

Trabajo Científico

Hepatotoxicidad subaguda y crónica producida por el plaguicida paratión-metílico en la rata

Acute and chronic hepatotoxicity produced by methyl parathion pesticide in the rat

Víctor Hugo Fuentes Delgado,¹ Cindy L. Quezada Aguilera,¹ Ma. Consolación Martínez Saldaña,¹ Fernando Jaramillo Juárez,¹ Ma. Luisa Rodríguez Vázquez,¹ Francisco Jaramillo González,¹ José Luis Reyes Sánchez²

¹ Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes

² Depto. de Fisiología y Biofísica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN

Resumen

El paratión metílico (PM) es un plaguicida organofosforado usado en la agricultura. En el humano es absorbido por diferentes vías. En este trabajo se investigó el daño hepático de ratas Wistar tratadas con PM. En la exposición subaguda (3 mg/kg/día, oral, 20 días) encontramos incrementos significativos ($p < 0.05$) en las actividades séricas de TGO (500 %) y TGP (937 %), necrosis hepática, aumento en la concentración de malondialdehído (213 %) y disminución de la concentración de ATP en el hígado (29.3 %). En la exposición crónica al PM (0.56 mg/Kg/día, oral, 6 semanas) hubo vacuolización citoplásmica de los hepatocitos (inclusiones de lípidos), particularmente en el área centrolobulillar del hígado. Concluimos que el PM produce daño hepático oxidativo y estructural en la exposición subaguda y daño estructural en la intoxicación crónica.

Abstract

Methyl parathion (PM) is an organophosphate pesticide widely used in agriculture. In the human it is absorbed through different routes. In this work, we investigated the liver damage induced by PM in male Wistar rats. At the subacute exposition (3 mg/kg/day, oral, 20 days) there were a significant increase ($p < 0.05$) in the serum activities of GOT (500 %) and GPT (937 %), hepatic necrosis, the malondialdehyde concentration significantly increased (213 %) and the ATP concentration decreased (29.3 %) in the liver. At the chronic exposition (0.56 mg/kg/day, oral, 6 weeks) there was an extensive vacuolization in the hepatocytes (lipid accumulation), mainly in the central lobe area of the liver. We concluded that PM produces hepatic oxidative damage and necrosis in the subacute exposition as well as structural damage in the chronic exposition.

Palabras clave: metil-paratión, plaguicidas organofosforados, estrés oxidante, daño hepático.

Key words: methyl parathion, organophosphate pesticides, oxidative stress, hepatic damage.

Correspondencia

Dr. Fernando Jaramillo Juárez
Universidad Autónoma de Aguascalientes
Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Fisiología y Farmacología
Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, CP 20131
Aguascalientes, Ags., México
Tel: (449)-910-8400, Fax (449)-910-8401
e-mail: jara@att.net.mx

Fecha de recepción: 25 de marzo de 2011
Fecha de recepción de modificación: 8 de julio de 2011
Fecha de aceptación: 12 de agosto de 2011

Introducción

Los plaguicidas organofosforados (POF) son compuestos usados frecuentemente en la agricultura como insecticidas y fungicidas, además tienen otras aplicaciones como helminticidas, acaricidas y nematocidas.^{1,2,3,4} El paratión metílico (PM) es uno de estos compuestos que es absorbido en los mamíferos por diferentes vías (oral, dérmica y pulmonar), se distribuye rápidamente en los tejidos corporales y se metaboliza en el hígado generando al metabolito activo paraoxón metílico⁵. Las intoxicaciones agudas por POF son muy frecuentes y sus efectos nocivos se deben principalmente a la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) en el sistema nervioso central y periférico, lo que ocasiona la acumulación de acetilcolina en las sinapsis colinérgicas y la potenciación de su estímulo sobre los receptores colinérgicos (muscarínicos y nicotínicos) de ambos sistemas.^{6,7,8,9} Los efectos generales que resultan de la acumulación de acetilcolina son: potenciación de la actividad parasimpática postganglionar, despolarización persistente del músculo esquelético y estimulación inicial de las células del sistema nervioso central seguida por depresión de las mismas.^{7,10} La muerte puede ocurrir por paro respiratorio debido a la acción sinérgica derivada del bloqueo del centro de la respiración, broncoespasmo y parálisis de los músculos respiratorios.¹¹ La Dosis Letal-50 (DL-50) del PM es de 14 mg/kg de peso corporal en ratas machos adultos.^{12,13}

Los POF también producen toxicidad subaguda y crónica aunque se conoce menos acerca de estos fenómenos. Al respecto, ha sido descrito que en los trabajadores expuestos a estos compuestos se presentan tiempos de protrombina aumentados¹⁴, mientras que en las ratas tratadas con diazinón o malatión se modifica el tiempo de coagulación de la sangre.¹⁵ Además, se ha reportado que en ratas expuestas al diazinón aumenta la liberación de glucosa hepática (glucogenólisis) como un mecanismo de acción no colinérgico.¹⁶ Estudios recientes relacionan la toxicidad inducida por los POF con un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (estrés oxidante celular).^{17,18}

En este contexto, debido a la importancia del hígado en el mantenimiento de la homeostasis corporal y a su gran capacidad para metabolizar xenobióticos, el objetivo de este trabajo fue investigar el daño oxidante y las alteraciones estructurales de este órgano producidas por el PM, administrado a ratas Wistar en forma subaguda y crónica.

Material y método

Se usó paratión-metílico grado técnico (95% de pureza) (Cheminova Agro de México, S. A. de C. V.), el cual fue disuelto en aceite de maíz libre de antioxidantes. Todos los demás reactivos utilizados fueron grado analítico (JT Baker). Se trabajó con ratas Wistar machos (250 g \pm 20 g), las cuales fueron colocadas en jaulas limpias y tuvieron acceso libre al

agua y al alimento para roedores (Ralston Rations-Kansas, KA). La temperatura ambiente fue de 24 \pm 2 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h. El cuidado y manejo de los animales se hizo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana establecida para ello (NOM-062-ZOO-1999).

Protocolos experimentales

a) Estudios de toxicidad subaguda

Las ratas fueron distribuidas en dos grupos (N=9/grupo): testigos y tratados. Los animales tratados recibieron PM (3 mg/kg/día, vía oral) disuelto en aceite de maíz, durante 20 días, mientras que los animales testigos solamente recibieron aceite de maíz, por vía oral, durante 20 días. Al finalizar el tratamiento, se obtuvieron muestras de sangre de la arteria caudal de las ratas y se determinaron las actividades séricas de las transaminasas glutámico-pirúvica (GPT) y glutámico-oxalacética (GOT).¹⁹ Al finalizar el tratamiento, los animales fueron sacrificados y se cuantificaron las concentraciones hepáticas de malondialdehído (MDA)²⁰ y de ATP.²¹ Además, se obtuvieron muestras de hígado para analizar su estructura. Con este propósito, los hígados de 3 ratas fueron fijados *in situ* por vía intravascular y procesados mediante la técnica histológica por inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes de 5 μ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H/E). El análisis de los cortes se realizó por microscopía óptica. Se revisaron 3 laminillas con tejido hepático de cada rata y se determinaron las alteraciones estructurales de los hepatocitos.

b) Estudios de toxicidad crónica

Las ratas se dividieron en dos grupos: testigos (N=12) y tratados (N=18). Los animales tratados recibieron PM (0.56 mg/kg/día, oral) disuelto en aceite de maíz, durante 6 semanas. El grupo testigo recibió solamente aceite de maíz, por vía oral, en volúmenes equivalentes a los animales del grupo tratado. Al finalizar la cuarta y sexta semanas de tratamiento, se obtuvieron muestras de hígados de 3 ratas para realizar su evaluación estructural, utilizando la técnica descrita en el apartado anterior. Los cortes (5 μ m de espesor) se tiñeron con H/E y PAS (reacción del ácido peryódico de Schiff) y se analizaron por microscopía óptica. Se revisaron 3 laminillas con tejido hepático de cada rata y se determinaron las alteraciones estructurales de los hepatocitos.

c) Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de este estudio son expresados como la media (\pm error estándar). Las comparaciones estadísticas se hicieron con la prueba *t-Student*, considerando las diferencias significativas con $P < 0.05$.

Resultados y discusión

En las últimas décadas, el uso de los POF se ha incrementado de manera importante lo que ha permitido su distribución amplia en el ambiente y la generación de efectos nocivos sobre los seres vivos. La contaminación del humano por los plaguicidas se realiza de forma directa o indirecta. La primera es consecuencia de la exposición de los trabajadores que sintetizan

estos compuestos o de las personas que los aplican (agricultores, jardineros y fumigadores). La segunda resulta de la exposición de la población a los plaguicidas por accidentes, contaminación del ambiente y por los residuos de estas sustancias en los alimentos.^{22,23}

a) Estudios de toxicidad subaguda

La toxicidad de los plaguicidas organofosforados (POF) originalmente fue caracterizada por su acción inhibitoria de la acetilcolinesterasa (AChE) y las alteraciones de la transmisión colinérgica en los mamíferos.²⁴ Posteriormente, algunos estudios demostraron otros efectos nocivos de estos compuestos que no estaban relacionados de manera directa con la inhibición de esta enzima²⁵. Al respecto, la exposición del humano y de los animales a los plaguicidas puede desencadenar procesos nocivos como el estrés oxidante celular.²⁶

Debe señalarse que la toxicidad de un xenobiótico se relaciona con la dosis ingerida y el tiempo de exposición. En este trabajo, los animales de experimentación recibieron PM a dosis bajas (2/10 de la DL-50 por día, durante 20 días), lo cual fue suficiente para dañar al hígado. En efecto, con relación al grupo control, las ratas tratadas con PM presentaron los siguientes efectos tóxicos:

1) Las actividades plasmáticas de las transaminasas estudiadas aumentaron de manera significativa: TGO (500 %) y TGP (937 %) (Figuras 1 y 2). El incremento de las actividades séricas de estas enzimas se relaciona con el proceso de necrosis celular. Cuando esto sucede, las transaminasas antes citadas pasan a la sangre en cantidades proporcionales a la lesión tisular. Conviene señalar que la actividad plasmática de la TGO aumenta cuando hay lesión en la mayoría de los órganos y que la TGP es específica para el hígado. Esto facilita la identificación de hepatopatías y de otros padecimientos.^{27,28} En este contexto, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por otros autores, ya que ha sido descrito que las actividades séricas de la TGO y TGP aumentan en ratas machos y hembras, luego de la intoxicación aguda con PM²⁹. Además, se ha reportado que la exposición de ratas Wistar al PM, durante tres meses, disminuye significativamente la concentración de grupos tioles (-SH) libres y unidos a proteínas, en el hígado y los riñones. Esto fue relacionado con la capacidad del PM para producir estrés oxidativo.³⁰

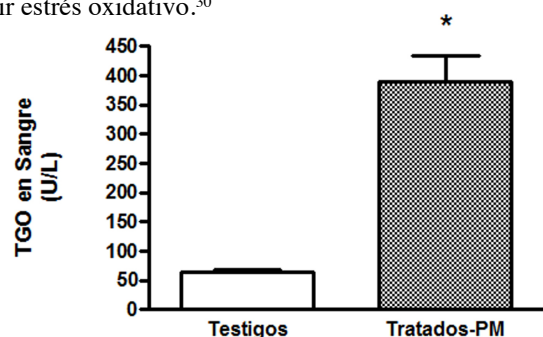


Figura 1. Actividad de la transaminasa glutámico-oxalacético (TGO) en ratas Wistar machos tratados con paratión-metilico (3 mg/kg/día, oral, 20 días). Se presentan los valores medios (\pm eem), (* $P<0.05$).

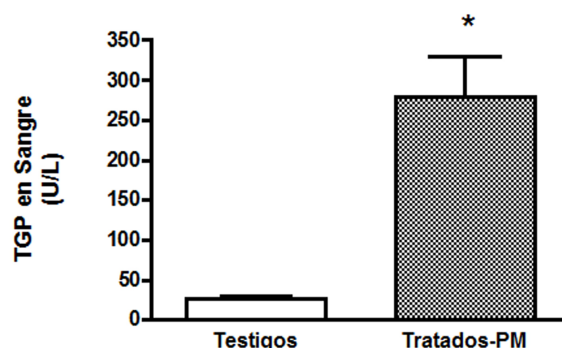


Figura 2. Actividad de la transaminasa glutámico-pirúvica (TGP) en ratas Wistar machos tratados con paratión-metilico (3 mg/kg/día, oral, 20 días). Se presentan los valores medios (\pm eem), (* $P<0.05$).

2) La concentración hepática de malondialdehído (MDA) aumentó significativamente (213 %) (Figura 3). La membrana plasmática de las células se compone principalmente de fosfolípidos, los cuales tienen en su estructura ácidos grasos poliinsaturados que le dan fluidez. Estos ácidos grasos pueden ser atacados por las especies reactivas de oxígeno que aumentan durante el estrés oxidante, provocando el proceso de lipoperoxidación, lo que altera la integridad y función de la membrana y puede conducir a su destrucción.³¹ En efecto, en años recientes se ha encontrado que los POF pueden dañar a las células generando estrés oxidante y alterando el sistema antioxidante. Al respecto, ha sido publicado que estos plaguicidas incrementan la formación de isoprostanos F_2 y de neuroprostanos F_4 (biomarcadores in vivo de la peroxidación lipídica y de la generación de especies reactivas de oxígeno), así como de citrulina, un marcador de la generación de óxido nítrico y de especies reactivas nitrogenadas.^{32,33}

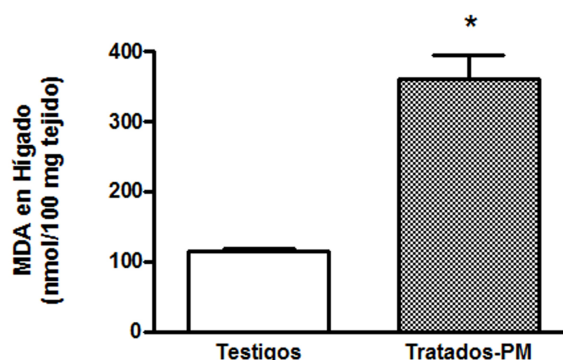


Figura 3. Concentración de malondialdehído (MDA) en el hígado de ratas Wistar machos tratados con paratión-metilico (3mg/kg/día, oral, 20 días). Se presentan los valores medios (\pm eem), (* $P<0.05$).

En este contexto, ha sido descrito que la exposición subcrónica de ratas Wistar al plaguicida organofosforado malatión (100-1500 ppm), durante cuatro semanas, aumenta las actividades de la catalasa y de la superóxido dismutasa, así como la concentración de malondialdehído en el hígado y en los eritrocitos³⁴. También se ha reportado que en ratas Wistar machos expuestos a dosis crecientes de malatión (25-150 mg/kg, durante 28 días) se genera daño oxidativo en el sistema nervioso central al finalizar el tratamiento.³⁵

3) La concentración de trifosfato de adenosina (ATP) en el hígado disminuyó de manera significativa (29.3 %) (Figura 4). Ha sido reportado que durante el estrés oxidativo generado por los POF puede incrementarse el consumo de ATP e inhibirse la fosforilación oxidativa, lo que compromete la capacidad de las células para mantener sus niveles energéticos.^{33,36} Además, la membrana de las mitocondrias también puede ser dañada por las especies reactivas de oxígeno (lipoperoxidación) disminuyendo con ello la síntesis de ATP.³¹

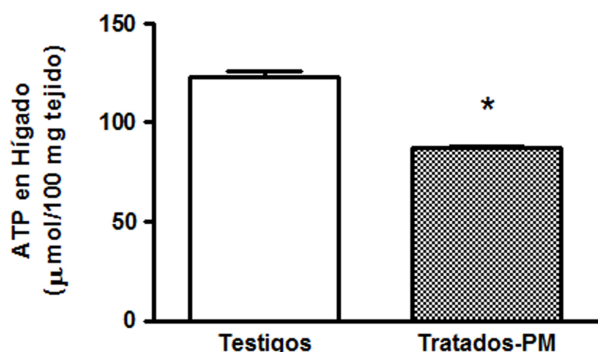


Figura 4. Actividad de la transaminasa glutámico-pirúvica (TGP) en ratas Wistar machos tratados con paratión-metilico (3mg/kg/día, oral, 20 días). Se presentan los valores medios (\pm eem), (* $P < 0.05$).

En relación con los fenómenos nocivos anteriormente expuestos, también se ha reportado que el PM altera la estructura de la cromatina y el tamaño del ADN de los espermatozoides maduros de ratones expuestos a este plaguicida (3-20 mg/kg, vía intraperitoneal), a los 7 o 28 días de tratamiento. Los autores de este trabajo postulan la participación del estrés oxidativo en esa acción tóxica y señalan el riesgo potencial para los descendientes de los animales expuestos al PM.³⁷

4) Estudio estructural

El estudio histológico de los hígados del grupo control no presentó alteraciones estructurales en las células ni en la organización tisular (Figura 5-A). En los hígados de las ratas tratadas con PM se observó muerte por necrosis de algunos hepatocitos e infiltrado inflamatorio (Figura 5-B). La necrosis celular se correlaciona de manera estrecha con el incremento significativo de las actividades séricas de las transaminasas (TGO y TGP) estudiadas en este trabajo. De forma particular, el incremento de la TGP se utiliza como un marcador de daño hepático.^{27,29}

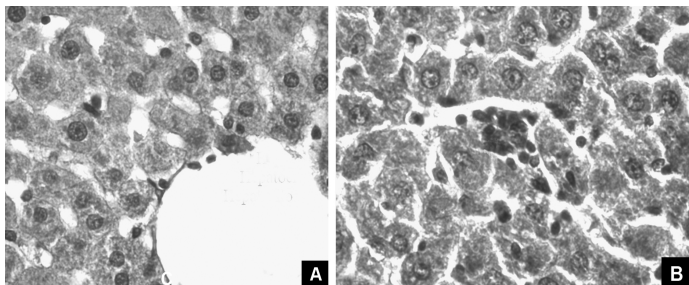


Figura 5. Microfotografía del hígado. A: rata control, B: rata tratada con PM (3 mg/kg, oral, 20 días) (H/E AT 400 X).

b) Toxicidad crónica

Los hígados de las ratas del grupo control mostraron una estructura y organización normal de los hepatocitos (Figuras 6-A y 7-A). En los hígados de las ratas tratadas con PM durante 4 semanas, la cito-arquitectura fue normal pero disminuyó el volumen de los hepatocitos, además, se presentó una evidente vacuolización en el citoplasma (inclusiones de lípidos), la cual fue muy acentuada en las áreas centrolobulillares (Figuras 6-B y 7-B). A su vez, a las 6 semanas de tratamiento con PM, los hígados de las ratas presentaron hepatocitos con disminución importante en la vacuolización del citoplasma, con persistencia en la reducción del volumen celular y con una organización histológica normal (Figuras 6-C y 7-C). Finalmente, a las 4 y 6 semanas de tratamiento con PM, los hígados de las ratas presentaron hepatocitos con granulaciones citoplásmicas PAS positivas (Figuras 8-B y 8-C). La intensidad de reacción disminuyó a las 4 y 6 semanas de tratamiento (Figuras 9-B y 9-C). Las granulaciones citoplásmicas identificadas con la tinción de PAS corresponden a inclusiones de glucógeno.

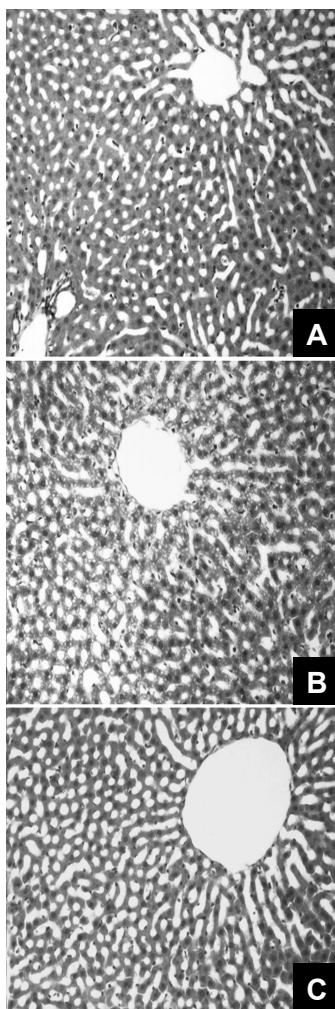


Figura 6. Microfotografía del hígado. A: rata control, B: rata tratada con PM (0.56 mg/kg, oral) durante 4 semanas, C: rata tratada con PM (idem dosis) durante 6 semanas. (H/EAT 100 X).

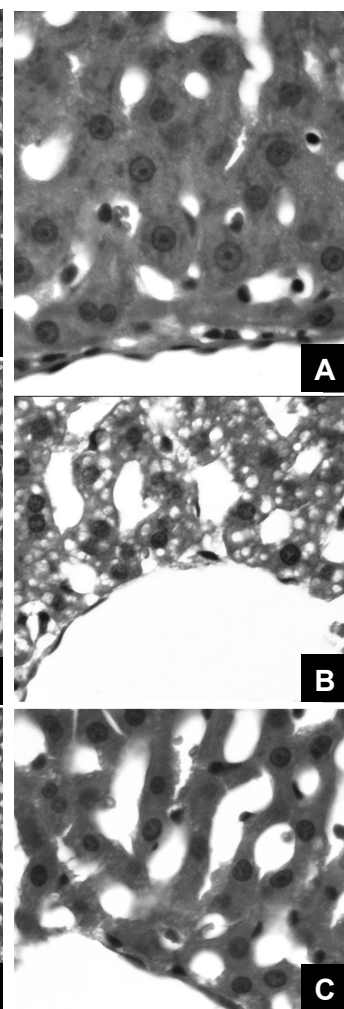


Figura 7. Microfotografía del hígado. A: rata control, B: rata tratada con PM (0.56 mg/kg, oral) durante 4 semanas, C: rata tratada con PM (idem dosis) durante 6 semanas. (H/EAT 400 X).

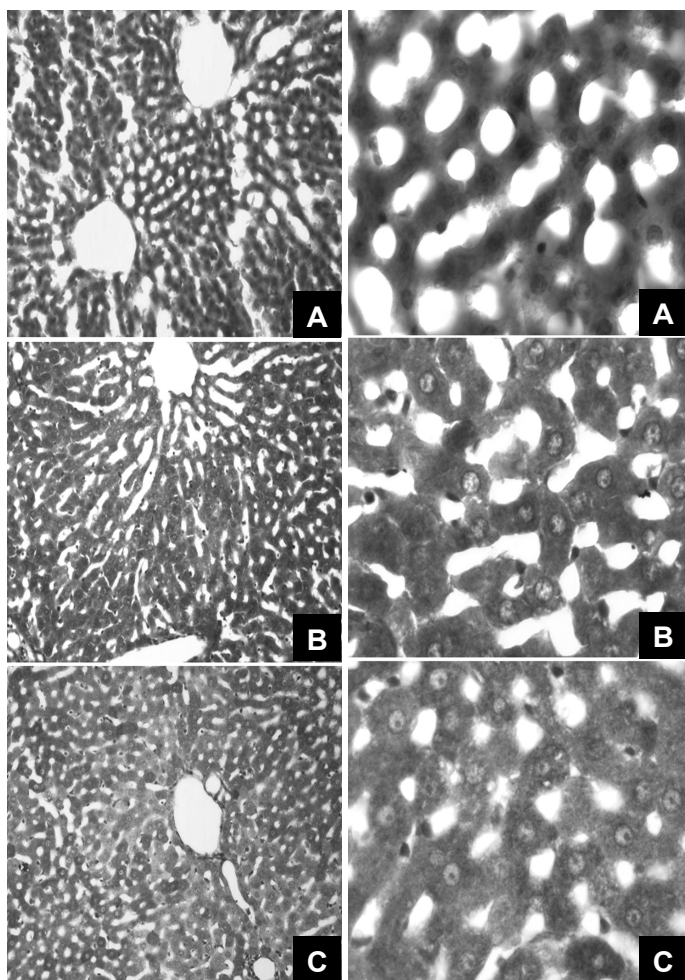


Figura 8. Microfotografía del hígado. A: rata control, B: rata tratada con PM (0.56 mg/kg, oral) durante 4 semanas, C: rata tratada con PM (idem dosis) durante 6 semanas. (PAS AT 100X).

Figura 9. Microfotografía del hígado. A: rata control, B: rata tratada con PM (0.56 mg/kg, oral) durante 4 semanas, C: rata tratada con PM (idem dosis) durante 6 semanas. (PAS AT 400X).

Nuestros resultados muestran alteraciones estructurales en los hepatocitos de las ratas tratadas con PM (incremento en el depósito de lípidos y disminución de glucógeno) que variaron en función del tiempo de tratamiento. Los efectos nocivos del PM sobre el hígado se pueden relacionar con su acción inhibidora de algunas esterasas con residuos de serina en su sitio activo, como la colinesterasa plasmática (PCE) y la hidroximetil-glutaril-coenzima A-reductasa (HMG-CoA), principal enzima que regula la síntesis de colesterol. Ha sido reportado que la PCE aumenta en un gran número de pacientes con hiperlipoproteinemia³⁸ y se ha postulado que un incremento en la actividad de esta enzima aumenta a su vez la tasa de secreción de lipoproteínas.³⁹

En estudios de microscopía electrónica se ha encontrado que la exposición aguda de ratas Wistar al plaguicida organofosforado metamidofos produce cambios estructurales de los hepatocitos

caracterizados por: incrementos en el contenido de cromatina del núcleo y de la densidad del citoplasma, así como vacuolización relacionada con la destrucción de la matriz de las mitocondrias. En algunas células el contenido de lípidos fue elevado y ocupó la mayor parte del citoplasma, además, en las áreas perisinusoidales aumentó la presencia de fibras de colágeno.⁴⁰ Este reporte apoya los cambios estructurales que encontramos en el hígado de las ratas tratadas con PM de forma crónica.

Asimismo, se sabe que el PM y otros POF alteran el metabolismo de los carbohidratos ya que se ha reportado hiperglicemia y glucosuria en las intoxicaciones con estos plaguicidas, derivados de efectos colinérgicos en el SNC^{41,42}. Al respecto, la potenciación de los estímulos de la acetilcolina sobre los receptores nicotínicos del ganglio simpático estimula a su vez a la médula suprarrenal y se liberan catecolaminas, de tal manera que la adrenalina liberada incrementa las concentraciones de glucosa sérica.^{43,44,45}

Conclusiones

El paratión metílico daña al hígado durante las intoxicaciones subaguda y crónica. En el primer caso, el daño se relaciona con la generación de estrés oxidante caracterizado por lipoperoxidación membranar de los hepatocitos, disminución de la síntesis de ATP, daño estructural y necrosis celular. En el segundo caso, el daño está relacionado con alteraciones estructurales de los hepatocitos (incremento en el depósito de lípidos y disminución de glucógeno) que varían en función del tiempo de tratamiento con este plaguicida. Es importante señalar que la identificación y caracterización del daño orgánico producido por los xenobióticos representan el punto de partida para analizar y establecer terapias racionales así como para implementar medidas que prevengan ese daño.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) el apoyo económico otorgado al LAQB Víctor Hugo Fuentes Delgado (Beca No. 204733) para realizar estudios de Doctorado en el área de la Toxicología.

Referencias

1. Oncu M, Gultekin F, Karao E, Altuntas I, Delibas N. Nephrotoxicity in rats induced by chlorpyrifos-ethyl and ameliorating effects of antioxidants. *Hum Exp Toxicol*. 2002; 21:223-230.
2. Pajoumand A, Shadniai S, Rezaie A, Abdi M, Abdollahi M. Benefit of magnesium sulfate in the management of acute human poisoning by organophosphorus insecticides. *Hum Exp Toxicol*. 2004; 23:565-569.

3. Lein PJ, Fryer AD. Organophosphorus insecticides induce airway hyperreactivity by decreasing neuronal M2 muscarinic receptor function independent of acetylcholinesterase inhibition. *Toxicol Sci*. 2005; 83:166-176.
4. Guo-Ross SX, Chambers JE, Meek EC, Carr RL. Altered muscarinic acetylcholine receptor subtype binding in neonatal rat brain following exposure to chlorpyrifos or methyl parathion. *Toxicol Sci*. 2007; 100:118-127.
5. WHO. Methyl Parathion. Environmental Health Criteria. 45, World Health Organization, Geneva, 1993. p.13-16.
6. Hahn T, Ruhnke M, Lupp H. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by the organophosphorus insecticide methylparathion in the central nervous system of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Acta Histochem*. 1991; 91(1):13-9.
7. Taylor P. Anticolinesterasas. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 9a Ed. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman GA, editores. McGraw Hill-Interamericana; 1996. Vol.1. p. 171-187.
8. Agarwal SB. A clinical, biochemical, neurobehavioral and sociopsychological study of 190 patients admitted to hospital as a result of acute organophosphorus poisoning. *Environ Res*. 1993; 62(1):63-70.
9. Koksall N, Buyukbese MA, Guven A, Cetinkaya A, Hasanoglu HC. Organophosphate intoxication as a consequence of mouth-to-mouth breathing from an affected case. *Chest*. 2002; 122:740-741.
10. Kramer RE, Ho IK. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methyl parathion. *CMJ*. 2002; 65(5):187-199.
11. Henao HS, Corey OG. Plaguicidas Inhibidores de las Colinesterasas. 1ª Edición. Serie Vigilancia 11. ECO-Organización Panamericana de la Salud. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud-OMS; 1991.
12. Kimmerle G. Testing of DDT for combined effect with methyl parathion and fenitrothion in acute tests on rats. Wuppertal-Elberfeld, Bayer AG, Institute of Toxicology. Unpublished report No. 5591, submitted to WHO by Bayer AG. Leverkusen, Germany; 1975.
13. Gaines TB. Acute toxicity of pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1969; 14:515-534.
14. Murray JC, Stein F, McGlothlin JC. Prolongation of the prothrombin time after organophosphate poisoning. 1994; *Ped Emerg Care*, 10:289-290.
15. Lox CD. Short term malathion ingestion and blood clotting in the rat. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1985; 6:51-55.
16. Teimouri F, Amirkabirian N, Esmaily H, Mohammadirad A, Aliahmadi A, Abdollahi M. Alteration of hepatic cells glucose metabolism as a non-cholinergic detoxication mechanism in counteracting diazinon-induced oxidative stress. *Hum Exp Toxicol*. 2006; 25(12):697-703.
17. Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Hum Exp Toxicol*, 2003; 22(4): 205-211.
18. Soltaninejad K, Abdollahi M. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: A systematic review. *Med Sci Monit*. 2009; 15(3): RA75-RA90.
19. Schlebusch H, Rick W, Lang H, Knedel M. Standards in the activities of clinically important enzymes. *D MW*. 1974; 99(15):765-766.
20. Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Rad Biol Med*. 1996; 20:251-256.
21. Adams H. Adenosine-5-triphosphate determination with phosphoglycerate kinase. In: *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer editor. Academic Press; 1963. p 539-543.
22. Datta J, Gupta J, Sarkar A, Sengupta D. Effects of organophosphorus insecticide phosphomidon on antioxidant defense components of human erythrocyte and plasma. *Indian J Exp Biol*. 1992; 30:65-67.
23. Jaramillo Juárez F, Rodríguez Vázquez ML, Meléndez Camargo ME, Aldana Madrid ML. Toxicología de los Plaguicidas. En: *Toxicología Ambiental*. 1ª Ed. Jaramillo Juárez F, Rincón Sánchez ER, Rico Martínez R, editores. UAA-U de G, 2009. p. 287-322.
24. Forsyth CS, Chambers JE. Activation and degradation of the phosphorothionate insecticides parathion and EPN by rat brain. *Biochem Pharmacol*. 1989; 38:1597-1603.
25. Brown MA, Brix K. A. Review of health consequences from high, intermediate and low-level exposure to organophosphorus nerve agents. *J Appl Toxicol*. 1998; 18: 393-408.
26. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003; 552:335-344.
27. Pincus MR, Zimmerman HJ, Henry JB. Enzimología Clínica. En: *Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio*. 9ª Edición. Henry JB, editor. MASSON; 2000. p. 259-292.
28. Fischbach FT. *Manual de Pruebas Diagnósticas*. 5ª Edición. McGraw-Hill Interamericana, México; 1997. p.1149.
29. Sonnenschein P, Golbs S, Wiezorek W D. The fermentation diagnosis and histologic studies in blood and the liver of surviving rats after 1 and 2 administrations of a median toxic dose of parathion methyl. Results of studies on the activities of the plasma enzymes AIAT, AsAT, AP and gamma-GT. *Arch Exp Veterinarmed*. 1989; 43(1):1-8.
30. Yildiz D, Dalkilic S, Yildiz H, Oztas H. Methyl parathion-induced changes in free and protein-bound SH levels in rat tissues. *Toxicol Mech Meth*. 2006; 16(7):347-352.
31. Banerjee BD, Seth V, Ahmed RS. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. *Rev Environ Health*. 2001; 16:1-40.
32. Gupta RC, Milatovic S, Montine TJ, Dettbarn WD, Milatovic D. Oxidative stress involvement in neurotoxicity of organophosphates and carbamates. *Toxicol Sci*. 2005; 84:204-205.

33. Milatovic D, Gupta RC, Aschner M. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *SWJ*. 2006; 6:295-310.
34. Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R, Sabzevari O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Hum Exp Toxicol*. 2003; 22 (4):205-211.
35. Fortunato JJ, Agostinho FR, Reus GZ, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. *Neurotoxicol Res*. 2006; 9(1):23-28.
36. Giordano G, Afsharinejad Z, Guizzetti M, Vitalone A, Kavanagh TJ, Costa LG. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007; 219(2-3):181-189.
37. Piña-Guzmán B, Solís-Heredia MJ, Rojas-García AE, Urióstegui-Acosta M, Quintanilla-Vega B. Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006; 216(2): 216-224.
38. Cucuiaunu M, Popescu TA, Haragus S. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipaemic subjects. *Clin Chim Acta*. 1968; 22:157-155.
39. Cucuiaunu M, Popescu TA, Opeincaru A. Serum pseudocholinesterase and ceruloplasmin in various types of hyperlipoproteinemia. *Clin Chim Acta*. 1975; 22(59): 19-27.
40. Salim S, Deniz S, Ozgul T, Zikret K, Mehmet K. Ultrastructural changes in rat liver treated with pralidoxime following acute organophosphate poisoning. *Mt S J Med*. 2004; 71(6):405-410.
41. Srivastava AK, Singh NN. Effects of acute exposure to methyl parathion on carbohydrate metabolism. *Acta Pharmacol Toxicol*. 1981; 48(1):26-31.
42. Tafuri J, Roberts J. Organophosphate poisoning. *Ann Emerg Med*. 1987; 16:193-202.
43. Gunby P. Help with pesticide poisoning. *JAMA*. 1979; 242:597-598.
44. Veltri J, Litovitz T. Annual Report of The American Association of Poison Control Centers National Data Collecting System. *Am J Emerg Med*. 1984; 2:420-443.
45. Mack R. Toxic encounters of the dangerous kind. *N C Med J*. 1983; 44:103-105.