

ARTICULO

Inhibición de butirilcolinesterasa por exposición a malatión: efectos sobre nocicepción y motricidad en ratasLourdes Arvelález^{1,2}, Antonio Eblen-Zajjur¹

¹ Laboratorio de Neurofisiología, Dpto. Ciencias Fisiológicas, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela

² Postgrado de Toxicología Analítica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

Correspondencia: Antonio Eblen.
E-mail: aeblen@uc.edu.ve

Recibido: Marzo 2013 **Aprobado:** Junio 2013

RESUMEN

Dada la presencia colinérgica en el sistema nociceptivo y la frecuente exposición al malatión, plaguicida organofosforado inhibidor de la Acetilcolinesterasa, se evaluó el impacto del aumento en el tono colinérgico inducido por la exposición a dosis bajas de malatión sobre la conducta nociceptiva y motora en ratas. Se estudiaron 20 ratas Sprague Dawley, machos (350-400g); en un grupo control (n=10) se inyectó 1mL NaCl 0,9% diario (i.p.) y a un grupo experimental (n=10) se inyectó 1mL de malatión (40mg.Kg⁻¹.dia⁻¹, en NaCl 0,9%, i.p) diario por 7 días. Se evaluó el primero, cuarto y séptimo día de tratamiento, el umbral nociceptivo (tiempo de reacción en la plancha caliente a 50°C), la motricidad (distancia recorrida en 5 minutos) como evaluador de respuesta motora, y la actividad de la Butirilcolinesterasa plasmática (BuChE) como un marcador de actividad colinérgica. La actividad

BuChE disminuyó progresivamente en 23,6%; 48,9% y 53,2%, el primero, cuarto y séptimo día, respectivamente, mostrando una cinética inhibitoria del tipo logarítmica: % Inhibición BuChE = $53,73 \times (1+1,22^{-0,81 \times \text{día}})$; r=0,93; P<0,05. Las dosis utilizadas corresponden a un nivel de exposición no letal con el fin de lograr cronicidad. La motricidad fue similar en ambos grupos (controles: 108,5 ± 30,1; malatión: 102,1 ± 43,9 cm; P>0,05; X ± DE) al igual que el umbral nociceptivo (controles: 13,5 ± 5,4; malatión 15,2 ± 6,5s; P>0,05). Los datos obtenidos muestran que a pesar de la intensa inhibición de la BuChE inducida por bajas dosis de malatión, la participación funcional colinérgica en el proceso de la nocicepción es muy reducida o marginal, lo cual sugiere el predominio de otros neurotransmisores en el procesamiento nociceptivo espinal y supraespinal.

Palabras Clave: malatión, organofosforados, acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, nocicepción, motricidad.

ABSTRACT

Inhibition of butyrylcholinesterase induced by exposition to Malathion: effects on nociceptive and motor behavior in rats

Due to cholinergic presence in the nociceptive system and the frequent exposition to Malathion, an organophosphorated pesticide with an Achetylcholinesterase inhibitory effect, the impact of the increased cholinergic tone induced by a low dose of malathion on the nociceptive and motor behavior of rats was tested. Male Sprague Dawley rats (350-400g) were divided into two groups: Control (n=10) injected with 1mL NaCl 0.9% daily (i.p.) and Malathion (n=10) injected with 1mL of malathion (40 mg.Kg⁻¹.day⁻¹, in NaCl 0.9%, i.p) daily for 7 days. At days 1, 4 and 7 of treatment the nociceptive threshold was evaluated by the hot-plate method at 50°C, motor activity by total rat displacement in 5 min, and the plasmatic Butyrylcholinesterase (BuChE) activity as a cholinergic biomarker. BuChE activity progressively decreased by 23.6%; 48.9% and 53.2% at days 1, 4 and 7 of treatment, respectively, showing a logarithmic inhibitory kinetics: % of BuChE inhibition= $53.73 \times (1+1,22^{-0,81 \times \text{day}})$; r=0,93; P<0,05. The tested exposition dose was non-lethal in order

to simulate chronic toxicity. Despite the BuChE inhibition, no statistical differences between both groups were found, neither for the nociceptive threshold (Controls:13.5±5.4; Malathion 15.2±6.5s; P>0.05; Mean±SD) nor for motor activity (Controls:108.5±30,1; malathion:102.1±43.9cm; P>0.05). These results strongly suggest that despite the intense BuChE inhibition induced by exposition to a low dose of malathion, the contribution of the cholinergic system in nociception is reduced or even marginal, which reveals the action of other neurotransmitters in this process.

Key words: Malathion, organophosphate pesticides, cholinergic enzyme, butyrylcholinesterase, nociception.

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas organofosforados (POF) son un grupo de sustancias orgánicas derivadas de la estructura química del fósforo y tienen un gran número de aplicaciones y utilidades (1) las cuales hacen muy frecuentes las intoxicaciones. La exposición a POF puede dar lugar a diversos trastornos del sistema nervioso (2). Los POF disminuyen la actividad de enzimas como la butirilcolinesterasa (BuChE) y la acetilcolinesterasa (AChE) de conocido efecto anticolinérgico. La pérdida de la función enzimática permite la acumulación de acetilcolina (ACh) dando lugar a una excesiva estimulación de los receptores colinérgicos muscarínicos (caracterizada por miosis, bradicardia, broncorrea, broncoconstricción, dolor abdominal tipo cólico, diarrea, sialorrea, hipotensión, visión borrosa e incontinencia urinaria) y receptores colinérgicos nicotínicos (3,4) que produce fasciculaciones musculares, debilidad muscular, midriasis, taquicardia e hipertensión. El malatión [o,o- dimetil-S-1,2-di(carboetoxi) etilfosforoditioato] es el POF de mayor uso en la actualidad usado en cultivos vegetales y como ectoparasiticida. Los efectos de la inhibición de AChE son particularmente críticos en el cerebro ocasionando alteraciones sensoriales, conductuales, incoordinación,

depresión de la función motora y depresión respiratoria (5,6).

El asta dorsal de la médula espinal (ADM) constituye el centro primario de procesamiento de la sensibilidad general y especialmente del dolor (nocicepción) recibiendo en sus láminas I a III los aferentes primarios nociceptivos (7) sitio donde se ha demostrado la presencia de ACh (7,8). Estos hechos han sugerido su participación en el proceso nociceptivo a este nivel (8). La actividad de la BuChE plasmática constituye un excelente indicador biológico del efecto inhibitorio de los POF sobre la AChE, esto debido a que su concentración es mucho mayor y los cambios en su nivel son fácilmente detectables (9) y constituyen el criterio de clasificación de la intoxicación por POF (10-13).

La exposición humana a POF, específicamente al malatión, podría estar alterando funcionalmente la vía de la nocicepción, al afectar su equilibrio de neurotransmisores (7,8). La evaluación de los efectos sobre la salud causados por exposiciones prolongadas a dosis bajas es de especial interés, ya que la mayoría de la población está expuesta crónicamente (14,15).

En vista de la participación de las colinesterasas y a la densidad de receptores tanto nicotínicos como muscarínicos en la vía nociceptiva (7,8), reviste gran interés clínico, toxicológico y neurofisiológico evaluar el impacto de los POF sobre la nocicepción y sobre los sistemas de respuesta nociceptiva como es el caso del sistema motor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a lo indicado por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (National Institute of Health) y la Ley Venezolana de protección de la fauna

doméstica y en cautiverio que regulan el uso de animales de experimentación (16).

Ratas macho *Sprague Dawley* adultas (350-400g), sometidas a un régimen de alimentación de agua y comida *ad libitum* y un esquema de iluminación: oscuridad 12:12 horas, fueron divididas en grupo control (n=10) a las cuales se inyectó diariamente 1mL de NaCl 0,9% vía intraperitoneal (i.p.) y grupo experimental (n=10) al que se le administró 1mL de solución de NaCl 0,9% conteniendo malatión (40 mg.Kg⁻¹.dia⁻¹) vía i.p. diariamente durante 7 días a la misma hora (aprox. 9:00am), esta exposición a dosis bajas del plaguicida fue con el fin de simular lo que ocurre en caso de una intoxicación crónica.

Pruebas Conductuales.

Todas las pruebas se realizaron el primero, cuarto y séptimo día de experimentación, tanto en el grupo control como el experimental.

Evaluación del Umbral Térmico del Dolor.

El umbral nociceptivo se determinó mediante la prueba de plancha caliente en una jaula 40x30x20cm de piso de aluminio con temperatura en 50±0,01°C midiéndose la latencia de aparición de tres respuestas nociceptivas consecutivas como lamer, morder, vocalizar, elevar las patas anteriores o saltar (17). De no haber respuestas a los 30 segundos se retiró el animal de la jaula para evitar lesiones. Las ratas de cada grupo se sometieron a la prueba 2 veces diarias los días 1, 4 y 7 de experimentación.

Evaluación de la Actividad Motora.

La prueba de actividad motora (18) consistió en colocar cada rata individualmente en una jaula metálica abierta de 55x40x15cm con suelo similar al de las jaulas de permanencia; luego de un tiempo de adaptación (5 min) se procedió a fotografiar al animal dentro de la jaula cada 30 segundos durante 5 minutos. La prueba fue

realizada siempre de 10:00am a 12:00m para evitar variaciones circadianas en las mediciones y en condiciones constantes de ruido, luz, ventilación y temperatura. Las fotos obtenidas (10 para cada rata) se procesaron mediante el programa Tracker®, versión 4.05 (Figura 1), con la finalidad de obtener la distancia total (cm) recorrida en los 5 minutos.

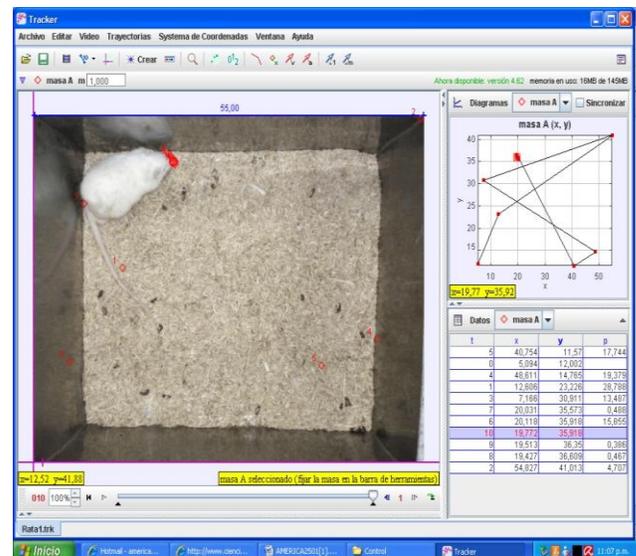


Fig.1. Interfase gráfica del programa Tracker de análisis de las trayectorias de las ratas en la prueba de actividad motora. Panel mayor: animal en la jaula con las marcas en rojo de sus desplazamientos; Panel derecho superior, el gráfico de las coordenadas x, y de desplazamientos; panel derecho inferior: valores numéricos de desplazamientos en centímetros.

Anestesia y punción cardíaca.

En los días 1, 4 y 7 del tratamiento, una rata de cada grupo se anestesió con tiobarbital 60 mg.Kg⁻¹ i.p. Al verificarse un nivel profundo de anestesia, por ausencia de los reflejos corneales y de retiro, se realizó una punción cardíaca transtorácica con una inyectadora de 1 mL y aguja 27G heparinizada, extrayéndose 1 mL de sangre, luego se sacrificó el animal con una sobredosis barbitúrica. La sangre se centrifugó (3100 rpm, 20min; Microcentrifuga, IEC Medline) separando el plasma para la determinación de la actividad BuChE.

Determinación de la actividad de BuChE.

Se utilizó la reacción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitro-benzoico (DTNB) y el ioduro de S-butirilcolina (IBTC) en buffer fosfato a pH 7,7 a 25°C con lectura a 405 nm en un espectrofotómetro semiautomatizado (Microlab® 300) a los 3 minutos de reacción (Wiener Lab®).

Análisis de datos.

Los valores numéricos se describieron con las medidas de tendencia central: Media aritmética y Mediana; y de dispersión: Desviación Estándar y Percentiles 25-75. Para las comparaciones de las variables entre los grupos se usó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U-test.

La asociación entre los valores de actividad de BuChE y los tiempos de plancha caliente y de actividad motora se evaluaron mediante la correlación de Spearman. Se determinó la curva de mejor ajuste para la inhibición de la actividad de la BuChE. Para todos los análisis se fijó como nivel de significación a $P < 0,05$.

El procesamiento y análisis estadístico se realizó mediante el paquete libre PAST v2.04 (19).

RESULTADOS

Efecto del malatión sobre la actividad BuChE plasmática.

Ya desde el primer día de la administración del malatión se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de actividad de la BuChE de los grupos control y malatión (Figura 2) con un 23,6% de inhibición, valor que se incrementa al 4 día de tratamiento (51,1%) alcanzando para el séptimo día un valor de inhibición al séptimo día con 46,8% de inhibición.

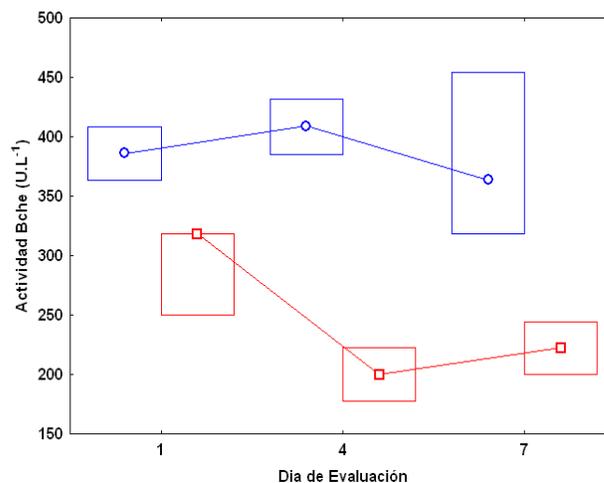


Fig.2. Valores de BuChE (U.L⁻¹) en los grupos control (círculos azules) y malatión (cuadrados rojos) durante el primer, cuarto y séptimo día de estudio. Las diferencias observadas son estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Luego de 7 días de tratamiento el malatión redujo en promedio un $54,3 \pm 8,9\%$ la actividad de la BuChE.

Curso temporal de la inhibición de la actividad de BuChE plasmática en ratas expuestas a 40 mg.Kg⁻¹.día⁻¹ de malatión.

Al evaluar el curso temporal de la inhibición de la actividad de la BuChE plasmática a lo largo de los días de administración del malatión a la dosis de 40 mg.Kg⁻¹.día⁻¹ se aprecia una curva de función logarítmica con rápidas inhibiciones entre el primer y cuarto día de administración del malatión; en el séptimo día, la inhibición de actividad de BuChE es de 46,8% (Figura 3).

La ecuación de regresión logarítmica para esta inhibición y para la dosis estudiada (40 mg.Kg⁻¹.día⁻¹) es la siguiente:

$$\% \text{ Inhibición BuChE} = 53,73. (1 + 1,221^{-0,8083 \cdot \text{día}})$$

Esta ecuación demuestra una alta correlación con un coeficiente $r = +0,93$, altamente significativo ($P < 0,05$), lo cual permite estimar, con más del 95% de confianza, los valores de

la inhibición de la BuChE plasmática para cada día de exposición al malatión a la dosis de 40 mg.Kg⁻¹.día⁻¹, la cual no indujo durante los 7 días de experimentación ninguna muerte en los animales.

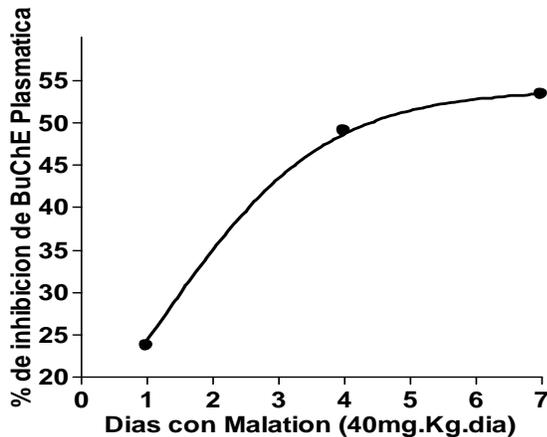


Fig.3. Curso temporal de la inhibición de la actividad de la BuChE plasmática en ratas tratadas con malatión (40 mg.Kg⁻¹.día⁻¹) durante todos los días de estudio.

Relación entre los valores de actividad BuChE plasmática y el umbral térmico del dolor en ratas controles y expuestas a 40 mg.Kg⁻¹.día⁻¹ de malatión. Al realizar el análisis de regresión de Spearman entre los valores de los tiempos de reacción en la plancha caliente de los animales de experimentación y los de la actividad de la BuChE no se observó correlación significativa ($r=0,15$; ($P>0,05$)).

Relación entre los valores de actividad BuChE plasmática con la actividad motora en ratas controles y expuestas a 40 mg.Kg⁻¹.día⁻¹ de malatión. Al realizar el análisis de regresión de Spearman entre los valores de las distancias recorridas por los animales de experimentación y los de la actividad de la BuChE no se observó correlación significativa ($r=0,085$; ($P>0,05$)).

Efecto del malatión sobre el umbral térmico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de latencia en la plancha caliente de los grupos de animales

controles y los sometidos al malatión en ninguno de los días de evaluación (Figura 4).

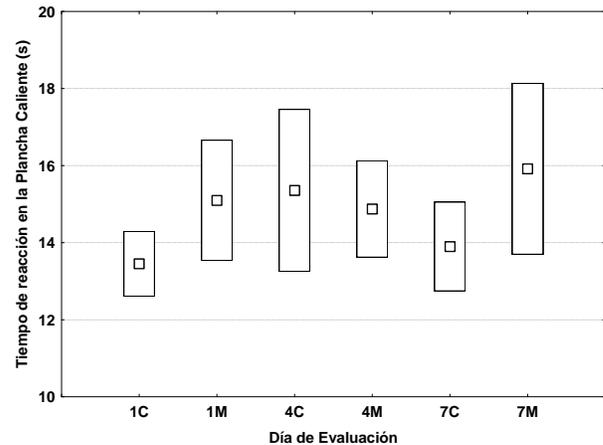


Fig.4 Tiempos de respuesta en plancha caliente (s) en el primer, cuarto y séptimo día de experimentación, en grupos control (C) y malatión (M) ($P>0,05$). Los puntos centrales corresponden a las medianas y los rectángulos a los percentiles 25-75.

Efecto del malatión sobre la actividad motora. En la prueba de actividad motora realizada el primero, cuarto y séptimo día de experimentación no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los grupos control y malatión (Figura 5).

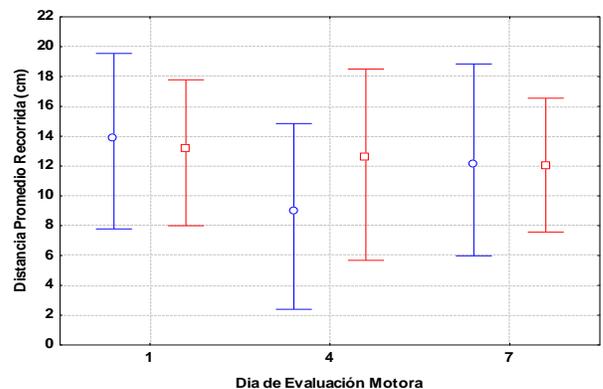


Fig.5. Distancia promedio recorrida (cm) por los grupos control (círculos azules) y malatión (cuadrados rojos) durante el primer, cuarto y séptimo día de estudio ($P>0,05$). Los puntos centrales corresponden a las medianas y las líneas en cada extremo a los percentiles 25-75, No se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos en los tres días de prueba.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto del malatión a bajas dosis en la conducta nociceptiva y la actividad motora de ratas Sprague Dawley, machos, adultas, asociados a la inhibición de la BuChE plasmática. Estudios anteriores han establecido dosis, tiempos de exposición y vías de administración similares a este estudio en modelos de intoxicación crónica (20,21). La dosis usada en el presente estudio se ajustó a los objetivos por cuanto fue suficiente para inhibir en más de 50% la actividad de la BuChE plasmática sin inducir ninguna muerte en los animales, lo cual corresponde a las características de las exposiciones e intoxicaciones crónicas.

Evaluación del umbral al dolor con la prueba de la plancha caliente. La prueba de la plancha caliente permite determinar el tiempo de reacción del animal ante un estímulo térmico nocivo (50°C) evaluando así los cambios en el umbral al dolor, dada su sensibilidad es la prueba de nocicepción experimental más utilizada (17). Su aplicación en la presente investigación reveló que el malatión administrado a ratas por vía i.p., en dosis de 40 mg.Kg⁻¹.día⁻¹, a pesar de producir inhibición de la BuChE plasmática, no modificó los tiempos de reacción ante el estímulo nocivo térmico. Este resultado contrasta con la comprobada presencia de receptores, neurotransmisores y enzimas hidrolíticas del sistema colinérgico en las áreas de procesamiento sensitivo y específicamente nociceptivo del sistema nervioso como es el caso de los ganglios de la raíz dorsal, el asta dorsal de la médula espinal, formación reticular del tallo cerebral, sustancia gris periacueductal, diencefalo, corteza cerebral y los sistemas de modulación descendente (7,8,22,23) y sugieren que la participación del sistema colinérgico en el proceso de nocicepción es reducida, por

cuanto una inhibición de hasta un 51% de la actividad de la BuChE, no es capaz de modificar la nocicepción o las respuestas motoras nociceptivas a pesar del consecuente incremento en la biodisponibilidad sináptica de la ACh. La corta latencia del inicio del efecto inhibitorio del malatión sobre la BuChE, hace que potenciales mecanismos de compensación del incremento de la biodisponibilidad del neurotransmisor como la internalización de receptores postsinápticos (24) o inhibición presináptica de la expresión genética del neurotransmisor (25), sean poco probables como explicación de la falta de modificación tanto del umbral nociceptivo como de la actividad motora del animal. Lo que sugiere fuertemente que en la vía nociceptiva aguda, control del umbral nociceptivo y respuestas motoras asociadas predomina la acción de otros neurotransmisores, lo cual ya ha sido propuesto por varios autores (7,8) a favor del predominio del glutamato, sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) así como a la activación de canales catiónicos despolarizantes (receptor vaniloide) por la concentración de hidrogeniones (23).

Los resultados del presente estudio complementan los reportes clínicos en pacientes con intoxicación por POF por cuanto los síntomas clínicos predominantes conforman el cuadro primariamente muscarínico y secundariamente nicotínico, siendo las causas de mortalidad de la esfera visceral cardiovascular (2).

Efectos del malatión sobre la actividad motora de las ratas. El uso de una prueba de actividad motora en el presente estudio cumplió dos finalidades, la primera la necesidad de evaluar el efecto de los POF sobre el sistema motor *per se* y la segunda por el hecho de que la respuesta nociceptiva evaluada en la prueba del tiempo de reacción en la plancha caliente es una respuesta motora, de manera que existe

la necesidad de comprobar que los potenciales cambios en el umbral del dolor fueran realmente en la esfera de la vía de la nocicepción y no de la capacidad motora.

En un estudio realizado en batracios, donde se usó malatión a dosis bajas, se observó que los mismos presentaron incoordinación motora, retraso en el crecimiento, poca reacción ante el estímulo táctil, concluyendo que la exposición prolongada a malatión sobre los batracios afecta los movimientos normales de natación relacionándolo con la interferencia del funcionamiento del sistema colinérgico debido a la inhibición enzimática provocada por el malatión. Este tipo de alteraciones motoras o narcóticas no se observaron en las ratas que recibieron malatión ($40 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{día}^{-1}$) en el presente estudio, en las cuales a pesar de la intensa inhibición de la BuChE plasmática, su conducta motora, evaluada mediante un parámetro muy sensible como es la determinación de la distancia total recorrida por el animal, no se diferenció estadísticamente de las ratas controles. Las diferencias entre estos estudios podría deberse a la extrema sensibilidad de los batracios a los contaminantes ambientales, característica que les ha valido la denominación de biosensores de contaminación, lo cual contrasta con la menor sensibilidad en mamíferos en los que se desarrollan los casos de toxicidad crónica, inclusive con dosis equivalentes a los que causan mortalidad en los batracios.

Efecto inhibitorio del malatión sobre la actividad de BuChE plasmática. La determinación de la actividad enzimática de BuChE plasmática permitió verificar el efecto inhibitorio que sobre ella tiene el malatión en la dosis utilizada en el presente estudio ($40 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{día}^{-1}$). Desde el primer día de administración se pudo observar que la actividad de la enzima BuChE en las ratas tratadas descendió significativamente. A pesar

de la baja dosis utilizada en el presente estudio, la inhibición de la BuChE fue de 23,6% y 51,1% para el primer y cuarto día de administración, respectivamente, mientras que al séptimo día de administración, la inhibición fue de 46,8%. Una disminución de la actividad de BuChE superior de 50% del valor normal corresponde a una intoxicación de tipo latente y no reporta manifestaciones clínicas (13). Por otra parte, la cinética de inhibición logarítmica de la BuChE inducida por el malatión descrita en el presente estudio concuerda con otros estudios publicados (11,12,26), lo cual confirma la acción habitual del malatión y asegura su presencia y acción plena en el organismo estudiado. Esta morfología logarítmica puede ser expresión de la toxicocinética del malatión y entre los principales factores involucrados se encuentra la lipofilia de esta molécula, la cual le permite interactuar con el tejido graso corporal. El gran contenido constitutivo graso del sistema nervioso es otro factor que promueve la directa acción de la molécula del malatión sobre las estructuras neurales. Sin embargo, a pesar de la evidente inhibición de la actividad BuChE plasmática, se demostró la poca influencia selectiva sobre el sistema nociceptivo.

Las evidencias presentadas sugieren fuertemente la predominancia en las respuestas nocifensivas de vías de neurotransmisión diferentes a la colinérgica, tal es el caso de las vías del glutamato, prostanglandinas y neuroquininas (7,8). La ausencia de modificación en el umbral del dolor y en la coordinación motora no son demostración de la ausencia del sistema colinérgico en estos procesos, sino más bien la ausencia de modificaciones en estos parámetros a las dosis de exposición. Exposiciones a bajas dosis pero continuas pueden disminuir gradualmente la actividad colinesterasa hasta niveles muy bajos y con escasa sintomatología (27). Por otra parte, en un estudio en el cual se evaluó el papel de la

modulación colinérgica en la transmisión mecánica y térmica espinal (28) se observó que solo la transmisión mecánica espinal es modulada por un mecanismo muscarínico colinérgico endógeno, independiente de mecanismos adrenérgicos espinales. Los resultados obtenidos en la presente investigación refieren a animales sanos sometidos a la exposición del malatión a las dosis indicadas. Investigaciones adicionales permitirán determinar si la actividad inhibitoria de la BuChE por este organofosforado pueda modificarse en condiciones como preñez, hepatopatía, fenómenos de sinergismo o antagonismo con otros medicamentos y cronodependencia, por mencionar algunas líneas de investigación relevantes.

Agradecimiento. Los autores agradecen a la Dirección de Investigación y Producción Intelectual de la Facultad de Ciencias de la Salud y su Bioterio Central por el financiamiento parcial del proyecto a través del aporte de los animales de investigación. De igual forma se agradecen los comentarios y sugerencias al manuscrito inicial por las Profesoras Yalitzá Aular y Maritza Planchard.

REFERENCIAS

- Ramos ZR, Fortunato JJ, Agostinho FR, Martins MR, Correa M, Schentiger MR, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Influence of malathion on acetylcholinesterase activity in rats submitted to a forced swimming test. *Neurotox Res* 2006; 9:285-90.
- Schosinsky K, Quintana E, Rueper C. Optimización de un método para la detección de carbamatos y organofosforados en vegetales. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2009;43:11-20.
- Thiermann H, Kehe K, Steinritz D, Mikler J, Hill I, Zilker T, Eyer P, Worek F. Red blood cell acetylcholinesterase and plasma butyrylcholinesterase status: important indicators for the treatment of patients poisoned by organophosphorus compounds. *Arh Hig Rada Toksikol* 2007;58:359-366.
- Eddleston M. The pathophysiology of organophosphorus pesticide self-poisoning is not so simple. *Neth J Med* 2008;66:146-8.
- Baer A, Kirk M, Holstege C. Organophosphates, Carbamates, Pesticides and Herbicides. En: Erickson T, Ahrens W, Ask S, Baum C, Ling L. *Pediatric Toxicology. Diagnosis & Management of the Poisoned Child*. 1st. Edition. New York: McGraw-Hill. New York; 2005. p. 352-356.
- Bradberry SM, Vale JA. Organophosphorus and Carbamate Insecticides. En: Brent J, Wallece K, Burkhart K, Phillips S, Donovan JW, Editors. *Critical Care Toxicology: Diagnosis and Management of the Critically Poisoned Patient*. Philadelphia: Mosby; 2005. p. 937- 46.
- Pawlowski SA, Gaillard S, Ghorayeb I, Ribeiro-da-Silva A, Schlichter R, Cordero-Erausquin M. A novel population of cholinergic neurons in the macaque spinal dorsal horn of potential clinical relevance for pain therapy. *J Neurosci* 2013;33:3727-3737.
- Mesnage B, Gaillard S, Godin AG, Rodeau JL, Hammer M, Von Engelhardt J, Wiseman PW, De Koninck Y, Schlichter R, Cordero-Erausquin M. Morphological and functional characterization of cholinergic interneurons in the dorsal horn of the mouse spinal cord. *J Comp Neurol* 2011;519:3139-3158.
- Pineda J. Plaguicidas: Monitoreo Efectivo de la Exposición a Carbamatos y Órgano-Fosforados. *Pesticides: effective monitoring of exposure to carbomates and organophosphates*. *Rev Ciencia Trab* 2007; N° 26.
- Stefanidou M, Athanaselis S, Spiliopoulou H. Butyrylcholinesterase: Biomarker for exposure to organophosphorus insecticides. *Intern Med J* 2009;39:57-60.
- Xu C, Zhang XG, Yang X, He YZ. The diagnostic value of butyrylcholinesterase in acute organophosphorus pesticide poisoning. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2010;22:193-6.
- Rastogi SK, Vipul K, Singh L, Kesavachandran LC, Jyoti M, Siddiqui K, Mathur N, Bharti RS. Monitoring of plasma butyrylcholinesterase activity and hematological parameters in pesticide sprayers. *Indian J Occup Environ Med* 2011;12:29-32.

13. Kumar SV, Fareedullah M, Sudhakar Y, Venkateswarlu B, Kumar EA. Current review on organophosphorus poisoning. *Arch Appl Sci Res* 2010;2:199-215.
14. Peruzzo PJ, Porta AA, Ronco AE. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampas region of Argentina. *Environ Pollut* 2008;156:61-66
15. Claver A, Ormad P, Rodriguez L, Ovelleiro JL. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). *Chemosphere* 2006;64:1437-1443.
16. Ley para la Protección de la Fauna Doméstica Libre y en Cautiverio, *Gaceta Oficial* N° 39.338, 4 de enero de 2010, Caracas, Venezuela.
17. Chen C-C, Zimmer A, Sun W.H, Hall J, Brownstein MJ, Zimmer A. A role for ASIC3 in the modulation of high-intensity pain stimuli. *PNAS USA* 2002;99:8992-8997.
18. Svensson TH, Thieme G. An investigation of a new instrument to measure motor activity of small animals. *Psychopharmacology* 1969;14:157-163.
19. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 2001;4:9pp.
20. Sharma Y, Bashir S, Irshad M, Nag TC, Dogra TD. Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. *Toxicology* 2005;215:173-181.
21. Sánchez F, Salcido AD, Flores-Álvarez G, Gamboa-Esteves C. Efecto del Malatión en la morfología dendrítica de neuronas piramidales de corteza media prefrontal y de hipocampo. [Tesis]. Instituto de Fisiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México; 2006.
22. Eblen-Zajjur A. Avances en la fisiopatología del dolor agudo. *Rev Venez Anest* 1998;3:S43-7.
23. Eblen-Zajjur A. Inmunología de la Nocicepción. *Dolor Clin Terap* 2005; 3:17-9.
24. Vanegas H, Tortorici V, Eblen-Zajjur A, Vásquez E. Periaqueductal gray microinjection of dipyrone inhibits responses of spinal dorsal horn neurons to natural noxious stimulation. *Brain Res* 1997; 759:171-4.
25. Ritzen M, Jesper M, Thomsen C. Molecular pharmacology and therapeutic prospects of metabotropic glutamate receptor allosteric modulators. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;97:202-13.
26. Ashraf A, Al-Zubaidy M, Mousa Y, Mohammad F. Plasma and whole brain cholinesterase activities in three wild bird species in Mosul, IRAQ: In vitro inhibition by insecticides. *Interdiscip Toxicol* 2011;4:144-8.
27. Ohayo-Mitoko GJ, Kromhoutha H, Simwab JM, Boleijc JS, Heederika D. Self-reported symptoms and inhibition of acetylcholinesterase activity among Kenyan agricultural workers. *Occup Environ Med* 2000;57:195-200.
28. Zhuo M, Gebhart GF. Tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. *Pain* 1991;46:211-22.