

Exposición aguda a fentiión en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*): efectos tóxicos, cambios en actividad colinesterasa y uso potencial en monitoreo ambiental

Acute exposure to fenthion in juveniles of white cachama (*Piaractus brachypomus*): toxic effects, changes in cholinesterase activity and potential use in environmental monitoring

Exposição aguda a fentião em juvenis de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*): efeitos tóxicos, mudanças na atividade de colinesterase e uso potencial no controle ambiental.

Javier F. Borbón, MD Vet¹, Jaime Fernando González Mantilla, MD Vet, MsC, PhD¹

Recibido: julio 22 de 2011 • Aprobado: enero 25 de 2012

Para citar este artículo: Borbón JF, González JF. Exposición aguda a fentiión en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*): efectos tóxicos, cambios en actividad colinesterasa y uso potencial en monitoreo ambiental. Rev. Cienc. Salud 2012; 10 (Especial): 43-51.

Resumen

El fentiión es un insecticida organofosforado usado en todo el mundo cuya aplicación puede derivar en contaminación de aguas y efectos potenciales en salud humana y animal. *Objetivos:* para evaluar los efectos tóxicos, la actividad colinesterasa plasmática tipo butiril (BChE) y el uso potencial en monitoreo ambiental se distribuyeron al azar treinta y cuatro juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) en tres tratamientos (control, 0,13 ppm y 2 ppm fentiión) por un período de 96 horas. *Materiales y métodos:* los ejemplares fueron expuestos al fentiión en tanques de diez galones, evaluando sintomatología, cambios *post-mortem*, índice viscero-somático (IVS) y actividad BChE. Se compararon las medias de cada variable para determinar significancia estadística (ANAVA, $\alpha=0,05$). *Resultados:* se presentaron signos clínicos severos (nado frenético, temores musculares y pérdida de eje de nado) en tres individuos (2 ppm) hacia las 11 y 34 horas. En 0,13 ppm hubo signos leves a moderados (temores y movimiento de aleta caudal). Los IVS (control = $5,3 \pm 0,5$; 0,13 ppm = $6,9 \pm 0,3$ y 2 ppm = $7,3 \pm 0,6$) fueron significativamente diferentes entre los expuestos a fentiión y los controles. La actividad BChE (control = $185,0 \pm 20,4$; 0,13 ppm = $12,5 \pm 2,3$ y 2 ppm = $9,8 \pm 1,8$ nmoles / ml plasma / min) mostró inhibición significativa en los expuestos a fentiión con respecto a controles. *Conclusiones:* se demostraron los efectos tóxicos

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Correspondencia: jaimefgonzalez@gmail.com

agudos del fentião en juveniles de cachama blanca. Los resultados en BChE mostraron su utilidad en monitoreo ambiental por exposici3n a insecticidas organofosforados.

Palabras clave: *colinesterasa, peces, intoxicaci3n, fenti3n.*

Abstract

Fenthion is an organophosphate insecticide used worldwide that may pollute waters after its application causing potential problems in public health and poisoning in domestic and wildlife animals. *Objective:* to evaluate toxic effects, butyrylcholinesterase activity (BChE) and use in environmental monitoring, 34 juveniles of white cachama (*Piaractus brachypomus*) were distributed in 3 groups (control, 0,13 ppm and 2 ppm fenthion) for 96 h. *Materials and methods:* fish were exposed in 10-gallon tanks; symptoms, gross lesions *post-mortem*, viscerosomatic index (VSI) and plasma BChE activity were evaluated. Mean comparisons for each variable among treatments were performed (ANOVA, $\alpha=0,05$). *Results:* severe signs were seen in 3 specimens (3/11) of 2 ppm fenthion between 11 and 34 h of exposure. These signs were frantic swimming, muscle tremors and loss of swimming axis. In 0,13 ppm, mild to moderate signs (tremors and caudal fin flapping) were observed in some of the fish. The VSI (control = $5,3 \pm 0,5$; 0,13 ppm = $6,9 \pm 0,3$ and 2 ppm = $7,3 \pm 0,6$) was significantly different between exposed to fenthion and controls. BChE activity (control = $185,0 \pm 20,4$; 0,13 ppm = $12,5 \pm 2,3$ and 2 ppm = $9,8 \pm 1,8$ nmoles / ml plasma / min) showed significant inhibition in exposed to fenthion as compared to controls. *Conclusions:* the present work confirmed the toxic effects of fenthion in white cachama juveniles. Results found in BChE activity suggest its use in environmental monitoring as a good biomarker of organophosphates waterborne exposure.

Keywords: *cholinesterase, fish, poisoning, fenthion.*

Resumo

O fenti3o 3 um inseticida organofosforado utilizado no mundo todo cuja aplica3o pode derivar em contamina3o de 3guas e efeitos potenciais em sa3de humana e animal. *Objetivos:* para avaliar os efeitos t3xicos, a atividade da colinesterase plasm3tica tipo butirilo (BChE) e o uso potencial em controle ambiental se distribu3ram ao acaso trinta e quatro juvenis de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) em tr3s tratamentos (controle, 0,13 ppm e 2 ppm fenti3o) por um per3odo de 96 horas. *Metodologia:* os exemplares foram expostos ao fenti3o em tanques de dez gal3es, avaliando sintomatologia, mudan3as post-mortem, 3ndice viscerosom3tico (IVS) e atividade BChE. Compararam-se as m3dias de cada vari3vel para determinar signific3ncia estad3stica ANAVA, $\alpha=0,05$). *Resultados:* apresentaram-se signos cl3nicos severos (nado fren3tico, tremores musculares e perda de eixo de nado) em tr3s indiv3duos (2 ppm) 3s 11 e 34 horas. Em 0,13 ppm houve signos leves e moderados (tremores e movimento de nadadeira caudal). Os IVS (controle = $5,3 \pm 0,5$; 0,13 ppm = $6,9 \pm 0,3$ y 2 ppm = $7,3 \pm 0,6$) foram significativamente diferentes entre os expostos a fenti3o e os controles. A atividade BChE (controle = $185,0 \pm 20,4$; 0,13 ppm = $12,5 \pm 2,3$ y 2 ppm = $9,8 \pm$

1,8 nmoles / ml plasma / min) mostrou inibição significativa nos expostos a fentião em relação a controles. *Conclusões*: se demonstraram os efeitos tóxicos agudos do fentião em juvenis de pira-pitinga. Os resultados em BChE mostraram sua utilidade em controle ambiental por exposição a inseticidas organofosforados.

Palavras chave: *colinesterase, peixes, intoxicação, fentião.*

Introducción

La contaminación de las aguas con plaguicidas es un fenómeno de alto riesgo dado su constante uso y la naturaleza hidrosoluble de muchos de estos compuestos. Colombia es uno de los mayores usuarios de estos productos en América Latina ocupando los primeros lugares en ventas y comercialización (1). Sin embargo, el uso masivo de plaguicidas no siempre va acompañado de medidas de protección ambiental para evitar la contaminación de fuentes hídricas. La presencia de plaguicidas en las aguas de abastecimiento para asentamientos humanos y poblaciones animales puede conducir a eventos de intoxicaciones masivas y otros efectos adversos por exposiciones subletales. Dentro de los efectos tóxicos de los insecticidas organofosforados reportados en humanos y animales se tienen: inhibición de la actividad colinesterasa (7), polineuropatía diferida (15, 17), estrés oxidativo (16) y disrupción endocrina con alteraciones de la función reproductiva (18), entre otros.

El fentião [O,O-dimetil-0-(4-metilmercapto)-3-metilfeniltiofosfato] es un insecticida y acaricida tio-eter organofosforado, desarrollado hacia 1960 y utilizado en el mundo entero (19). Su proceso de biotransformación ocurre principalmente en el hígado (sulfo-oxidación), reacción de fase I que disminuye su capacidad para inhibir la actividad colinesterasa. Junto con otros organofosforados ha sido señalado como uno de los principales contaminantes tipo plaguicida de cuerpos de agua. Debido a esto, en las últimas décadas se ha considerado de mucha

importancia el uso de especies bioindicadoras de esta contaminación, como los peces (2-3).

Entre las especies piscícolas de importancia comercial de Colombia y países vecinos se encuentra la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), especie nativa comercializada en el país. Esta especie es de fácil adaptación a las condiciones de laboratorio y por ello de gran importancia y futuro promisorio como biomodelo en estudios de toxicología.

El presente estudio tuvo como objetivo principal utilizar la especie piscícola cachama blanca en exposición controlada al insecticida fentião, con el propósito de estudiar sus efectos tóxicos, la medición de actividad colinesterasa plasmática como biomarcador de exposición y efecto, así como evaluar el uso potencial de la especie como bioindicadora de contaminación de aguas con este tipo de plaguicidas.

Materiales y métodos

Manejo de animales, fase experimental y análisis de colinesterasa: treinta y cuatro juveniles de cachama blanca ($10,0 \pm 0,3$ g; $8,8 \pm 0,1$ cm) fueron trasladados desde la estación piscícola La Terraza (Villavicencio, Colombia) y adaptados por un período de tres semanas a las condiciones del laboratorio de Toxicología Acuática, de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Durante este tiempo los peces fueron mantenidos en tanques de 120 L, suministrando alimento *ad libitum* y manteniendo condiciones físico-químicas apropiadas para el agua. Luego, los ejemplares

fueron distribuidos al azar en tres tratamientos: control = 0 ppm fentión (n=11), 0,13 ppm fentión (n=12) y 2 ppm fentión (n=11). La exposición a fentión (Tiguvon®, 20% C.E.) se hizo durante 96 horas utilizando tres tanques de diez galones cada uno por cada tratamiento experimental. Durante la fase experimental los acuarios se mantuvieron a una temperatura promedio de 25,5 °C, pH entre 6,9 y 7,2 y dureza de 34,2 mg/L. Al cabo de las 96 horas de exposición o en caso de presentarse signos clínicos severos durante la misma, los peces fueron anestesiados con metasulfonato de tricaina (1:5.000) (MS-222®), registrando peso, longitud corporal y tomando muestras de sangre de la vena caudal con jeringas previamente heparinizadas. Las muestras de sangre fueron centrifugadas (5000 rpm / 10 min) utilizando el plasma obtenido para determinar la actividad butirilcolinesterasa (BChE) mediante la técnica modificada de Ellman y otros autores (4). Esta técnica se fundamenta en la cuantificación del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico como producto de la reacción a partir del sustrato yoduro de butiriltiocolina. La absorbancia del producto de la reacción se cuantificó a 405 nm de longitud de onda usando el espectrofotómetro Stat Fax 3300®. La actividad butirilcolinesterasa total se calculó con un coeficiente de extinción de 13.400 para el ácido nitrobenzoico, ajustando a 1 ml de plasma y a 1 minuto la duración de la reacción enzimática. Luego los individuos fueron sacrificados por medio de corte cefálico para practicar la necropsia y registrar cambios macroscópicos de sus órganos. Las vísceras de cada ejemplar fueron pesadas (balanza analítica, OHAUS Adventurer™) para cálculo del índice viscerosomático (IVS) = ([peso vísceras / peso corporal] x 100) (5).

Análisis de resultados y estadística: las medias de las variables actividad BChE e IVS fueron

comparadas con un análisis de varianza mediante contrastes ortogonales ($\alpha=0,05$). Se utilizó el programa estadístico SAS V8.

Protocolos de manejo de animales: los animales experimentales fueron manejados siguiendo la normatividad proferida por la Sociedad Mundial de Toxicología, SOT, en lo referente a número y muestreo de ejemplares experimentales, acciones frente a presentación de sintomatología extrema y otras consideraciones éticas en experimentación toxicológica (6). Los protocolos experimentales fueron estudiados y aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, según la normatividad aplicable a la experimentación con animales.

Resultados

Signos clínicos, hallazgos post-mortem e índice viscerosomático (IVS): durante la fase experimental se presentaron signos clínicos severos en tres individuos del grupo 2 ppm fentión. Estos casos se presentaron a las 11, a las 28 y a las 34 horas posteriores al inicio de la exposición. Los ejemplares mostraron nado errático, cambio a postura ventro-dorsal del eje de nado y nado en torneo (giros alrededor de su eje). En la necropsia fue notoria la acumulación de líquidos y gases en las asas intestinales y la congestión leve a moderada de los lóbulos olfatorios y ópticos del cerebro. En los ejemplares expuestos a 0,13 ppm se presentaron signos clínicos leves, como ligera inclinación de eje de nado en dos ejemplares (a las 56 horas); movimientos laterales de aleta caudal y temores musculares esqueléticos. Hacia las 72 horas se presentaron signos clínicos entre leves y moderados en los ejemplares de 0,13 ppm (eje de nado inclinado y disminución en la actividad motora) y 2 ppm (sin respuesta a

estímulos externos y mínimo movimiento). No se evidenciaron cambios en comportamiento ni signos clínicos en los controles en ninguna fase del experimento.

Los valores encontrados para el IVS estuvieron entre 5,2 y 6,7 para el grupo control; 5,2 y 8,9 para 0,13 ppm y 4,8 y 11,7 para 2 ppm. Los promedios y errores estándar para cada

tratamiento se observan en la Tabla 1. En estos se encontró una diferencia significativa entre los ejemplares expuestos a 0,13 y 2 ppm con respecto al grupo control ($p < 0,05$). Aunque se observó una tendencia de aumento en el IVS a mayor concentración del insecticida, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los expuestos a fentión ($p > 0,05$).

Tabla 1. Biometría, peso de vísceras y valores de índice viscerosomático (IVS) en ejemplares experimentales de cachama expuestos a fentión (0; 0,13 y 2 ppm)

Tratamiento	Peso corporal (g)	Longitud total (cm)	Peso vísceras (g)	Índice viscerosomático (IVS)
Control (n=11)	9,6 ± 0,6	8,5 ± 0,2	0,6 ± 0,0	5,7 ± 0,5 ^a
0,13 ppm (n=12)	10,9 ± 0,6	9,1 ± 0,2	0,8 ± 0,1	7,0 ± 0,3 ^b
2,0 ppm (n=11)	9,8 ± 0,4	8,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	7,3 ± 0,6 ^b

Los valores representan promedios ± error estándar. Letras diferentes en la columna IVS indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

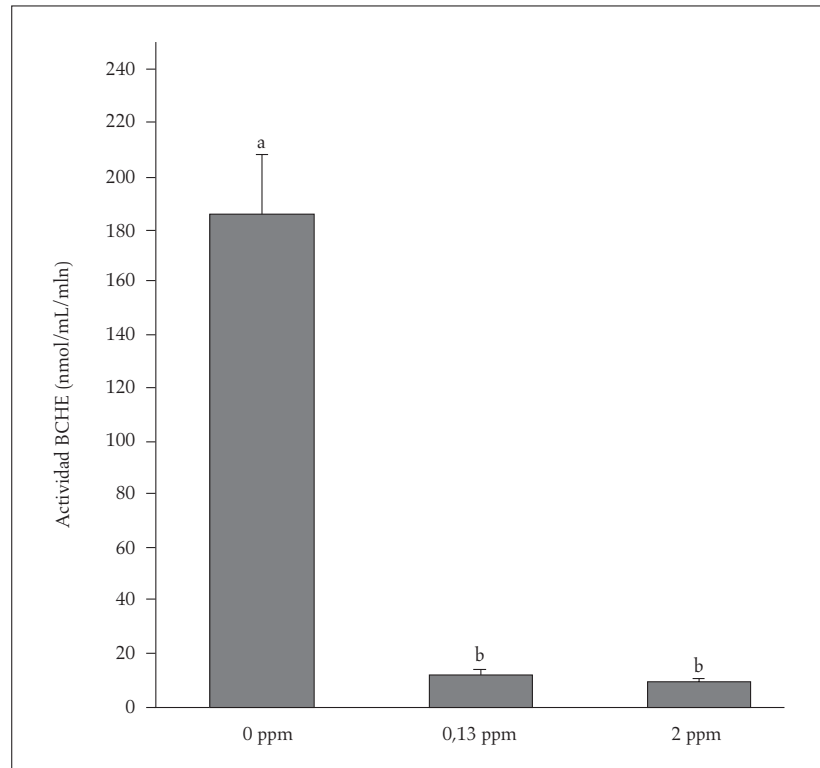
Actividad butirilcolinesterasa (BChE) plasmática: los valores de BChE expresados en nmoles de sustrato hidrolizado / ml plasma / minutos obtenidos para los tres tratamientos, tuvieron como rangos para el grupo control valores entre 92 y 282, con un promedio y error estándar de 185,0 ± 20,4; para el grupo 0,13 ppm, entre 6 y 26, con un promedio y error estándar de 12,5 ± 2,3 y para el grupo 2 ppm entre 0 y 18, con un promedio y error estándar de 9,8 ± 1,8 (ver Figura 1). En la actividad BChE se encontró una significativa disminución en los ejemplares expuestos a 0,13 y 2 ppm de fentión respecto a los controles ($p < 0,05$). Pese a que se observó una tendencia a la disminución de actividad BChE conforme se aumentó la concentración del insecticida, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre estos dos tratamientos expuestos al fentión ($p > 0,05$).

Discusión

Los signos clínicos presentados por los ejemplares expuestos al fentión corresponden a la

estimulación muscarínica y nicotínica típicas resultantes del mecanismo de acción de los insecticidas organofosforados. Estas corresponden a la persistencia del neurotransmisor acetilcolina sobre sus receptores al inhibirse la actividad catalítica de la acetilcolinesterasa. Dichos síntomas incluyen estímulo a la secreción glandular (hipersecreción), aumento en la motilidad de la musculatura lisa, temores musculares esqueléticos y respuestas neuromotoras exacerbadas ante estímulos menores (7-9). En el caso de intoxicación aguda en peces también se ha reportado una alteración en el patrón de nado con pérdida del eje y movimientos abruptos dentro del acuario o estanque donde se encuentren ubicados (10). Los animales que murieron en la concentración más alta del insecticida (2 ppm) también mostraron esta conducta. La sintomatología observada en los peces de 0,13 ppm fue menor, mostrando como aspecto más relevante los temores musculares esqueléticos. Todos los ejemplares de este tratamiento sobrevivieron

Figura 1. Actividad butirilcolinesterasa (BChE) plasmática en juveniles de cachama blanca expuestas a fentión (0; 0,13 y 2 ppm)



Los valores representan promedios \pm error estándar. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$).

durante el período experimental. Las diferencias en el cuadro clínico de intoxicación entre las dos concentraciones del insecticida usadas en el presente experimento fueron marcadas.

El hallazgo *post-mortem* más significativo en los peces expuestos al fentión fue la acumulación de secreción líquida en el tracto gastrointestinal. Esto fue evidenciado macroscópicamente con distensión marcada del estómago y de las asas intestinales, así como con el cálculo del IVS. El incremento en la secreción se confirmó al encontrar IVS mayores en los expuestos a fentión con respecto a los controles. Es importante señalar que, según la fase de la intoxicación en la que se evalúe este parámetro, el resultado puede variar, ya que parte

del mecanismo de los insecticidas consiste en aumentar la motilidad gastrointestinal, lo cual se manifiesta en los mamíferos con episodios de diarrea (8-9), situación que no es fácil de evidenciar en los peces. Cuando se evacúa la secreción acumulada en el tracto intestinal por la hiperomotilidad gastrointestinal, el IVS no tendrá diferencias significativas entre controles y expuestos al organofosforado. En otros estudios con peces se ha reportado la presencia de gas y el aumento de secreción líquida en estómago e intestino como hallazgos en la necropsia; tal es el caso de guppys (*Poecilia reticulata*) que fueron expuestos a concentraciones bajas de clorpirifos, otro insecticida organofosforado muy usado en Colombia y en el mundo (11).

La actividad BChE plasmática de los controles fue $185,0 \pm 20,4$ nmoles / mL plasma / min. Estos resultados son ligeramente menores a los reportados por Parra y otros autores (12), quienes encontraron una actividad media de $249,1 \pm 13,3$ en la misma especie; sin embargo, difieren a los obtenidos por Suárez y González (13), quienes encontraron una actividad media de $36,5 \pm 7,0$ nmoles / mL de plasma / min. Si bien en los tres estudios se utilizó la misma técnica para actividad colinesterasa, las diferencias entre los resultados podrían atribuirse a factores dietarios, de manejo e inclusive de tipo genético entre los grupos de animales seleccionados para cada estudio. La actividad BChE se inhibió de manera significativa tanto en los expuestos a 0,13 ppm como a 2,0 ppm de fentión. Esta inhibición fue casi de 95% con respecto a la actividad de los controles para los dos tratamientos expuestos al insecticida. A pesar de que los cuadros clínicos fueron muy diferentes en cuanto a intensidad entre las dos concentraciones de insecticida, la inhibición de la actividad BChE sí fue marcada en los dos casos, lo cual abre posibilidades importantes de aplicación en el campo de biomarcadores y bioindicadores como se discutirá a continuación. Valores similares de inhibición de colinesterasa han sido reportados en otras especies piscícolas como el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), en la que se registró inhibición de actividad colinesterasa cerebral mayor a 90% luego de ser expuesta a varios tipos de organofosforados, siendo esta inhibición compatible con la supervivencia de los animales (14).

El uso de peces como bioindicadores de contaminación es cada día más frecuente. Esto permite un control de la calidad de las aguas de consumo y la utilización en otras especies animales y la especie humana. Varios municipios en el país han establecido estos sistemas bióticos de vigilancia en acueductos, además del

análisis físico-químico de las aguas. Dado el alto riesgo de contaminación por plaguicidas de las aguas en Colombia y en el mundo la utilización de especies bioindicadoras es muy necesaria (20). La cachama blanca es de fácil manejo en laboratorio y además puede ser pensada para monitoreo en cuerpos de agua naturales con temperaturas por encima de 23 °C, acogiéndose a la normatividad sobre mantenimiento de especies piscícolas en las cuencas autorizadas. Este estudio mostró que la facilidad de manejo de la cachama blanca y la sensibilidad de la actividad colinesterasa tipo butiril frente a la exposición a concentraciones letales o subletales de un organofosforado como el fentión permiten su aplicación en estudios de toxicología y en programas ambientales.

Conclusiones

- El presente estudio demostró los efectos tóxicos de la exposición aguda a fentión en juveniles de cachama blanca.
- La inhibición de la actividad colinesterasa fue un buen marcador del efecto tóxico del insecticida aun a concentraciones subletales de exposición.
- Los resultados de la presente investigación permiten sugerir a la cachama blanca como una especie bioindicadora de los efectos de la contaminación de las aguas con insecticidas organofosforados como el fentión.

Descargos de responsabilidad

Esta investigación fue llevada a cabo a partir de un proyecto original planteado por Acuática, grupo de Investigación en Toxicología Acuática y Ambiental, sin conflicto de intereses por parte de los autores en el desarrollo del mismo.

Agradecimientos

Acuática agradece a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia por su

apoyo financiero para la realización de este proyecto. También agradece al profesor Miguel Ángel Landi- nes por su ayuda en la consecución de los ejemplares experimentales.

Bibliografía

1. Diccionario de Especialidades Agroquímicas. 17ª ed. Bogotá: Thomson – PLM; 2007. p. 816.
2. Rand GM. Fish toxicity studies. En: Di Giulio RT y Hinton DE, eds. The toxicology of fishes. Boca Raton: CRC Press; 2008. p. 659-81.
3. Schlenk D, Handy R, Steinert S, Depledge MH y Benson W. Biomarkers. En: Di Giulio RT y Hinton DE, eds. The toxicology of fishes. Boca Raton: CRC Press; 2008. p. 683-731.
4. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7 (2):88-95.
5. Barton BA, Morgan JD, Vijayan MM. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. En: Marshall Adams S, ed. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society: Bethesda; 2002. p. 111-48.
6. Guiding principles in the use of animals in toxicology. [Consultado el 1 de julio de 2011]. Disponible en: <http://www.toxicology.org/ms/air6.asp>
7. Osweiler GD. Insecticides and molluscicides. En: Toxicology. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia; 1996. p. 231-57.
8. Gupta RC. Organophosphates and carbamates. En: Gupta RC, ed. Veterinary toxicology: basic and clinical principles. Academic Press: San Francisco; 2007. p. 477-88.
9. Meerdink GL. Anticholinesterase insecticides. En: Plumlee KH, ed. Clinical veterinary toxicology. Mosby: Saint Louis; 2004. p. 178-80.
10. Reeb S. Fish behavior in the aquarium and in the wild. Cornell University Press: Nueva York; 2001.
11. Silva P, Samayawardhena L. A. Low concentrations of Lorsban in water result in far reaching behavioral and histological effects in early life stages in guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2002; 53 (2):248-54.
12. Parra L, Figueredo D, González JF. Actividad tipo colinesterasa plasmática en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) aclimatados bajo condiciones de laboratorio. *Rev Med Vet Zoot* 2007; 54 (2):225.
13. Suárez R, González JF. Actividad colinesterasa cerebral, muscular, hepática y plasmática en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*): efecto inhibitor del clorpirifos (Lorsban 4EC®). *Rev. Med Vet Zoot* 2007; 54 (2):180.
14. Carr RL, Straus DL, Chambers JE. Inhibition and aging of channel catfish brain acetylcholinesterase following exposure to two phosphorothionate insecticides and their active metabolites. *J Toxicol Environ Health* 1995; 45 (3):325-36.
15. Peter JV, Prabhakar AT, Pichamuthu K. Delayed-onset encephalopathy and coma in acute organophosphate poisoning in humans. *Neurotoxicology* 2008; 29 (2): 335-42.
16. Sevgiler Y, Piner P, Durmaz H, Üner N. Effects of N-acetylcysteine on oxidative responses in the liver of fenthion-exposed *Cyprinus carpio*. *Pest. Biochem. Physiol.* 2007; 87 (3):248-54.
17. Jokanovic M, Kosanovic M, Brkic D, Predrag Vukomanovic P. Induced delayed polyneuropathy in man: an overview. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 2011; 113 (1):7-10.
18. Peiris-John RJ, Wickremasinghe R. Impact of low-level exposure to organophosphates on human reproduction and survival. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102 (3):239-45.

19. Tomlin C. The pesticide manual. Crop. Protection Publications: Gran Bretaña; 1994, p. 1341.
20. Brahmi N, Mokline A, Kouraichi N, Ghorbel H, Blel Y, Thabet H et al. Prognostic value of human erythrocyte acetyl cholinesterase in acute organophosphate poisoning. Am. J Emerg. Med. 2006; 24 (7):822-27.