.G. CLARK; E.D. FENSTER y J.E. TOWNE. 1965. Anal. Chem., vol. 37, pg. 692.
- * FLINT, M.L. y R. VAN DEN BOSCH. 1977. "A source book on integrated pest management". Univ. Calif. Int. Center for Integrated and Biol. Control, 392 pgs.
- * FLINT, M.L. y R. VAN DEN BOSCH. 1981. "Introduction to Integrated Pest Management". Ed. Plenum Press, Nueva York.
- * FOLEY, R.E.; S.J. JACKLING; R.J. SLOAN y M.K. BROWN. 1988. "Organochlorine and mercury residues in wild mink and otter: comparison with fish". Environ. Toxicol. and Chem., vol. 7, pgs. 363-374.

- * FRANK, R.; M. VAN HOVE HOLDRINET y P. SUDA. 1979. "Organochlorine and mercury residues in wild mammals in southern Ontario, Canada, 1973-74". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 22, pgs. 500-507.
- * FRANKE, W. 1971. Res. Rev., vol. 38, pgs. 81-115.
- * FRANSON, J.C.; P.A. DAHM y L.D. WING. 1974. "Chlorinated hydrocarbon insecticide residues in adipose, liver and brain samples from Iowa mink". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 11, pgs. 379-385.
- * FREAL, J.J. y R.W. CHADWICK. 1973. "Metabolism of hexachlorocyclohexane to chlorophenols and effects of isomer pretreatment on lindane metabolism in rat". J. of Agr. and Food Chem., vol. 21, pgs. 424-472.
- * FREDEEN, F.J.H. y J.R. DUFFY. 1970. Pest. Mon. J., vol. 3, pgs. 219-229.
- * GINSBERG, J. 1971. Pharmacol. Rev., pg.387.
- * GINSBURG, C.M. y col. 1977. "Absorption of lindane (gamma-benzene hexachloride) in infants and children". J. of Pediatrics, vol. 91 (6), pgs. 998-1000.
- * GIPS, T. 1988. "Breaking the Pesticide Habit: Alternatives to 12 Hazardous Pesticides". International Alliance for Sustainable Agriculture, 372 pgs.
- * GLADENKO, I. y col. 1967. "Accumulation and distribution of lindane in animal organisms poisoned with lindane". Myasnaya industria SSSR, vol. 7. pgs 37-38.
- * GLOWINSKI, J. y L.L. IVERSEN. 1966. "Catecholamines regional metabolism in rat brain". J. Neurochem., vol. 13, pgs. 655-669.

- * GOERKE, H. y W. ERNST. 1980. "Accumulation and elimination of ¹⁴C-gamma-HCH (lindane) in *Nereis virens* (Polychaeta) with consideration of metabolites". Helgoländer Meeresunters, vol. 33, pgs. 313-326.
- * GONZALEZ, L.M. y F. HIRALDO. 1988. "Organochlorine and heavy metal contamination in the eggs of the spanish imperial eagle (*Aquila (heliaca) adalberti*) and accompanying changes in egg-shell morphology and chemistry". Environ. Pollut., vol. 51, pgs. 241-258.
- * GONZALEZ RODRIGUEZ-CORDOBA , J.M.; A. LOPEZ FERNANDEZ y J. MARTINEZ HENS. 1983. "Relación materno-neonatal de los niveles de contaminación sanguínea por residuos de insecticidas organoclorados". Archivos de Zootecnia, vol. 32 (122), pgs. 49-60.
- * GONZALEZ-RODRIGUEZ, J.M.; J.M. CABANAS-ESPEJO; M. MARTINEZ y J. MUÑOZ-BLANCO. 1987. "Alterations in acetylcholinesterase activity in plasma and synaptosomal fractions from C.N.S. of rats acutely intoxicated with lindane, effect of succinylcholine". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 39, pgs. 647-655.
- * GOPALASWAMY, U.V. y A.S. AIYAR. 1986. "Biotransformation and toxicity of lindane and its metabolite hexachlorobenzene in mammals" en: "Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium". Ed. C.R. Morris y J.R.P. Cabral, Oxford, pgs. 267- 276.
- * GOTO, M. 1971. "Organochlorine compounds in the environments in Japan". Pest. Term. Res. Pure and Appl. Chem., pgs. 105-110.
- * GREENHALGH, R. y col. 1980. "Definition of persistence in pesticide chemistry". Pure Appl. Chem., vol. 52, pgs. 2565-2566.

- * GREGOR, D.J. y W.D. GUMMER. 1989. "Evidence of atmospheric transport and deposition of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in canadian arctic snow". Environ. Sci. Technol., vol. 23, pgs. 561-565.
- * GREICHUS, Y.A.; A. GREICHUS; B.D. AMMANN; D.J. CALL; D.C.D. HAMMAN y R.M. POTT. 1977. Arch. Environm. Contam. Toxicol. vol. 6, pg. 371.
- * GREICHUS, Y.A.; A. GREICHUS; H.A. DRAAYER y B. MARSHALL. 1978. Bull. Environm. Contam. Toxicol. pgs. 444-453.
- * GROVER, P.L. y P. SIMS. 1965. "The metabolism of 2,3,4,5,6-pentachlorocyclohex-1-ene and -hexachlorocyclohexane in rats". Biochem. J., vol. 96, pgs. 521-525.
- * HALLENBECK, W.H. y K.M. CUNNINGHAMBURNS. 1985. "Pesticides and Human Healt". Ed. Springer-Verlag. Nueva York.
- * HANIG, J.P. y col. 1976. "Convulsions in weanling rabbits after a single topical application of 1% lindane". Toxicol. and Applied Pharmacol., vol. 38, pgs. 463-469.
- * HENNY, C.J.; L.J. BLUS; S.V. GREGORY y C.J. STAFFORD. 1981. "PCBs and organochlorine pesticides in wild mink and river otters from Oregon". En Worldwide Furbearer Conference Proceedings, Worldwide Furbearer Conference, Inc., Eds. J.A. Chapman y D. Pursley, Frostburg, MD, pgs. 1763-1780.
- * HERBST, M. y G. BODENSTEIN. 1974. "Toxicology of lindane". En: "Lindane. Monograph of an Insecticide". Ed. Ullmann, E., Friburgo, 383 pgs.
- * HILL, E.P. y D.M. DENT. 1985. "Mirex residues in seven groups of aquatic and terrestrial mammals". Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 14, pgs. 7-12.

- * HRDINA, P.D.; D.A.V. PETERS y R.L. SINGHAL. 1974. "Role of nor-adrenaline, 5-hydroxytryptamine and acetylcholine in the hypothermic and convulsive effects of alfa-Chlordane in rats". Eur. J. Pharmac., vol. 26, pgs. 306-312.
- * HULTH, L.; R. LARSSON; R. CARLSSON y J.E. KIHLLSTROM. 1976. "Convulsive action of small single oral doses of the insecticide lindane". Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 16, pgs. 133-137.
- * INMAN, C.B.E. y A.P.M. LOCKWOOD. 1977. Comp. Biochem. Physiol., vol. 58C, pgs. 67-75.
- * IP, H.M.H. 1983. "Breast milk contaminants in Hong Kong". Bull. Hong Kong Med. Assoc., vol. 35, pgs. 1-16.
- * IP, H.M.H. y D.J.H. PHILLIPS. 1989. "Organochlorine chemicals in human breast milk in Hong Kong". Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol 18, pgs. 490-494.
- * JAEGER, U.; A. PODCZECK y A. HAUBENSTOCK. 1984. "Acute oral poisoning with lindane solvent mixtures". Vet. Hum. Toxicol., vol. 26, pgs. 11-14.
- * JAGER, K.W. 1970. "Aldrin, Dieldrin, Endrin and Telodrin: an epidemiological and toxicological study of long-term occupational exposure". Elsevier, Amsterdam, 234 pgs.
- * JAIN, N.C. y col. 1965. "Simplified gas chromatographic analysis of pesticides from blood". J. of Pharmacy and Pharmacol., vol. 17, pg. 362.
- * JEFFERIES, D.J. y M.C. FRENCH. 1971. "Hyper and hypothyroidism in pigeons fed DDT: an explanation for the thin eggshell phenomenon". Environ. Pollut., vol.1, pgs. 235-242.

- * JENEY, G.; J. NEMCS K y J. OL H. 1981. "Transaminase enzyme activity of cyprinid fishes depending on environmental factors and bacterial infection". Proceedings of an International Seminar. Szarvas, Hungary, pgs. 323-331.
- * JENSEN, A.A. 1983. "Chemical contaminants in human milk". Residue Reviews, vol. 89, pgs. 1-128.
- * JEYARATNAM, J.; K.C. LUN y W.O. PHOON. 1987. "Survey of acute pesticide poisoning among agricultural workers in four Asian countries". Bull. of the World Health Organ., vol. 65 (4), pgs. 521-527.
- * JOY, R.M. 1976. "Convulsive properties of chlorinated hydrocarbon insecticides in the cat central nervous system". Toxicol. Appl. Pharmacol., vol. 35, pg. 95-106.
- * JOY, R.M. 1982. "Mode of action of lindane, dieldrin and related insecticides in the central nervous system". Neurobehav. Toxicol. Teratol., vol. 4, pgs. 813-823.
- * JOY, R.M. y T.E. ALBERTSON. 1985. "Lindane and limbic system excitability". Neurotoxicol., vol. 6 (2), pgs. 193-214.
- * JOY, R.M.; S.M. VOGEL y T. NARAHASHI. 1987. "Effects of lindane upon transmitter release and end-plate responsiveness in the neuromuscular junction of the frog". Neuropharmacol., vol. 26 (8), pgs. 1223-1229.
- * JUNQUEIRA, V.B.C.; K. SIMIZU; L.A. VIDELA y S.B. DE M. BARROS. 1986. "Dose-dependent study of the effects of acute lindane administration on rat liver superoxide anion production, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation". Toxicol., vol. 41, pgs. 193-204.

- * KAPHALIA, B.S. y T.D. SETH. 1981. "DDT and BHC residues in some body tissues of goats, buffaloes and chicken". *Pest. Monit. J.*, vol. 15, pgs. 103-107.
- * KARAPALLY, J.C.; J.G. SAHA y Y.W. LEE. 1973. "Metabolism of lindane-¹⁴C in the rabbit: ether-soluble urinary metabolites". *J. Agr. Food Chem.*, vol. 21, pgs. 811-818.
- * KERR, S.R. y W.P. VOSS. 1973. "Environmental Pollution by Pesticides". Ed. Edwards, C.A.. Plenum Press.
- * KOCH, R.B.; D. DESAIAH; H.H. YAP y L.K. CUTKOMP. 1972. "Polychlorinated biphenyls effect of long-term exposure on ATPase activity in fish, *Pimephales promelas*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 7, pgs. 87-92.
- * KOLMODIN-HEDMAN, B.; B. ALEXANDERSON y F. SJOQVIST. 1971. "Effect of exposure to lindane on drug metabolism: Decreased hexobarbital sleeping-times and increased antipyrine disappearance rate in rats". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 20, pgs. 299-307.
- * KOLMODIN-HEDMAN, B. 1974. "Exposure to lindane and DDT and its effects on drug metabolism and serum lipoproteins". (Tesis Doctoral). Nordstedt, Estocolmo.
- * KORANSKY, W. y col. 1963. "Absorción, distribución y excreción de alfa- y gamma- hexaclorociclohexano". *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, vol. 244, pgs. 564-575.
- * KORSCHGEN, L.J. 1970. "Soil-food-chain-pesticide wildlife relationships in Aldrin-treated fields". *J. Wildl. Mgmt.*, vol. 34, pgs. 186-199.

- * KRAMER, M.S. y col. 1980. "Operational criteria for adverse drug reactions in evaluating suspected toxicity of a popular scabicide". Clin. Pharmacol. and Therapeut., vol. 27, pgs. 149-157.
- * KREBS, C.T.; I. VALIELA; G.R. HARVEY y J.M. TEAL. 1974. Mar. Poll. Bull., vol. 5, pgs. 140-142.
- * KREBS, C.T. y I. VALIELA. 1978. Est. Coast. Mar. Sci., vol. 6, pgs. 375-386.
- * KOHNEL, W. 1987. "Atlas de citología y anatomía microscópica". Ed. Omega, 2ª edición, Barcelona, 319 pgs.
- * KULKARNI, A.P. y E. HODGSON. 1984. "The metabolism of insecticides: the role of monooxygenase enzymes". Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., vol. 24, pg. 19.
- * KUPFER, D. 1967. "Effects of some pesticides and related compounds on steroid function and metabolism". Residue Rev., vol. 19, pgs. 11-30.
- * KURIHARA, N. y M. NAKAJIMA. 1974. "Studies BHC isomers and related compounds. VIII Urinary metabolites produced from alfa y beta-BHC in the mouse: Chlorophenols conjugates". Pestic. Biochem. Physiol., vol. 4, pg. 220.
- * KURIHARA, N.; K. TANAKA y M. NAKAJIMA. 1977. Agric. Biol. Chem., vol. 41, pgs. 1317-1319.
- * LAPORTE, P. 1982. "Organochlorine residues and eggshell measurements of great blue heron eggs from Quebec". Colonial Waterbirds, vol. 5, pgs. 95-103.
- * LAW, R.J.; C.R. ALLCHIN y J. HARWOOD. 1989. "Concentrations of organochlorine compounds in the blubber of seals from eastern and north-eastern England, 1988". Mar. Pollut. Bull., vol. 20

(3), pgs. 110-115.

- * LEEGAL, R.F.; K.O. BROSCHE y B. BUSH. 1985. "Oral dosing of rats with polychlorinated biphenyls increases urinary homovallic acid production". J. of Toxicol. and Environm. Health, vol. 15, pgs. 575-586.
- * LEHNER, P.N. y A. EGBERT. 1969. "Dieldrin and eggshell thickness in ducks". Nature, London, vol. 224, pgs. 1218-1219.
- * LEONI, V.; L. FABIANI; G. MARINELLI; G. PUCCHETTI, G.F. TARSITANI; A. DE CAROLIS; N. VESCIA; A. MORINI; V. ALEANDRI; V. POZZI; F. CAPPAL y D. BARBATUS. 1989. "PCB and other organochlorine compounds in blood of women with or without miscarriage: a hypothesis of correlation". Ecotoxicol. and Environ. Saf., vol. 17 (1), pgs. 1-11.
- * LIEVREMONT, M. y J. POTUS. 1981. "Distribution intracérébrale du lindane chez le rat: observation à court terme après administration d'une dose unique". C.R. Acad. Sci., Paris., vol. 292, pg. 1163.
- * LOPEZ-APARICIO, P.; N. DEL HOYO y M.A. PEREZ-ALBARSANZ. 1988. "Lindane distribution and phospholipid alterations in rat tissues after administration of lindane-containing diet". Pest. Biochem. and Physiol., vol. 31, pgs. 109-119.
- * LOPEZ FERNANDEZ, A.; J.M. GONZALEZ; F. FERNANDEZ y F. INFANTE. 1980. "Contaminación por insecticidas organoclorados en el cangrejo rojo americano de río, *Procambarus clarkii* Girard, de las marismas del Guadalquivir". Hygia Pecoris, vol. 2, nº 7, pgs. 39-52.
- * LOPEZ FERNANDEZ, A. 1980. "Relación entre la puvliometría y los niveles mensuales de residuos de insecticidas organoclo-

- rados del agua de un curso fluvial". Avances sobre la Investigación en Bioclimatología, pgs. 431-439.
- * LOPEZ FERNANDEZ, A. y F. INFANTE MIRANDA. 1981. "Residuos de insecticidas organoclorados en algunos ecosistemas acuáticos del SE de la provincia de Córdoba. I. Niveles en el agua". Archivos de zootecnia, vol. 30 (117), pgs. 193-210.
- * LOPEZ FERNANDEZ, A. y F. INFANTE MIRANDA. 1981. "Residuos de insecticidas organoclorados en algunos ecosistemas acuáticos del SE de la provincia de Córdoba. II. Niveles de contaminación y coeficientes de acumulación de los berros de agua (*Nasturtium officinale* R. Br.) y del caracol acuático (*Melanopsis* sp.)". Archivos de zootecnia, vol. 30 (118), pgs. 271-288.
- * LOPEZ FERNANDEZ, A. y F. INFANTE MIRANDA. 1982. "Residuos de insecticidas organoclorados en algunos ecosistemas acuáticos del SE de la provincia de Córdoba. III. Niveles en el cangrejo de río (*Austropotamobius pallipes* Lereb.)". Archivos de zootecnia, vol. 31 (119), pgs. 73-90.
- * LOVELOCH, J.E. y S.R. LYPSKI. 1960. J. Amer. Chem. Soc., vol. 82, pg. 431.
- * LUQUET, F.M.; J. GOURSAUD y J. CASALIS. 1974. "La pollution des laits humains francais par les residues de pesticides organochlores". L'Alim. Vie, vol. 62, pgs. 40-69.
- * LUTZ, H. 1974. "Pesticide et reproduction chez les homéothermes". Bull. Soc. Zool. Fr., vol. 99(1), pgs. 49-63.
- * LUTZ-OSTERTAG, V. y D. DAVID. 1974. "Preuves experimentales de l'action du DDT sur le maintieu des canaux de Muller de l'embryon male d'oiseau". Bull. Soc. Zool. Fr., vol. 99(4), pgs. 731-741.

- * LUTZ-OSTERTAG, V. y D. DAVID. 1977. "Effet du DDT sur l'appareil genital de la Caille. Etude sur plusieurs générations". Bull. Soc. Zool. Fr., vol. 102(1), pgs. 81-95.
- * MACEK, K.J. 1968. "Reproduction in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) fed sublethal concentrations of DDT". J. Fish. Res. Bd. Canada, vol. 25, pgs. 1787-1796.
- * MAGOUR, S.; H. MASER y I. STEFFEN. 1984. "Effect of lindane on synaptosomal Na⁺/K⁺-ATPase in relation to its subcellular distribution in the brain". Acta Pharmacol. et Toxicol., vol. 54, pgs. 299-303.
- * MAHOOD, R.K.; M.D. MCKENCIE; D.P. MIDDGAUGH; S.J. BOLLAR y J.R. DAVIS. 1970. Coastal Fish. Div. Contrib. Ser. nº19.
- * MARKS, T.S.; J.D. ALLPRESS y A. MAULE. 1989. "Dehalogenation of lindane by a variety of porphyrins and corrins". Appl. and Environ. Microbiol., vol. 55 (5), pgs. 1258-1261.
- * MARTINEZ-CONDE, E.; M. FERNANDEZ; I. MARTIN; A. ORTIZ y R. NIETO. 1983. "Investigación de residuos de pesticidas, en especial de insecticidas organoclorados, en las cuencas de los ríos Riansares, Cigüela y Zancara". Estudio realizado según Convenio de Colaboración entre la Dirección General de Medio Ambiente del M.O.P.U. y la Sociedad Española de Ornitología. 140 pgs.
- * MARTINEZ-CONDE, E.; J. CASTRO; A. LAGUNA y J. MALDONADO. 1990. "El lindano y su posible biotransformación en sistemas acuáticos". Instituto de Salud Pública de Navarra, 64 pgs.
- * MARTINEZ-CONDE, E.; J. CASTRO y J. V. ROVIRA. 1991. "Bioindicadores para detectar la posible impregnación por lindano en el río Ega". Dirección de Medio Ambiente de la Comunidad Foral de Navarra, 78 pgs.

- * MATHEWS, H.B. 1984. "Excretion of insecticides". En: "Differential toxicities of insecticides and halogenated aromatics". Ed. Matsumura F., Pergammon Press, Nueva York, pgs. 331-350.
- * MATSUMURA, F. y S.M. GHIASUDDIN. 1983. "Evidence for similarities between cyclodiene type insecticides and picrotoxinin in their action mechanisms". J. Environ. Health Sci., vol. 18, pgs. 1-14.
- * MENZEL, D.W., J. ANDERSON y A. RANDTKE. 1970. "Marine phytoplankton vary in their response to chlorinated hydrocarbons". Science, vol. 167, pgs. 1724-1726.
- * METCALF, C.L. 1930. "Obituary, Stephen Alfred Forbes, May 29, 1844-March 13, 1930". Entomol. News, vol. 41, pgs. 175-178.
- * METCALF, R.L. 1955. "Organic insecticides". Ed. Wiley, Nueva York, 392 pgs.
- * MIKOL, Y.B.; F. ROUX; F. DECLOITRE y E.P. FOURNIER. 1980. "Liver-enzyme induction in lindane and captan-treated rats". Food Cosmet. Toxicol., vol. 18, pgs. 377-382.
- * MILLER, E.C. y J.A. MILLER. 1974. "Biochemical mechanisms or chemical carcinogenesis". En: The molecular Biology of Cancer. Ed. H. Busch, New Yoek, 377 pgs.
- * MILLS, P.A.; J.H. ONLEY y R.A. GAITHER. 1963. "Rapid method for chlorinated residues in unfatty foods". Journal of Association Official Analitical Chemists (A.O.A.C.), vol. 46 (2), pgs. 186-191.
- * MILTON, J.S. y J.O. TSOKOS. 1983. "Statistic Methods in the Biological and Health Sciences". Ed. McGraw-Hill International Book Company.

- * MOODY, R.P. y L. RITTER. 1989. "Dermal absorption of the insecticide lindane (1 delta, 2 delta, 3 beta, 4 delta, 5 delta, 6 beta-hexachlorocyclohexane) in rats and rhesus monkeys: effect of anatomical site". J. of Toxicol. and Environ. Health, vol. 28, pgs. 161-169.
- * MORETEAU, B. y N. CHAMINADE. 1988. "Effets de l'intoxication par le lindane sur les concentrations en dopamine et 5-hydroxytryptamine dans le cerveau de *Locusta migratoria* L. (*Orthop. : Acrididae*)". Anns. Soc. ent. Fr., vol. 24 (1), pgs. 103-109.
- * MOSHA, R.D. 1984. "distribution and elimination of lindane in rabbits and goats". M.V.M.- disertation Sokoine Univ. Agric. Tanzania.
- * MOSHA, R.D.; N. GYRD-HANSEN y P. KRAUL. 1986. "Distribution and elimination of lindane in goats". Bull. Environm. Contam. Toxicol., vol. 36, pgs. 518-522.
- * MUIR, D.C.G. 1988. "Organochlorine chemical and heavy metal contaminants in white-beaked dolphins (*Lagenorhynchus albirostris*) and pilot whales (*Globicephala melaena*) from the coast of Newfoundland, Canada". Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 17, pgs. 613-629.
- * MUNK, Z.M. y A. NANTEL. 1977. "Acute lindane poisoning with development of muscle necrosis". Canadian Medical Association J., vol. 117, pgs. 1050-1054.
- * MUNOZ-BLANCO, J.; F. CORDOBA y J.M. GONZALEZ. 1982. "Efecto del lindano sobre los niveles de GABA y otros aminoácidos neurotransmisores en cerebro y cerebelo de rata". Revista Española de Fisiología, vol. 38, pgs. 355-358.

- * MUÑOZ-BLANCO, J.; B. YUSTA; M. MARTINEZ-LUQUE y J.M^a. GONZALEZ. 1985. "Actividad acetilcolinesterasa en plasma sanguíneo y diversas regiones del SNC de ratas intoxicadas con lindano. Efecto del pentobarbital sódico". Revista Española de Fisiología, vol. 41, pgs. 89-94.
- * MUSSALO-RAUHAMAA, H.; H. PYYSALO y K. ANTERVO. 1988. "Relation between the content of organochlorine compounds in finnish human milk and characteristics of the mothers". J. of Toxicol. and Environ. Health, vol. 25, pgs. 1-19.
- * NAGASAKI, S.; S. TOMII; T. MEGA; M. MARUGAMI y N. ITO. 1971. "Development of hepatomas in mice treated with benzene hexachloride". Gann., vol. 62, pg. 431.
- * NAKAYAMA, K. y T. AOKI. 1977. "Hazards of organic chlorine compounds to the health of children". Paediat., vol. 6, pgs. 9-19.
- * NARBONNE, P. y M. LIEVREMONT. 1983. "Increase of synaptosomal calcium uptake by lindane in vitro". C. R. Acad. Sci. Paris., vol. 296 (III), pgs. 811-814.
- * NASH, R.G. y E.A. WOOLSON. 1967. "Persistence of chlorinated hydrocarbon insecticides in soils". Science, vol. 157, pgs. 924-927.
- * NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. 1975. "Pest control: an assessment of present and alternative technologies. Vol. I. Contemporary pest control practices and prospects: the report of the executive committee". Nat. Acad. Sci. Pub., Washington, D.C., 506 pgs.
- * NEBERT, D.W. y C.C. SPRINGFIELD, Thomas, pgs. 207-219, 1974.

- * NEMCSOK, J.; I. BENEDECZKY; L. BOROSS; B. ASZTALOS y L. ORBAN. 1981. "Subcellular localization of transaminase enzymes in fishes and their significance in the detection of water pollution". *Acta Biologica Szeged.*, vol. 27, pgs. 9-15.
- * NIGAM, S.K.; B.C. LAKKAD; A.B. KARNIK; K.N. THAKORE; D.K. BHATT; K.A. BABU y S.K. KASHYAP. 1979. "Effect of HCH (hexachlorocyclohexane) feeding on testicular tissue of pure inbred Swiss mice". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 23, pgs. 431-437.
- * NIGAM, S.K.; B.C. LAKKAD; A.B. KARNIK y K.N. THAKORE. 1984. "Ultrastructural changes in liver of mice exposed to hexachlorocyclohexane". vol. 22, pgs. 199-204.
- * NYDICK, I.; P. RUEGSEGGER; F. WROBLEWSKI y J.S. LADUE. 1957. "Variations in serum glutamic-oxaloacetic transaminase activity in experimental and clinical coronary insufficiency pericarditis and pulmonary infarction". *Circulatio*, vol. 15, pgs. 324-334.
- * O'BRIEN, R.D. 1967. "Insecticides, Action and Metabolism". Ed. Academic Press. Nueva York, 332 pgs.
- * OHLENDORF, H.M.; E.E. KLAAS y T.E. KAISER. 1979. "Environmental pollutants and eggshell thickness: Anhingas and wading birds in the eastern United States". US Fish and Wildlife Service, Spec. Sci. Rep. Wildlife, nº 216.
- * ORDISH, G. 1976. "The Constant Pest: A Short History". Ed. Charles Scribners and Sons, Nueva York. 204 pgs.
- * ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 1981. "Especificaciones para plaguicidas utilizados en salud pública". Ginebra, pgs. 45-64.

- * PARK, K.S. y W.N. BRUCE. 1968. "The determination of the water solubility of Aldrin, Dieldrin, Heptachlor, and Heptachlor epoxide". J. Econ. Entomol., vol. 61, pgs. 770-774.
- * PATEL, T.B. y M.B. RAO. 1958. "Dieldrin poisoning in man. A report of 20 cases observed in Bombay state". Brit. Med. J., vol. 1, pgs. 919-921.
- * PEAKALL, D.B. 1970a. "p,p'-DDT: effect on calcium metabolism and concentration of estradiol in the blood". Science, vol. 168, pgs. 592-594.
- * PEAKALL, D.B. 1970b. "Pesticides and the reproduction of birds". Scientific Amer., vol. 222 (4), pgs. 72-78.
- * PEAKALL, D.B. 1976. "The peregrine falcon, *Falco peregrinus*, and pesticides". Canadian Field Naturalist, vol. 90(3), pgs. 301-307.
- * PETERLE, T.J. 1967. VII Congrès des Biologistes du Gibier, 1965.
- * PHILLIPS, D.J.H. 1985. "Organochlorines and trace metals in green lipped mussels *Perna viridis* from Hong Kong waters: a test of indicator ability". Mar. Ecol. Prog. Ser., vol. 21, pgs. 251-258.
- * PORTIG, J.; P. KRAUS; K. STEIN; W. KORANSKY; G. NOACK; B. GROSS y S. SODOMANN. 1979. "Glutathione conjugates from hexachlorocyclohexenes and pentachlorocyclohexenes by rat liver *In vitro*". Xenobiotica, vol. 9, pgs. 353-378.
- * PORTIG, J. y K. STEIN. 1981. "Neuropharmacological effects of isomers of hexachlorocyclohexane-2: selective inhibition of (myo-) clonic seizures as a sequel to CNS excitation by the gamma isomer". Neuropharmacol., vol. 20, pgs. 773-780.

- * PORTIG, J. y C. SCHNORR. 1988. "The potency of gamma-1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane (lindane)". *Toxicology*, vol. 52, pgs. 309-321.
- * PRIMO, E. y J.H. CARRRASCO. 1977. "Química Agrícola". Ed. Alhambra S.A. México.
- * PUBLICOVER, S.J. y C.J. DUNCAN. 1979. "The action of lindane in accelerating the spontaneous release of transmitter at the frog neuromuscular junction". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, vol. 381, pgs. 179-182.
- * RADOMSKI, J. y col. 1971. "Blood levels of organochlorine pesticides in Argentina - occupationally and nonoccupationally exposed adults, children and newborn infants". *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, vol. 20, pgs. 186-193.
- * RAISBECK, M.F.; J.D. KENDALL y G.E. ROTTINGHAUS. 1989. "Organochlorine Insecticide Problems in Livestock". *Clinical Toxicology*, vol. 5 (2).
- * RAMADE, F. 1976. "La pollution par les composés organohalogénés". *La Recherche*. vol. 69, pgs. 628-637.
- * RATCLIFFE, D.A. 1970. "Changes attributed to pesticides in egg breakage frequency and eggshell thickness in some British birds". *J. Appl. Ecol.*, vol. 7, pgs. 67-115.
- * REINBOLD, K.A.; I.P. KAPOOR; W.F. CHILDERS; W.N. BRUCE y R.L. METCALF. 1951. *Bull. Ill. St. Nat. Surv.*, vol. 30, pgs. 405-415.
- * REIJNDERS, P.J.H. 1980 "Organochlorine and heavy metal residues in harbour seals from the Wadden Sea and their possible effects on reproduction". *Neth. J. Sea Res.*, vol. 14, pgs. 30-65.

- * REITMAN, S. y S. FRANKEL. 1957. Amer. J. Clin. Path., vol. 28, pgs. 56-63.
- * ROBINSON, J.R.; J.S. FELTON; R.C. LEVITT; S.S. THORGEIRSSON y D.W. NEBERT. 1975. "Relation-ship between "aromatic hydrocarbon responsiveness" and the survival times in mice treated with various drugs and environmental compounds". Mol. Pharmacol., vol. 11, pgs. 850-865.
- * ROEDER, K.D. y E.A. WEIANT. 1946. "The site of action of DDT in the cockroach". Science, vol. 103, pgs. 304-306.
- * RUIZ, V.M.; H. URZURA y J. ROMERO. 1986. "Contaminación con DDT y nutrición nitrogenada de especies forrajeras". Anales 2º encuentro científico sobre el medio ambiente. Tomo 1. CIPMA. Santiago de Chile.
- * SAXENA, M.C.; M.K.J. SIDDIQUI; A. BHARGAVA; T.D. SETH; C.R. KRISHNAMURTI y D. KUTTY. 1980. "Role of chlorinated hydrocarbon pesticides in abortions and premature labour". Toxicol., vol. 17, pgs. 323-331.
- * SAXENA, M.C. 1981. "Organochlorine pesticides in specimens from women undergoing spontaneous abortion, premature or full-term delivery". J. Anal. Toxicol., vol. 5, pgs. 6-9.
- * SCHIMMEL, S.C; J.M. PATRICK y P. FORESTER. 1977. "Toxicity and bioconcentracion of BHC and lindane in selected estuarine animals". Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 6, pgs. 355-363.
- * SCHROEDER, M.E.; D.L. SHANKLAND y R.M. HOLLINGWORTH. 1977. "The effects of dieldrin and isomeric aldrin diols on synaptic transmission in the American cockroach and their relevance to the dieldrin poisoning syndrome". Pest. Biochem. Physiol., vol. 7, pgs. 403-415.

- * SHANKLAND, D.L. y M.E. SCHROEDER. 1973. "Pharmacological evidence for discrete neurotoxic action of dieldrin in the american cockroach *Periplaneta americana*". Pesticide Biochem. Physiol., vol. 3, pgs. 77-86
- * SHAW, G. 1983. "Organochlorine pesticide and PCB residues in eggs and nestlings of tree swallows, *Tachycineta bicolor*, in Central Alberta". Canadian Field-Naturalist, vol. 98 (2), pgs. 258-260.
- * SHIVANANDAPPA, T. y M.K. KRISHNAKUMARI. 1983. "Hexachlorocyclohexane-induced testicular dysfunction in rats". Acta Pharmacol. Toxicol., vol. 52, pgs. 12-17.
- * SIRCAR, S. y P. LAHIRI. 1990. "Effect of lindane on mitochondrial side-chain cleavage of cholesterol in mice". Toxicology, vol. 61, pgs. 41-46.
- * SKAARE, J.U.; J.M. TUVENG y H.A. SANDE. 1988. "Organochlorine pesticides and polychlorinated bipheyls in maternal adipose tissue, blood, milk, and cord blood from mothers and their infants living in Norway". Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 17, pgs. 55-63.
- * SLOLEY, B.D.; B.A. BAILEY y R.G.H. DOWNER. 1985. "Effects of chlordimeform and lindane on monoamine levels in the central nervous system of the american cockroach, *Periplaneta americana* L.". Pestic. Biochem. Physiol., vol. 24, pgs. 213-219.
- * SMITH, R.F.; J.L. APPLE y D.G. BOTTRELL. 1976. "The origins of integrated pest management concepts for agricultural crops". En: "Integrated pest management". Eds. J.L. Apple y R.F. Smith, Plenum Press, Nueva York, pgs. 1-16.

- * SOKAL, R.R. y F.J. ROHLF. 1979. "Biometry. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica". 2ª edición. Ed. H. Blume, 832 pgs.
- * SOLBAKKEN, J.E. 1985. Uptake and elimination of lindane and a phthalate ester in tropical Corals and mussels". *Mar. Environ. Res.*, vol. 16, pgs. 103-113.
- * SOLOMON, L.M.; L. FAHRNER y D.P. WEST. 1977. "Gamma benzene hexachloride toxicity: A review". *Arch. Dermatol.*, vol. 113, pgs. 353-357.
- * SOLOMON, L.M. 1988. "Lindane". *Arch. Dermatol.*, vol. 124 (3), pgs. 321-322.
- * STARR, H.G. y N.J. CLIFFORD. 1972. "Acute lindane intoxication". *Arch. of Environ. Health*, vol. 25, pgs. 374-375.
- * STEIN, K.; J. PORTIG y W. KORANSKY. 1977. "Oxidative transformation of hexachlorocyclohexane in rats and with rat liver microsomes". *N. S. Arch. Pharmacol.*, vol. 298, pgs. 115-128.
- * STEIN, K.; J. PORTIG; H. FUHRMANN; W. KORANSKY y G. NOACK. 1980. "Steric factors in the pharmacokinetics of lindane and alfa-hexachlorocyclohexane in rats". *Xenobiotica*, vol. 10, pg. 65.
- * SUNOL, C.; J.M. TUSELL; E. GELPI y E. RODRIGUEZ-FARRE. 1988. "Regional concentrations of GABA, serotonin, and noradrenaline in brain at onset of seizures induced by lindane (gamma-hexachlorocyclohexane)". *Neuropharmacol.*, vol. 27 (7), pgs. 677-681.
- * TANABE, S.; H. TANAKA y R. TATSUKAWA. 1984. "Polychlorobiphenyls, DDT, and hexachlorocyclohexane isomers in the western

- North Pacific ecosystem". Arch. Environ. Contam. Toxicol., vol. 13, pgs. 731-738.
- * TANAKA, K.; N. KURIHARA y M. NAKAJIMA. 1977. "Pathways of chlorophenol formation in oxidative biodegradation of BHC". Agr. and Biol. Chem., vol. 41, pgs. 723-725.
 - * TANAKA, K.; N. KURIHARA y M. NAKAJIMA. 1979 "Studies on BHC isomers and related compounds. XXIII. Oxidative metabolism of lindane and its isomers with microsomes from rat liver and house fly abdomen". Pestic. Biochem. Physiol., vol. 10 pgs. 96-103.
 - * TATSUKAWA, R. 1977. "Environmental behavior and fate of persistent organochlorines". Eisei Kagaku, vol. 31, pgs. 1-7.
 - * TIMMONS, F.L. 1970. "A history of weed control in the United States and Canada". Weed Sci., vol. 18, pgs. 294-307.
 - * THORGEIRSSON, S.S. y P.J. WIRTH. 1979. "Genetic aspects of metabolic processing of chemical substances". J. Toxicol. Environ. Health, vol. 5, pgs. 83-87.
 - * TUSELL, J.M.; C. SUNOL; E. GELPI y E. RODRIGUEZ-FARRE. 1987. "Relationship between lindane concentration in blood and brain and convulsant response in rats after oral or intraperitoneal administration". Arch. Toxicol., vol. 60, pg. 432.
 - * TUSELL, J.M.; C. SUNOL; E. GELPI y E. RODRIGUEZ-FARRE. 1988. "Effect of lindane at repeated low doses". Toxicology, vol. 49, pgs. 375-379.
 - * UCHIDA, M.; Y. IRIE; T. FUJITA y M. NAKAJIMA. 1975. "Effects of Nereis-toxin on the neuro-excitatory action of insecticides". Pest. Biochem. Physiol., vol. 5, pgs. 253-257.

- * ULLMANN, E. 1972. "Lindane. Monograph of an Insecticide". Freiburg im Breisgau, West Germany, Verlag K. Schillinger, 383 pgs.
- * UNITED NATIONS SECRETARIAT/ GENERAL ASSEMBLY. 1984. "Consolidated list of products whose consumption and/or sale have been banned, withdrawn, severely restricted or not approved by governments". 273 pgs.
- * VALIN, C.C. VAN, A.K. ANDREWS y L.L. ELLER. 1968. "Some effects of Mirex on two warm-water fishes". Trans. Amer. Fish. Soc., vol. 97, pgs. 185-196.
- * VIVES DE QUADRAS, J.M. 1988. "Control de plagas de insectos. Problemas y alternativas", pgs. 3-14 en: "Insecticidas biorracionales". X. Bellés. C.S.I.C. Colección Nuevas Tendencias, nº 9, 405 pgs.
- * VIDELA, L.A.; S.B. DE M. BARROS; K. SIMIZU y V.B.C. JUNQUEIRA. 1988. "Liver and biliary levels of glutathione and thiobarbituric acid reactants after acute lindane intoxication". Cell Biochem. and function, vol. 6, pgs. 47-52.
- * WAFFORD, K.A.; S.C.R. LUMMIS y D.B. SATTELLE. 1989. "Block of an insect central nervous system GABA receptor by cyclodiene and cyclohexane insecticides". Proc. R. Soc. Lond., vol. 237, pgs. 53-61.
- * WALLACE, J.B. y U.E. BRADY. 1971. Pest. Mon. J., vol. 5, pg. 295.
- * WANG, C.M.; T. NARAHASHI y M. YAMADA. 1971. "The neurotoxic action of dieldrin and its derivatives in the cockroach". Pest. Biochem. Physiol., vol. 1, pgs. 84-91.

- * WARE, G.W. 1983. "Pesticides; Theory and Application". Ed. W.H. Freeman & Co. San Francisco. 208 pgs.
- * WELCH, A.S. y B.L. WELCH. 1969. "Solvent extraction method for simultaneous determination of norepinephrine, dopamine, serotonin and 5-hydroxyindole-acetic acid in a single mouse brain". *Analytical Biochemistry*, vol. 30, pgs. 161-179.
- * WELLS, P.G. y E.C.A. TO. 1986. "Murine acetaminophen hepatotoxicity temporal interanimal variability in plasma glutamic-pyruvic transaminase profiles and relation to in vivo chemical covalent binding". *Fund. and Appl. Toxicol.*, vol. 7, pgs. 17-25.
- * WESTER, R.C.; H.I. MAIBACH; D.A.W. BUCKS y R.H. GUY. 1983. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, vol. 68, pg. 116.
- * von WESTERNHAGEN, H.; H. ROSENTHAL; V. DETHLESEN; W. ERNST; M. HARMS y P.D. HANSEN. 1981. "Bioaccumulating substances and reproductive success in baltic flounder *Platichthys flesus*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 1, pgs. 85-99.
- * WESTÖÖ, G. y K. NOREN. 1978. "Organochlorine contaminants in human milk, Stockholm, 1967-1977". *Ambio*, vol. 7, pgs. 62-64.
- * WILLIAMS, B.L. y K. WILSON. 1981. "Principios y Técnicas de Bioquímica Experimental". Ed. Omega, Barcelona, 270 pgs.
- * WOODWELL, G.M.; C.F. WURSTER y P.A. ISAACSON. 1967. "DDT residues in an East Coast estuary: a case of biological concentration of a persistent insecticide". *Science*, vol. 156, pgs. 821-824.
- * WOOLLEY, D.; L. ZIMMER; Z. HASAN y K. SWANSON. 1984. "Do some insecticides and heavy metals produce long-term potentiation in the limbic system?" en: "Cellular and Molecular Neurotoxi-

- cology". Ed. T. Narahashi, Raven Press, Nueva York, pgs. 45-69.
- * WOOLLEY, D.; L. ZIMMER; D. DODGE y K. SWANSON. 1985. "Effects of lindane-type insecticides in mammals: unsolved problems". *Neurotoxicol.*, vol. 6 (2), pgs. 165-192.
 - * WOOLLEY, D.E. y J.A. GRIFFITH. 1989. "Kinetics and thresholds of several indices of lindane-induced toxicity". *Pharmacol. Biochem. & Behav.*, vol. 33, pgs. 787-792.
 - * WORLD HEALTH ORGANIZATION REPORT. 1982. "Recommended health-based limits in occupational exposure to pesticides". World Health Organization Technical Report Series 677.
 - * WROBLEWSKI, F. y J.S. LADUE. 1956. "Serum glutamic-pyruvic transaminase (SGP-T) in hepatic disease: A preliminary report". *Ann. Internal Med.*, vol. 45, pgs. 801-811.
 - * WURSTER, C.F. 1969a. "Chlorinated hydrocarbon insecticides and the world ecosystem". *Biological Conservation*, vol. 1(2), pgs. 123-129.
 - * WURSTER, C.F. 1969b. "Chlorinated hydrocarbon insecticides and avian reproduction: how are they related?", pgs. 368-389 en: "Chemical Fallout: Current Research on Persistent Pesticides". Ed. M.W. Miller & G.G. Berg, C.C. Thomas, Springfield, Ill., 531 pgs.
 - * YVELIN, C.; J.M. YVELIN y M. LIEVREMONT. 1984. "Uptake and transformation of lindane by the liver during short exposure times". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 32, pg. 140.
 - * ZHU, J.; Z. FENG y J. CHEN. 1986. "Studies on the distribution and fate of [γ - 3 H] hexachlorocyclohexane in rats". *Pest. Biochem. Physiol.*, vol. 25, pg. 414.