

Estudio de parámetros electrofisiológicos, histopatológicos y enzimáticos en nervio ciático de gallinas tratadas con tri-ortocresil fosfato (TOCP)

Study of physiological histopathologic and enzymatic parameters in sciatic nerve of triorthocresyl phosphate-treated hens

A.F. Hernández*, A. Pla*, R. González-Maldonado y E. Villanueva***

* Departamento de Medicina Legal y Servicio de Toxicología, Hospital Universitario, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.

** Servicio de Neurología, Hospital Universitario de Granada.

RESUMEN

Se estudian parámetros electrofisiológicos, histopatológicos y enzimáticos en gallinas intoxicadas experimentalmente con dosis neuropáticas de tri-o-cresil fosfato (TOCP), sólo y en diferentes combinaciones con el protector fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF). Se hace un seguimiento electrofisiológico de los animales a los tiempos 0, 7, 14 y 21 días. En el momento del sacrificio se tomaron muestras de nervio ciático para su estudio histológico y enzimático (β -glucuronidasa y fosfatasa ácida). No se observan alteraciones electrofisiológicas (velocidad de conducción, velocidad de aparición del pico, duración del potencial de acción y amplitud del mismo) en ninguno de los tratamientos empleados. Este resultado concuerda con la

ausencia de alteraciones histopatológicas y enzimáticas. La fosfatasa ácida plasmática experimenta un incremento significativo, pero tardío (a los 21 días después de la administración de TOCP) por lo que se concluye que no es utilizable como marcador precoz de la polineuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDP).

Palabras clave: OPIDP, TOCP, enzimas lisosomales.

SUMMARY

Several electrophysiological, histopathologic and enzymatic parameters are studied in hens treated with neuropathic doses of tri-*o*-cresyl phosphate (TOCP), alone and in different combinations with the protective agent phenylmetanesulphonyl fluoride (PMSF). Electrophysiologic parameters (onset conduction velocity, peak conduction velocity, action potential duration and action potential amplitude) were monitored at 0, 7, 14 and 21 days after intoxication with TOCP and/or PMSF. After killing, samples of sciatic nerve were taken for histological and enzymatic (β -glucuronidase and acid phosphatase) studies. No electrophysiological changes were observed in any group of treatment. This fact agrees with histopathologic and enzymatic findings. Plasma acid phosphatase undergoes a delayed increase 21 days after intoxication with TOCP. Therefore, its usefulness as an early warning index to detect peripheral neuropathy due to over exposure to neurotoxic organophosphorus compounds is doubtful.

Key words: OPIDP, TOCP, lysosomal enzymes.

INTRODUCCION

Algunos compuestos organofosforados, tras una dosis única, pueden producir una polineuropatía retardada (OPIDP) consistente en una degeneración axonal distal, simétrica, que se presenta simultáneamente en el Sistema Nervioso Periférico y en algunos lugares del Sistema Nervioso Central. (Abou-Donia, 1981; Johnson, 1982).

La capacidad de los compuestos organofosforados de producir OPIDP se debe a una inhibición progresiva de la NTE (esterasa diana de la neuropatía), pero no todos los compuestos que inhiben la NTE son neurotóxicos, sino que se requiere un paso ulterior consistente en la generación de un residuo fosfórico monosustituido y cargado negativamente unido al enzima, proceso conocido con el nombre de "envejecimiento" (Clothier y Johnson, 1970, 1980; Williams, 1983).

El pretratamiento de los animales de experimentación con fosfinatos, carbamatos o sulfonatos (como por ejemplo, fenilmetanosulfonil fluoruro, PMSF) les protege contra el efecto neuropático de los compuestos neurotóxicos (Johnson y Lau-

werys, 1969; Johnson, 1976). La diferencia entre ambos grupos de compuestos radica en que los primeros sólo producen inhibición de la NTE, mientras que los segundos, además, la envejecen. El umbral para la iniciación de la OPIDP es del 70-80% de inhibición de la NTE (Johnson, 1982), mientras que si un 30% o más de la NTE está ocupada por un agente protector, la administración posterior de un compuesto organofosforado, a dosis neurotóxicas, no produce neuropatía.

Se han realizado diversos estudios electrofisiológicos de nervios periféricos después del tratamiento con distintos compuestos organofosforados y en distintas especies. Sin embargo, todos ellos se han centrado especialmente, en la medida de la velocidad de conducción, la cual no se modifica con dosis neuropáticas de TOCP (Durham y Ecobichon, 1984) y, de forma contradictoria, si con dosis subneuropáticas del mismo compuesto organofosforado (Robertson et al., 1987). Ocasionalmente se han realizado otras medidas funcionales, como el período refractario relativo (tras estimular con parejas de impulsos a intervalos de 1-8 milisegundos entre estímulos) y la excitabilidad, encontrándose un acortamiento del primero y un incremento de esta última (Averbook y Anderson, 1983; Anderson y Dunham, 1985) en ausencia de alteraciones histopatológicas simultáneas.

El presente trabajo trata de valorar la posibilidad de utilizar algunos parámetros enzimáticos adicionales al de NTE y parámetros electrofisiológicos como indicadores precoces de la OPIDP, estableciendo su relación con los síntomas clínicos y las lesiones histopatológicas. Para ello se trataron gallinas con 500 mg/kg de TOCP y/ó 30 mg/kg de PMSF y monitorizadas durante 0, 7, 14 y 21 días. Las actividades enzimáticas fosfatasa ácida y β -glucuronidasa se han estudiado ya que existen evidencias de que, a consecuencia de la degeneración axonal, se produce una elevación transitoria de la actividad de hidrolasas lisosomales. Estos cambios se han asociado a un incremento en el número de células de Schwann, fibroblastos y macrófagos endoneurales (Abou-Donia et al., 1988). Este hecho ha permitido proponer la determinación de la actividad de estas enzimas en plasma como indicador precoz de la sobreexposición a organofosforados neurotóxicos.

MATERIAL Y METODOS

Agrupación y dosificación de animales

Los experimentos se realizaron en gallinas adultas (*Gallus gallus domesticus*) Dekalb^R G-Link (peso medio 2 kg). Los animales se mantuvieron en grupos de 3 en condiciones controladas de luz y temperatura (ciclo luz-oscuridad de 12 h y 20-25°C). Comida y agua se administraron *ad libitum* excepto durante las 24 h previas a la dosificación, en que se suprimió la comida. Aquellas gallinas que mostraron una pérdida significativa de peso se alimentaron artificialmente mediante un tubo estomacal con pienso estándar para gallinas (SANDERS).

Los animales, en grupos de 3, se trataron de la siguiente forma: (1) TOCP 500 mg/kg p.o.; (2) TOCP 500 mg/kg p.o. + PMSF 30 mg/kg s.c.; (3) PMSF30 mg/kg s.c. + TOCP500 mg/kg p.o.; (4) PMSF30 mg/kg s.c. El TOCP (99% pureza, Eastman Kodak, Liverpool, U.K.) se disolvió en aceite de girasol al 45% (p/v). El PMSF (Sigma) se disolvió en glicerol formal inmediatamente antes de usarlo y se inyectó subcutáneamente en la región anterolateral del tórax. Los controles recibieron sólo una dosis del vehículo.

Estos 4 grupos permiten interpretar correctamente cualquier resultado positivo que pudiera obtenerse y desechar respuestas irrelevantes. Así, el tratamiento con PMSF sólo o administrado 7 h antes que el TOCP en la serie 3, sirve para detectar, por una parte, efectos debidos exclusivamente a la inhibición de la NTE (PMSF) y por otra, acciones propias del TOCP no relacionadas con la NTE ni con su envejecimiento. La serie TOCP+PMSF, administrando el agente protector 24 h después del neuropático, cuando ya la NTE está inhibida y envejecida, tenía por objeto detectar posibles alteraciones debidas al PMSF independientemente de su acción sobre la NTE. En principio, y desde el punto de vista de la patogénesis de la OPIDP, este tratamiento es equivalente al de la administración de TOCP solo, puesto que en estas condiciones se produce la inhibición y envejecimiento de la NTE.

Estudio Electrofisiológico

Se utilizó un electromiógrafo Medelec MS/6 conectado a un promediador "tonies" de 2 canales. Para el estudio de las latencias distales motoras del nervio ciático de gallina se utilizaron electrodos estimuladores de aguja, que se clavaron en el centro de la línea media del contramuslo hasta una profundidad aproximada de 1 cm, donde se encontraba el nervio ciático, de manera que el polo negativo quedaba situado distalmente. Como electrodo de registro se usó uno de aguja con soporte de plástico que se clavó a unos 90 mm del anterior, en el espesor del músculo gastroneomio, a unos 4 cm de su borde lateral, formando la pata un ángulo de unos 90°.

La frecuencia de estimulación fue de un estímulo por segundo, con una intensidad de 50 voltios y una duración de 0,2 milisegundos, excepto cuando se hicieron pruebas de estimulación repetitiva, en las que se aplicaron estímulos eléctricos supramaximales a frecuencias de 10 Hz.

Los animales se monitorizaron antes de dosificarlos y a los 7 y 14 días después del tratamiento. En una serie que recibió sólo 500 mg/kg de TOCP se prolongó el seguimiento hasta 21 días.

Para cada potencial de acción compuesto se obtuvieron las siguientes características: velocidad de conducción, velocidad del pico, duración del potencial de acción y amplitud del mismo.

Preparación de los tejidos

Las gallinas se sacrificaron por dislocación cervical 14 y 21 días después del tratamiento. La sangre se recogió en tubos heparinizados y el plasma se separó por centrifugación. El nervio ciático se extrajo rápidamente y se sumergió en buffer trietanolamina, pH 7,4, conteniendo sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM y DL-ditiotreitol (Buffer A) (Baquer et al., 1973). Los siguientes pasos se realizaron a 4°C.

El nervio ciático se homogenizó manualmente en Potter-Elvehjen con 3,5 ml de Buffer A. El homogenado se centrifugó a 29000 xg durante 20 minutos y el sobrenadante se almacenó a -40°C hasta su análisis. Previamente se comprobó que las actividades enzimáticas no se afectaban por este procedimiento.

Estudio histopatológico

Se obtuvieron muestras de nervio ciático de 3 cm de longitud que se fijaron por inmersión en una solución de glutaraldehído y formaldehído al 2% en tampón fosfato 100 mM pH 7,4. Posteriormente se cortaron fragmentos de 5 mm y se introdujeron en una solución de tetróxido de osmio al 2%. Después de deshidratar en gradientes crecientes de acetona se realizó el aclaramiento con óxido de propileno e infiltración con resina Epon 812. Los cortes ultrafinos obtenidos se sometieron a un tratamiento con acetato de uranilo y citrato de plomo sucesivamente, para un mejor contraste.

El resto de las muestras se dividió en 3 segmentos diferentes (dos para cortes transversales y uno para corte longitudinal) para su estudio al microscopio óptico. Previa infiltración en paraplast se tiñieron con azul de toluidina (cortes semifinos) y con el método de Klüver-Barrera.

Ensayos enzimáticos

La actividad enzimática β -glucuronidasa se determinó según el método de Stahl y Fishman (1984) y la fosfatasa ácida según el procedimiento descrito por Moss (1984). Todos los ensayos enzimáticos se realizaron por duplicado y se expresan como actividad específica o unidades por gramo de tejido fresco. La determinación del contenido proteico se realizó según el método de Lowry et al. (1951).

RESULTADOS

En la Tabla I se exponen los resultados del estudio electrofisiológico, y se aprecia la ausencia de alteraciones funcionales en cualquiera de los tratamientos empleados. La respuesta repetitiva frente a estímulos supramaximales fue negativa en todo momento y en todos los animales estudiados. Sólo dos animales pertenecientes

TABLA I

**PARAMETROS ELECTROFISIOLOGICOS DETERMINADOS EN GALLINAS
TRATADAS CON TOCP (500 mg/kg) Y/O PMSF (30 mg/kg)
A LOS 0, 7, 14 Y 21 DIAS DE LA ADMINISTRACION**

PARAMETROS ESTUDIADOS	TIEMPO (días)	TRATAMIENTO			
		TOCP	TOCP+PMSF	PMSF+TOCP	PMSF
Velocidad conducción ^a	0	47 ± 2.5	49 ± 6.9	50 ± 4.6	53 ± 3.0
	7	47 ± 2.5	50 ± 0	51 ± 6.8	50 ± 9.5
	14	48 ± 1.7	45 ± 6.8	46 ± 11.5	50 ± 7.9
	21	44 ± 2.3			
Velocidad del pico ^a	0	23 ± 5.6	21 ± 3.2	24 ± 8.0	24 ± 4.3
	7	27 ± 2.1	24 ± 4.0	32 ± 0.6	29 ± 11
	14	27 ± 10	26 ± 4.6	31 ± 9.3	29 ± 6.0
	21	29 ± 5.2			
Potencial Acción ^b	0	7.5 ± 0.8	6.3 ± 0.6	6.7 ± 0.2	7.2 ± 0.9
	7	6.8 ± 0.5	7.7 ± 0.2	7.6 ± 0.7	6.5 ± 1.1
	14	6.2 ± 0.5	6.1 ± 0.3	7.1 ± 2.3	6.3 ± 0.3
	21	6.4 ± 0.7			
Amplitud ^c	0	4.2 ± 1.3	4 ± 0	4 ± 0.6	5 ± 2.1
	7	6.0 ± 0.4	7 ± 1.1	6 ± 1.1	8 ± 2.5
	14	8.3 ± 2.1	7 ± 3.2	8 ± 2.5	7 ± 3.0
	21	7.4 ± 2.9			

Cada valor representa la media ± S.D., (n=3)

^ametros/segundo (m/s)

^bmilisegundos (ms)

^cmilivoltios (mV)

al grupo tratado con TOCP+PMSF presentaron anomalías funcionales cualitativas a los 14 días de la dosificación: uno de ellos mostró una morfología anormal del potencial de acción y el otro, fibrilaciones en reposo y una respuesta F lejana (es decir, estímulos conducidos por fibras antidrómicas desde la médula hasta los músculos eferentes).

En la Tabla II se intenta establecer una correlación clínica-histológica en cada uno de los animales sometidos a diferentes tipos de tratamiento. Como se puede observar, los signos clínicos de neuropatía aparecieron a los 10 días del tratamiento con TOCP y TOCP+PMSF, aumentando progresivamente su intensidad hasta el momento del sacrificio. El tratamiento con TOCP+PMSF parece producir una sintomatología más severa que el realizado con TOCP sólo. Por su parte, los 3 animales dosificados sólo con TOCP y sacrificados a los 21 días del tratamiento mostraron una mayor severidad clínica (4, 4 y 2), siendo el reflejo de retracción de las patas negativos en todos los casos.

Los resultados de la determinación de enzimas lisosomales (β -glucuronidasa y

TABLA II

**VALORACION CLINICO-HISTOLOGICA DE GALLINAS
TRATADAS CON TOCP (500 mg/kg) y/o PMSF (30 mg/kg)**

TRATAMIENTO	ANIMAL	VARIACION PONDERAL ^a	SIGNOS CLINICOS ^b			SIGNOS HISTOLOGICOS ^c
			10	13	15	15 días
TOCP	107	83%	1	2	3 (-)	2
	108	100%	1	1	1 (+)	1
	109	98%	1	1	2 (-)	3
TOCP+PMSF	110	89%	1	2	2 (-)	1
	111	74%	2	2	3 (-)	3
	112	100%	1	2	3 (-)	2
PMSF+TOCP	113	100%	0	0	1 (+)	0
	114	78%	0	0	0 (+)	0
	115	94%	0	0	0 (+)	0
PMSF	116	75%	0	0	0 (+)	0
	117	124%	0	0	0 (+)	0
	118	121%	0	0	0 (+)	0

^a % de variación de peso a los 15 días con respecto al momento previo al tratamiento.

^b Signos clínicos de neurotoxicidad (escala de Johnson y Barnes, 1970) a los 10, 13 y 15 días después del tratamiento. 0: no se observa defecto alguno; 1: marcha ligeramente anormal; 2: marcha severamente anormal; 3: el animal puede mantenerse en pie pero frecuentemente se desploma; 4: el animal es incapaz de mantenerse en pie. Entre paréntesis, reflejo de extensión de las patas: (+) si al sujetar al animal por las alas contrae las patas y (-) si las deja extendidas.

^c signos histopatológicos (escala de Lotti *et al.* 1987) a los 15 días después del tratamiento. 0: ausencia de degeneración; 1: aparición aislada de fibras degeneradas que, a menudo, se observan también en los animales control y que se considera como fondo; 2: moderado número de fibras degeneradas; amplia degeneración de fibras; 4: degeneración severa (difícilmente observable).

fosfatasa ácida) en nervio ciático y plasma de gallinas se exponen en la Tabla III. A los 14 y 21 días del tratamiento con TOCP se observa un incremento en ambas actividades enzimáticas pero sin llegar a ser estadísticamente significativos, debido a la variabilidad individual. El valor de la actividad fosfatasa ácida en plasma, a los 21 días del tratamiento con 500 mg/kg de TOCP sí muestra una elevación estadísticamente significativa con respecto a los controles.

En la Figura 1 se muestra una sucesión de microfografías electrónicas en la que se observa la evolución de la degeneración axonal en animales tratados con TOCP. Se aprecia cierta anormalidad en los neurotúbulos del axoplasma y un adelgazamiento de la vaina de mielina, degeneración del axoplasma con vacuolización del mismo y degeneración completa. Estas alteraciones se observaron también en los

TABLA III

ACTIVIDADES ENZIMATICAS β -GLUCURONIDASA Y FOSFATASA ACIDA EN NERVIJO CIATICO Y PLASMA DE GALLINAS TRATADAS CON TOCP 500 mg/kg y/o PMSF 30 mg/kg A LOS 15 DIAS DE LA ADMINISTRACION

TRATAMIENTO	N. CIATICO		PLASMA
	β -Gluc. (mU/g)	Fosfatasa Acida (mU/mg)	Fosfatasa Acida (mU/ml)
CONTROL	32.23 \pm 10.8	4.49 \pm 1.20	4.78 \pm 1.28
TOCP	47.37 \pm 7.78	6.20 \pm 0.36	4.31 \pm 2.30
TOCP+PMSF	35.87 \pm 7.97	5.49 \pm 1.06	5.35 \pm 2.77
PMSF+TOCP	33.37 \pm 10.2	5.68 \pm 0.56	3.39 \pm 0.91
PMSF	34.77 \pm 7.25	5.33 \pm 0.83	5.64 \pm 2.82
CONTROL	31.7 \pm 2.0	4.69 \pm 0.96	2.83 \pm 0.63
TOCP (21 DIAS)	34.3 \pm 2.0	5.42 \pm 0.42	4.38 \pm 1.0*

* P<0.05

animales tratados con TOCP+PMSF. En el resto de los tratamientos no se apreciaron cambios característicos.

DISCUSION

Pocos son los estudios electrofisiológicos realizados en neuropatía retardada inducida por TOCP, y los resultados son bastante contradictorios. Así, Durham y Ecobichon (1984) realizaron un estudio a los 7, 14, 28, 42 y 56 días después de la intoxicación sin encontrar afectación funcional alguna, mientras que Robertson et al. (1987), por su parte, encuentran cambios significativos en el potencial de acción (tanto en su velocidad de conducción como en su duración) 21 días después del tratamiento. Sin embargo, estos trabajos utilizan métodos cruentos para la determinación de parámetros electrofisiológicos, con el consiguiente sacrificio del animal después de su medición. Es decir, sólo obtienen información puntual del estado funcional del nervio ciático de gallina en un determinado momento, sin posibilidad de realizar un seguimiento funcional del mismo animal a lo largo del tiempo.

En nuestro caso, realizamos un seguimiento de gallinas sometidas a distintos tratamientos, monitorizándolas *in vivo* a tiempos 0, 7, 14 y 21 días. En ningún mo-

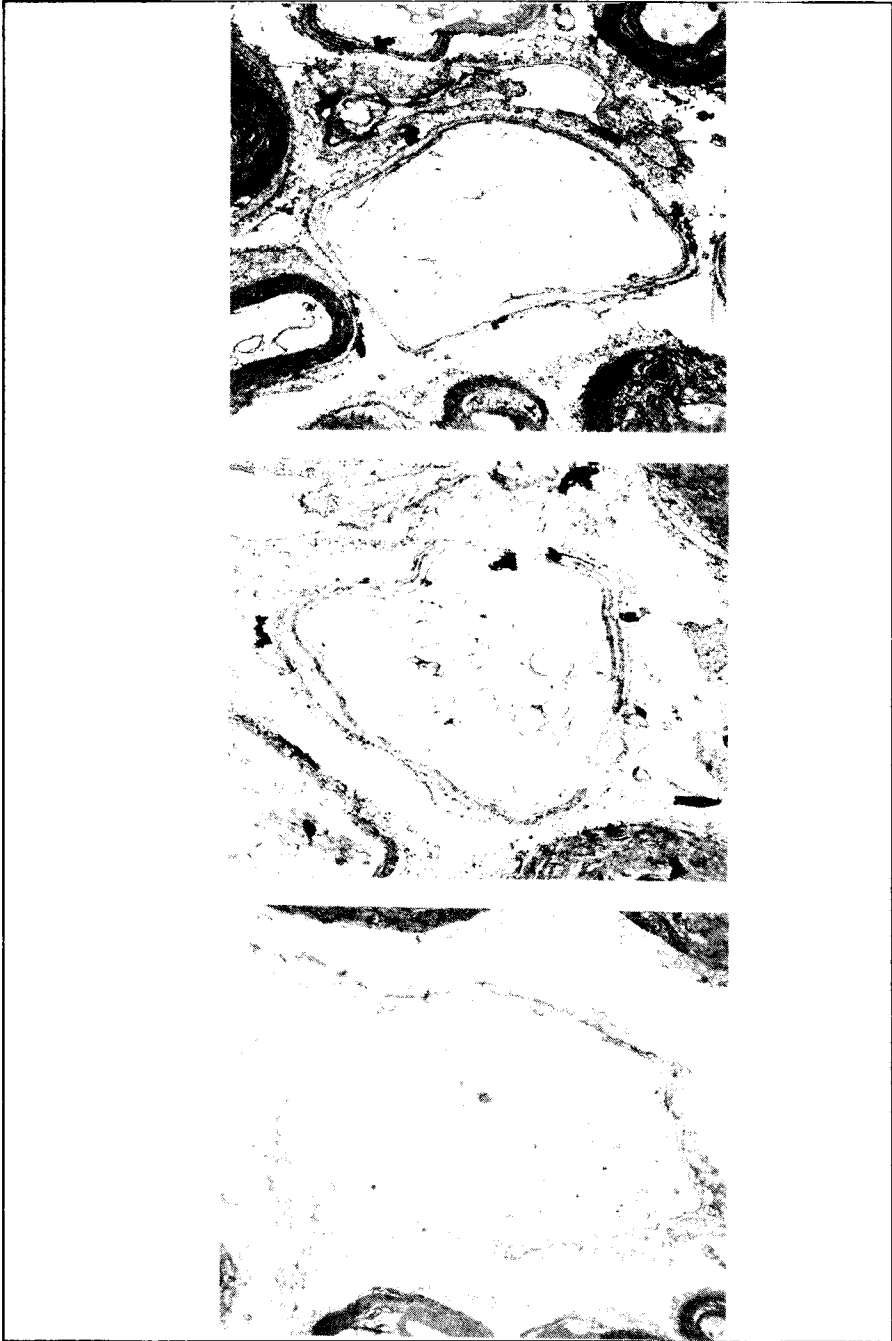


Figura 1: Sucesión de micrografías electrónicas (x4300) de nervio ciático de gallina a los 15 días de la administración de 500 mg/kg de TOCP (ver especificaciones en el texto).

mento se encontró alteración funcional alguna de los animales. La aparente contradicción de la coexistencia de una aparente normalidad funcional de la electrofisiología con un patrón clínico de intensa afectación locomotriz, puede explicarse teniendo en cuenta que la observación histopatológica demuestra una degeneración fundamentalmente de tipo axonal, en consonancia con lo descrito por Bouldin y Cavanagh (1979) en gato. Aun cuando la posible desmielinización segmentaria que conlleva fuese muy intensa (cosa poco probable) la existencia de unos pocos axones de gran tamaño con sus vainas de mielina intactas, serían capaces de conducir los estímulos eléctricos perfectamente, evitando la aparición de alteraciones en la velocidad de conducción.

En el estudio histopatológico se observó toda suerte de alteraciones descritas para la degeneración axonal (es decir, hinchazón de axones, adelgazamiento de vainas de mielina, infiltración fagocitaria, vacuolización citoplásmica, desmielinización de segmentos internodales, etc.). El hallazgo morfológico más significativo fue la aparición de cúmulos de regeneración, es decir, pequeños racimos de axones amielínicos o ligeramente mielinizados, rodeados por membrana basal y que predominaban sobre lesiones degenerativas. Eran más ostensibles a los 21 días del tratamiento con TOCP y quizás obedezcan a la "invasión" de fibras degeneradas por nuevos "brotes" de axones que inician la regeneración.

Como puede observarse en la Tabla II, los cambios histopatológicos sólo se manifestaron en los tratamientos con TOCP y TOCP+PMSF. Es en estos casos cuando se desarrolla la OPIDP por la puesta en marcha de las modificaciones que implica el proceso de envejecimiento de la NTE. La administración de PMSF 24 h después del tratamiento con TOCP no tiene efecto protector porque la NTE ya ha sufrido el proceso de envejecimiento. La mayor severidad de los signos clínicos que se observa en este tratamiento podría estar relacionado con los hechos recientemente descritos sobre la potenciación (Pope y Padilla, 1990) y promoción (Lotti et al., comunicación personal) producidos por el PMSF administrado después de dosis no neuropáticas de diisopropil fluorofosfato (DFP).

La administración del protector sólo (PMSF) ó 7 h antes del TOCP inhibe la NTE pero impide el envejecimiento. De este modo, la neuropatía no se manifiesta clínicamente y tampoco se observan alteraciones histopatológicas.

Por otra parte, el comportamiento de los enzimas lisosomales estudiados confirma y completa el fenómeno detectado. Es decir, el ligero incremento que muestran a los 15 días del tratamiento con TOCP estaría en consonancia con una no muy intensa proliferación de células de Schwann y células endoneurales, secundarias a la degeneración axonal. Sin embargo, se detectó un aumento importante y estadísticamente significativo de la fosfatasa ácida en plasma de gallinas tratadas con TOCP a los 21 días de la dosificación. Este resultado es compatible con el comunicado por Gless (1966) y Abou-Donia (1978 a, b) para gallinas tratadas con TOCP y leptofós, respectivamente.

No se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros enzimáticos diferentes a NTE, excepto en el caso de la fosfatasa ácida plasmática, que mostró un incremento tardío, lo que pone en entredicho su utilización como marcador bioquímico precoz de la degeneración axonal inducida por compuestos organofosforados neurotóxicos, como ha sido propuesto con anterioridad (Abou-Donia, 1988).

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido sufragado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (F.I.S.S.S., Proyecto número 89/1557).

BIBLIOGRAFIA

1. ABOU-DONIA, M.B. The role of acid phosphatase in delayed neurotoxicity induced by leptophos in hens. *Biochem. Pharmacol.*, 27, 2.055-2.058, 1978a.
2. ABOU-DONIA, M.B. Increased acid phosphatase activity in hens following an oral dose of leptophos. *Toxicol. Lett.*, 2, 199-203, 1978b.
3. ABOU-DONIA, M.B. Organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 21, 511-548, 1981.
4. ABOU-DONIA, M.B.; LAPADULA, D.M.; y CARRINGTON, C.D. Biochemical methods for assessment of neurotoxicity. En: *Perspectives in basic and applied toxicology*. Ballantine, B. (editor), Wright, London, 1-30, 1988.
5. ANDERSON, R.; y DUNHAM, C.B. Electrophysiologic changes in peripheral nerve following repeated exposure to organophosphorus agents. *Arch. Toxicol.*, 58, 97-101, 1985.
6. AVERBOOK, B.J.; y ANDERSON, R.J. Electrophysiological changes associated with chronic administration of organophosphorus. *Arch. Toxicol.*, 52, 167-172, 1983.
7. BAQUER, N.Z.; McLEAN, P.; y GREENBAUM, A.L. Enzymic differentiation in pathways of carbohydrate metabolism in developing brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53, 1.282-1.288, 1973.
8. BOULDIN, T.W.; y CAVANAGH, J.B. A fine-structural study of the early stages of axonal degeneration. *Am. J. Pathol.*, 94, 241-252, 1979.
9. CLOTHIER, B.; y JOHNSON, M.K. Rapid aging of neurotoxic esterase after inhibition by diisopropyl phosphorofluoridate. *Biochem. J.*, 177, 549-558, 1979.
10. CLOTHIER, B.; y JOHNSON, M.K. Reactivation and aging of neurotoxic esterase inhibited by a variety of organophosphorus esters. *Biochem. J.*, 185, 739-747, 1980.
11. DURHAM, H.D.; y ECOBICHON, D.J. The function of motor nerves innervating slow tonic skeletal muscle in hens with delayed neuropathy induced by tri-o-tolyl phosphate. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 62, 1.268-1.273, 1984.
12. GLEES, P. A morphological and neurologycal analysis of neurotoxicity illustrated by tri-cresylphosphate intoxication in the chick. VIII. Neurotoxicity of drugs. *Proc. Eur. Soc. Study Toxicity*, 136-148, 1966.
13. JOHNSON, M.K. Mechanism of protection against the delayed neurotoxic effects of organophosphorus esters. *Fed. Proc.*, 35, 73-74, 1976.
14. JOHNSON, M.K. The target for initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorus esters: biochemical studies and toxicological applications. *Rev. in Biochem. Toxicol.*, 4, 141-212, 1982.
15. JOHNSON, M.K.; y BARNES, J.M. Age and the sensitivity of chicks to the delayed neurotoxic effects on some organophosphorus compound. *Biochem. Pharmacol.*, 19, 3.045-3.047, 1970.
16. JOHNSON, M.K.; y LAUWERYS, R. Protection by some carbamates against the delayed neurotoxic effects of diisopropyl phosphorofluoridate. *Nature*, 222, 1.066-1.067, 1969.

17. LOTTI, M.; CAROLDI, S.; MORETTO, A.; JOHNSON, M.K.; FISH, C.J.; GOPINATH, C.; y ROBERTS, N.L. Central-peripheral delayed neuropathy caused by diisopropyl phosphorofluoridate (DFP): Segregation of peripheral nerve and spinal cord effects using biochemical, clinical and morphological criteria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **88**, 87-96, 1987.
18. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; y RANDALL, R.J. Protein measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
19. MOSS, D.W. Acid phosphatases. En: *Methods in enzymatic analysis*, **4**. Bergmeyer, H.U. (editor), Verlag Chemie, Weinheim, 93-101, 1984.
20. POPE, C.N.; y PADILLA, S. Protentiation of organophosphorus-induced delayed neurotoxicity by phenylmethylsulfonyl fluoride. *J. Toxicol. Environ. Health*, **31**, 261-274, 1990.
21. ROBERTSON, D.G.; SCHWAB, B.W.; SILLS, R.D.; RICHARDSON, R.J.; y ANDERSON, R.J. Electrophysiologic changes following treatment with organophosphorus induced delayed neuropathy-producing agents in the adult hen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **87**, 420-429, 1987.
22. STAHL, P.D.; y FISHMAN, W.H. β -d-Glucuronidasa. En: *Methods in enzymatic analysis*, **4**. Bergmeyer, H.U. (editor), Verlag Chemie Weinheim, 246-256, 1984.
23. WILLIAMS, D.G. Intramolecular group transfer is a characteristic of neurotoxic esterase and is dependent of the tissue source of the enzyme. *Biochem. J.*, **209**, 817-829, 1983.

Recibido el 22 de Febrero de 1991

Aceptado el 14 de Marzo de 1991