

## ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE LAS DIFERENCIAS SEXUALES EN LA SENSIBILIDAD A LA PROCAINA EN RATAS (\*)

Studies on the mechanism of the sexual differences in the sensitivity to procaine in rats.

CARLOS PAEILE, SERGIO GUERRERO, IRIS CAMPOS, ELIANA MUÑOZ, LUSITANIA NOVOA y CARLOS MUÑOZ

*Instituto de Farmacología, Universidad de Chile. Casilla 12967, Santiago, Chile.*

Recibido para su publicación el 29 de Abril de 1964

### RESUMEN

Se estudió la dosis letal media (DLM) de procaína administrada por vía intraperitoneal en ratas de ambos sexos, sometidas a diversas condiciones experimentales.

Administrando la procaína con una velocidad de 2 mg por 100 g de peso corporal y por minuto se observó que en las ratas impúberes (30 a 40 días de edad) la DLM fue del orden del 60% de la que se obtuvo inyectando 3,5 mg por rata y minuto. En cambio, la DLM observada en los adultos fue de la misma magnitud con los dos métodos. Se confirmó que en las ratas adultas la DLM es más alta en los machos que en las hembras.

La DLM en las ratas machos tratadas crónicamente con  $\text{CCl}_4$  fue significativamente menor que la de los machos testigos y del mismo orden que la de las hembras sometidas al mismo tratamiento con  $\text{CCl}_4$ . La DLM en estas últimas fue semejante a la de las hembras testigos. En las ratas tratadas con  $\text{CCl}_4$  no hubo diferencia en la DLM entre castradas y enteras.

En los grupos de ratas a las que previamente se inyectó  $\beta$ -dietilaminoetil-difenilpropilacetato (SKF 525-A) se observó una disminución de la DLM de procaína a cerca de un tercio en los machos y a cerca de la mitad en las hembras. No se observaron diferencias entre sexos en la DLM obtenida después de la administración de esta droga.

La actividad procainesterásica del plasma fue del mismo orden en ambos sexos y ni la castración ni el tratamiento con  $\text{CCl}_4$  influyeron significativamente sobre ella.

### INTRODUCCIÓN

En un trabajo anterior (1) hemos demostrado que las ratas machos son más resistentes a los efectos tóxicos de la procaína que las hembras y que esta diferencia entre sexos no se observa en las ratas menores de 60 días. En los machos castrados la resistencia a la procaína es menor que en los normales, pero siempre superior a la de las hembras. En éstas la castración no modifica la sensibilidad a los efectos tóxicos de la procaína. La

administración de testosterona a ratas gonadectomizadas de ambos sexos no modifica la dosis letal media de procaína. La concentración de procaína en el plasma en el momento de la muerte es semejante en los machos y en las hembras y la actividad procainesterásica es mayor en el hígado de las ratas machos (1), lo que indica que las diferencias observadas podrían ser la consecuencia de una inactivación más rápida de la procaína en las ratas machos. Sin embargo, en los machos jóvenes, en los cuales la dosis letal de procaína fue equivalente a la de las hembras de la misma edad, la actividad procainesterásica del hígado fue significa-

(\*) Esta investigación fue financiada por la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Proyecto Nº 59.3) y por la Fundación Rockefeller (Grant Nº 63015), bajo un programa conjunto.

tivamente mayor que en las hembras. En consecuencia, parece probable que además de la inactivación hepática podrían intervenir otros factores que expliquen esta diferencia entre sexos.

En el presente trabajo se estudia la dosis letal de procaína en ratas de ambos sexos sometidas a: (i) intoxicación por  $\text{CCl}_4$  que se sabe que ocasiona daño hepático, y (ii) inyección previa de  $\beta$ -dietilaminoetil - difenilpropilacetato (SKF 525-A), substancia que inhibe diversos procesos enzimáticos y entre ellos la hidrólisis de la procaína (2, 3). Se estudia también la actividad procainesterásica del plasma de ratas de ambos sexos, con el objeto de conocer la participación eventual de la inactivación plasmática de la procaína en las diferencias sexuales observadas.

#### MÉTODO

Se utilizaron ratas blancas de ambos sexos de la colonia del Instituto. El peso de las ratas adultas fluctuó entre 180 y 300 g y el de las impúberes de 30 a 40 días de edad, entre 30 y 50 g.

La dosis letal media (DLM) de clorhidrato de procaína en animales no anestesiados fue determinada mediante inyección intraperitoneal continua de una solución al 2% con una velocidad aproximada de 0.1 ml por 100 g de peso corporal y por minuto, utilizando un aparato de inyección continua Palmer. Se registraron los movimientos respiratorios y el electrocardiograma. El momento de la muerte se reconoció por una disminución muy brusca de la frecuencia cardíaca que coincide con inversión de las ondas P y que es simultánea o precede por algunos segundos a la parálisis respiratoria.

*Determinación de la actividad procainesterásica.* La actividad procainesterásica de homogenizados de hígado se determinó mediante la técnica descrita por Ting y Coon (4), dosificando la procaína y el ácido p-aminobenzoico por el método espectrofotométrico descrito por Ting *et al.* (5).

La actividad procainesterásica del plasma se determinó incubando a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos 1 ml de plasma con 1 ml de solución  $2,2 \times 10^{-4}$  M de procaína y 7,5 ml de solución amortiguadora de fosfatos de pH 7,4, y el ácido p-aminobenzoico se dosificó en la misma forma que en el hígado.

*Intoxicación crónica con tetracloruro de carbono.* Se estudió la influencia del tratamiento con  $\text{CCl}_4$  sobre la dosis letal de procaína en ratas que fueron sometidas a inhalación de esta substancia en campana cerrada durante un minuto diario por espacio de 4 meses. Se ha demostrado que con este procedimiento la casi totalidad de los animales presentan degeneración grasa y cirrosis del hígado (6).

*Acción del SKF 525-A.* La influencia del SKF 525-A sobre la dosis letal de procaína se estudió administrando una dosis de 50 mg/kg por vía intraperitoneal, treinta minutos antes de iniciar la inyección lenta de procaína. Para determinar la influencia del SKF 525-A sobre la actividad procainesterásica del hígado se administró también en dosis de 50 mg/kg, por la misma vía, 30 minutos antes de sacrificar los animales.

#### RESULTADOS

##### *Influencia de la velocidad de inyección en la DLM de procaína*

La DLM de procaína en los grupos de ratas de ambos sexos aparece en la Tabla I. Los resultados confirman que en ratas adultas esta dosis es significativamente mayor en los machos. En cuanto a las ratas impúberes, la DLM fue semejante en machos y hembras, y del mismo orden que en las hembras adultas. Si se comparan las DLM obtenidas en las ratas jóvenes de ambos sexos mediante la inyección de 2,0 mg por 100 g y por minuto encontradas en este trabajo, con las observadas inyectando 3,5 mg por minuto, independientemente del peso (1) (machos:  $799 \pm 38,7$  y hembras:  $707 \pm 23,3$ ), se observa que con el actual método de inyección estas son apreciablemente menores ( $P < 0,001$ ).

##### *Influencia de la intoxicación crónica con $\text{CCl}_4$ en la DLM de procaína*

Los resultados obtenidos en los grupos de ratas adultas normales y castradas, sometidas a tratamiento con  $\text{CCl}_4$  se presentan en la Tabla II. Al comparar los datos con los obtenidos en ratas adultas normales (Tabla I) se observa que en los ani-

TABLA I

*Dosis letal media (DLM) de procaína determinada mediante inyección intraperitoneal continua en ratas*

Sexo	Edad días	N	DLM procaína mg/kg (*)
♂	> 100	11	$656 \pm 74,0$
♀	> 100	11	$446 \pm 11,2$
♂	30 — 40	13	$441 \pm 20,4$
♀	30 — 40	14	$468 \pm 18,1$

(\*) Media aritmética  $\pm$  error típico.

TABLA II

*Dosis letal media (DLM) de procaína en ratas adultas sometidas a tratamiento crónico con CCl<sub>4</sub>*

Sexo	Condición	N	DLM procaína mg/kg (*)
♂	Enteras	8	486 ± 5,0
♀	Enteras	8	453 ± 27,1
♂	Castradas	7	447 ± 33,0
♀	Castradas	8	441 ± 43,6

(\*) Media aritmética ± error típico.

males tratados con CCl<sub>4</sub> la DLM disminuyó significativamente en los machos y no se modificó en las hembras. En las ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> no hubo diferencia en la DLM entre castradas y enteras de ambos sexos.

#### *Influencia del SKF 525-A*

La DLM de procaína en ratas adultas de ambos sexos que recibieron previamente SKF 525-A (Tabla III) fue significativamente inferior ( $P < 0,001$ ) a la observada en los testigos y en las ratas machos tratadas con CCl<sub>4</sub>. No hubo diferencia significativa entre la DLM de machos y hembras en las ratas tratadas con SKF 525-A.

La actividad procainesterásica de homogenizados de hígado de ratas tratadas previamente con esta droga (Tabla IV) fue significativamente mayor en machos que en hembras. No se observó diferencia entre la actividad procainesterásica del hígado de animales tratados con SKF 525-A y de testigos no tratados.

TABLA III

*Dosis letal media (DLM) de procaína en ratas adultas tratadas previamente con SKF 525-A (50 mg/kg intraperitoneal)*

Sexo	N	DLM procaína mg/kg (*)
♂	13	223 ± 7,9
♀	10	241 ± 4,9

(\*) Media aritmética ± error típico.

TABLA IV

*Influencia de la administración de SKF 525-A sobre la actividad procainesterásica del hígado de ratas adultas*

Sexo	Condición	N	Hidrólisis de procaína mg/kg (*)
♂	SKF 525-A	7	47,6 ± 4,7
♀	SKF 525-A	7	26,3 ± 4,0
♂	Testigos	8	41,3 ± 3,5
♀	Testigos	8	21,8 ± 1,5

(\*) Porcentaje de hidrólisis producida en una hora de incubación; media aritmética ± error típico.

#### *Actividad procainesterásica del plasma*

La actividad procainesterásica del plasma de ratas adultas de ambos sexos, enteras, castradas o intoxicadas con CCl<sub>4</sub> se muestran en la Tabla V. En ella puede apreciarse que si bien la actividad del plasma en los machos testigos aparece algo más elevada que en las hembras testigos, la diferencia no es estadísticamente significativa ( $P > 0,2$ ). La actividad enzimática fue sensiblemente igual en los animales castrados de ambos sexos. En las ratas tratadas con CCl<sub>4</sub> la actividad procainesterásica del plasma fue semejante en machos y hembras y no difirió significativamente de la correspondiente a los testigos respectivos.

TABLA V

*Actividad procainesterásica del plasma de ratas en diversas condiciones experimentales*

Sexo	Condición	N	Hidrólisis de procaína (*)
♂	Testigos	15	19,7 ± 3,91
♀	Testigos	12	14,8 ± 1,30
♂	Castradas	9	18,8 ± 2,78
♀	Castradas	8	17,9 ± 2,81
♂	CCl <sub>4</sub>	7	13,9 ± 2,12
♀	CCl <sub>4</sub>	9	14,0 ± 1,38

(\*) Porcentaje de hidrólisis producida en una hora de incubación; media aritmética ± error típico.

## DISCUSIÓN

La determinación de la DLM de procaína empleando un procedimiento en el que se administran cantidades equivalentes de este fármaco por unidad de peso y por minuto, permitió confirmar que las ratas machos adultas son más resistentes a la procaína que las hembras adultas (1). Los resultados obtenidos en ratas impúberes con el método empleado en este trabajo, si bien demostraron que la DLM fue significativamente menor ( $P < 0,001$ ) que la encontrada cuando la droga se administró con mayor velocidad (1), confirmaron que a esta edad no existe diferencia entre sexos con respecto a la DLM de procaína. Estos hechos comprueban la observación de que el factor determinante de la diferencia sexual en la DLM de procaína aparece después de los 40 días de edad.

La coincidencia entre la mayor actividad procainesterásica del hígado y la mayor DLM de la procaína observada en los machos adultos, la nivelación de la DLM en machos y hembras como consecuencia del tratamiento crónico con  $\text{CCl}_4$  y de la administración de SKF 525-A, así como la observación previa (1) de que el nivel sanguíneo de procaína en el momento de la muerte es semejante en ambos sexos, constituyen argumentos experimentales para aceptar que la diferencia sexual se debe a una mayor velocidad de inactivación de la procaína en las ratas machos adultas, y una fuerte presunción en el sentido de que esta diferencia radica en sistemas enzimáticos del hígado sensibles a  $\text{CCl}_4$ . En cambio, los resultados obtenidos en los estudios sobre actividad procainesterásica del plasma muestran que ésta no desempeña un papel importante en la diferencia observada entre machos y hembras.

Al parecer en las ratas machos adultas existe una actividad enzimática que no está presente en las hembras, pues el tratamiento con  $\text{CCl}_4$  no modifica la DLM de procaína en las hembras, mientras que ocasiona disminución en la DLM de los machos hasta el mismo nivel que el de las hembras. En cambio el SKF 525-A parece actuar sobre los sistemas enzimáticos que inactivan la procaína y que están presentes en ambos sexos.

El hecho de que el SKF 525-A administrado previamente a las ratas cuyos hígados se estudian *in vitro* no haya alterado la actividad procainesterásica no permite concluir que esté desprovisto de actividad inhibitoria sobre los sistemas enzimáticos del hígado responsables de la inactivación de la procaína. En efecto, no es imposible que en estas condiciones experimentales la concentración de SKF 525-A haya sido inferior a la eficaz. Este asunto está siendo estudiado en experimentos en que esta droga se agrega *in vitro*, en diversas concentraciones.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Edwin J. Fellows de Smith Kline and French Laboratories el habernos proporcionado el SKF 525-A utilizado en estos experimentos.

## SUMMARY

A significant sex difference in the sensitivity to procaine in rats has been previously reported (1). In order to have a better understanding of the mechanism involved in this difference, the mean lethal dose (MLD) of procaine injected *i. p.* in rats of both sexes in different experimental conditions was studied.

When a 2% solution of procaine hydrochloride was continuously administered to unanesthetized rats at a rate of 2 mg per 100 g body weight per minute, the MLD in young animals (30 to 40 days old) was markedly reduced as compared with that previously obtained injecting procaine at a rate of 3.5 mg per rat per minute (1). The MLD in adult rats was in a similar range with both rates of administration. The fact that the MLD of procaine is higher in male adult rats than in adult females was confirmed (Table I).

The MLD of procaine in rats chronically treated with carbon tetrachloride was similar in males and females and corresponding to the level of the normal females; *i. e.* treatment with  $\text{CCl}_4$  induced a significant decrease of the MLD in males and did not modify that of the females (Table II).

In rats previously treated with SKF 525-A (50 mg/kg *i. p.*) the MLD of procaine was similar in both sexes and sig-

nificantly lower than in untreated or CCl<sub>4</sub> treated rats (Table III).

The procainesterase activity found in liver homogenates of rats pre-treated with SKF 525-A was not significantly different from that of untreated rats (Table IV).

The procainesterase activity of blood plasma was not significantly different in male and female rats nor was modified by gonadectomy or by chronic treatment with CCl<sub>4</sub> (Table V).

#### REFERENCIAS

- 1.— MUÑOZ, C., GUERRERO, S., PAEILE, C. y CAMPOS, I. — *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* **3**:445, 1961.
- 2.— COOPER, J. R., AXELROD, J. y BRODIE, B. B. — *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* **112**: 55, 1954.
- 3.— BRODIE, B. B. — *J. Pharm. and Pharmacol.* **8**:1, 1956.
- 4.— TING, K. S. and COON, J. M. — *Curr. Res. Anesth.* **29**:263, 1950.
- 5.— TING, K. S., COON, J. M. and CONWAY, A. C. — *J. Lab. Clin. Med.* **34**:822, 1949.
- 6.— MUÑOZ, E., SOLODKOWSKA, W., CANCINO, E. y FIGUEROLA, I. — Por publicar.