

# EFECTO DEL INSECTICIDA MALATHION SOBRE EL EPITELIO

## GERMINATIVO DE TESTÍCULO DE RATÓN CF1

Omar Espinoza-Navarro, Héctor Rodríguez Bustos, Héctor Kemble Molina y Camilo Arriaza O.

### RESUMEN

El malathion es un plaguicida organofosforado que actúa como inhibidor de la acetilcolinesterasa e induce daños en el ADN. Fue ampliamente utilizado en Arica, Chile, para eliminar la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*). El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos de malathion sobre la celularidad del epitelio seminífero y la proliferación celular en testículo de ratón. Treinta ratones adultos de la cepa CF1 fueron divididos en grupo control y cinco grupos experimentales ( $n=5$ , cada grupo). Los grupos experimentales fueron tratados con una dosis intraperitoneal (p.i.) única de malathion,  $240\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $1/12\text{ DL}_{50}$ ) y analizados a los días 1; 8,6; 17,2; 34,4 y 43 post tratamiento. Posteriormente, el testículo derecho fue procesado para histología, mientras que el

izquierdo fue incubado por 1h en BrdU, para estudio inmunocitoquímico. Los resultados muestran que a la dosis empleada malathion altera la progresión de la espermatogénesis en ratones CF1, provocando una disminución de la síntesis de ADN y la proliferación celular. Se concluye que ratones adultos CF1 tratados con malathion expresan efectos desde agudo en los primeros días de análisis (1 y 8,6 días) hasta crónico a los 17,2; 34,4 y 43 días post tratamientos, con mayores índices de taponamiento tubular y aumento de vacuolización en el epitelio germinativo del testículo. El uso, la manipulación y almacenaje de estos pesticidas requiere de normas y protocolos más estrictos para no alterar el medio ambiente y la salud pública.

### Introducción

Los insecticidas organofosforados (OP), entre los cuales se encuentra el malathion, son ésteres del ácido fosfórico con propiedades electrofílicas y capacidad fosforilante de esterases (Karunaratne y Hemingway, 2001). Estos compuestos inhiben a la enzima acetilcolinesterasa, encargada de degradar a la acetilcolina. La acumulación del neurotransmisor acetilcolina es responsable de las manifestaciones clínicas de la intoxicación, en animales y en humanos (Bello-Ramírez *et al.*, 2000; Kwong, 2002; Joshi y Sharma, 2011, Hashjin *et al.*, 2013).

La exposición a altas concentraciones de los OP puede causar síntomas tales como náusea, cefalea, disnea, falta de coordinación, parálisis y espasmos musculares (Brenner,

1992) e incluso tiene acción genotóxica (Rodríguez y Bustos-Obregón, 2000, Sogorb y Vilanova, 2002; Baconi *et al.*, 2013).

En mamíferos, la degradación de los OP ocurre a través de enzimas hidrolíticas tipo fosfatasas y carboxil-terasas. La toxicidad del malathion se debe a sus metabolitos, el malaoxon e isomalathion, que son 40 veces más tóxicos que el malathion. Estudios *in vitro* describen que el malaoxon puede inducir rupturas del DNA en lugares donde se ubican oncogenes o genes supresores de tumores, por lo que este metabolito podría ser considerado como un potencial cancerígeno y mutágeno (Blasiak *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2012).

A nivel reproductivo, el malathion parece causar teratozoospermia. En ratones se observó que las alteraciones más

comunes producidas en espermatozoides son a nivel de la cola, y en menor proporción en la cabeza. También se han reportado alteraciones ultraestructurales a nivel de las células de Sertoli, donde provoca vacuolización (Bustos-Obregón y González-Hormazabal, 2003). Las propiedades alquilantes de los OP podrían verse reflejadas en la interferencia con el ensamblaje normal de las proteínas flagelares (Espinoza-Navarro y Bustos-Obregón, 2014).

El efecto de los plaguicidas sobre el medio ambiente y en la salud pública es un tema que demanda una mayor atención en el manejo de estos productos, para evitar los daños colaterales (Olalquiaga y Lobos, 1993; Chirinos y Geraud-Pouey, 2011). En Arica, Chile, el malathion fue ampliamente usado en los

valles agrícolas de Lluta y Azapa para la erradicación de la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*); sin embargo, otras especies también fueron afectadas, alterando el equilibrio del medio ambiente.

Dada la potencialidad tóxica del malathion sobre distintos sistemas biológicos, en este trabajo se analizan los efectos de una dosis única de malathion a una concentración de  $1/12\text{ DL}_{50}$  a diferentes días post-administración, sobre la organización histológica (celularidad del epitelio seminífero) y la proliferación celular (inmunocitoquímica de BrdU) de testículo de ratón adulto de la cepa CF1.

### Materiales y Métodos

Treinta ratones machos de la cepa CF1, de 10 a 12 semanas, fueron distribuidos en un

### PALABRAS CLAVE / Espermatogénesis / Malathion / Ratón / Toxicología Reproductiva /

Recibido: 10/09/2014. Modificado: 15/06/2015. Aceptado: 08/07/2015.

**Omar Espinoza Navarro.** Profesor de Biología y Ciencias, Universidad de Chile. Magíster en Educación, Universidad de Tarapacá, Chile. Doctor en Biología Celular y Genética, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), España. Investigador,

Universidad de Tarapacá, Chile. Profesor, Universidad de Tarapacá, Chile. Dirección: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Tarapacá. Avenida General Velásquez N° 1775, Casilla 7/D, Arica-Chile. e-mail: oespinoz@uta.cl

**Héctor Rodríguez Bustos.** Médico Veterinario, Universidad de Chile y Magíster en Ciencias Biológicas, Universidad de Chile. Doctor en Biología Celular y Genética, UAM, España. Profesor, Universidad de Chile. e-mail: hrodrigu@med.uchile.cl

**Hector Kemble Molina.** Matrón, Obstetricia y Puericultura, y Programa Ayudante Alumno, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

**Camilo Arriaza O.** Médico Veterinario y Magíster en Ciencias, Universidad de Chile. Profesor, Universidad de Chile.

## EFFECT OF MALATHION INSECTICIDE ON TESTICULAR GERMINAL EPITHELIUM OF CF1 MICE

Omar Espinoza-Navarro, Héctor Rodríguez Bustos, Héctor Kemble Molina and Camilo Arriaza O.

### SUMMARY

*Malathion is an organophosphorus pesticide that acts as an acetylcholinesterase inhibitor and induces DNA damage. It was widely used in Arica, Chile, to eliminate the fruit fly *Ceratitis capitata*. The aim of this study was to analyze the effects of malathion on the cellularity of the seminiferous epithelium and cell proliferation in the mouse testis. Thirty adults mice of the CF1 strain were divided into control group and five experimental groups (n=5 each). The experimental groups were treated with single intraperitoneal (i.p.) doses of malathion, 240mg·kg<sup>-1</sup> (1/12 LD<sub>50</sub>) and analyzed on days 1; 8.6; 17.2; 34.4 and 43 post treatment. Subsequently, the right testis was processed for his-*

*tology and the left testicle was incubated for 1h in BrdU for immunocytochemistry. The results show that at the applied dose, malathion alters the progression of CF1 mice spermatogenesis, causing a decrease in DNA synthesis and cell proliferation. We conclude that adult CF1 mice treated with malathion expressed from acute effects in the early days of analysis (1 and 8.6 days) to a chronic effect at 17.2, 34.4 and 43 post treatment days, with higher rates of tubular plugging and increased vacuolization in the germinal epithelium of the testis. The use, handling and storage of agropesticides requires stricter standards and protocols, not to alter the environment and public health.*

## EFEITO DE INSETICIDA MALATION SOBRE O EPITÉLIO GERMINATIVO DE TESTÍCULO DE RATO CF1

Omar Espinoza-Navarro, Héctor Rodríguez Bustos, Héctor Kemble Molina e Camilo Arriaza O.

### RESUMO

*O malation é um praguicida organofosforado que atua como inibidor da acetilcolinesterase e induz danos no ADN. Foi amplamente utilizado em Arica, Chile, para eliminar a mosca da fruta (*Ceratitis capitata*). O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos de malation sobre a celularidade do epitélio seminífero e a proliferação celular em testículo de ratos. Trinta ratos adultos da cepa CF1 foram divididos em grupo controle e cinco grupos experimentais (n=5, cada grupo). Os grupos experimentais foram tratados com uma dose intraperitoneal (p.i.) única de malation, 240mg·kg<sup>-1</sup> (1/12 DL<sub>50</sub>) e analisados aos dias 1; 8,6; 17,2; 34,4 e 43 post tratamento. Posteriormente, o testículo direito foi processado para histologia, enquanto que o*

*esquerdo foi incubado por 1h em BrdU, para estudo imunocitoquímico. Os resultados mostram que a dose empregada malation altera a progressão da espermatogênese em ratos CF1, provocando uma diminuição da síntese de ADN e a proliferação celular. Conclui-se que ratos adultos CF1 tratados com malation expressam efeitos desde agudo nos primeiros dias de análise (1 e 8,6 dias) até crônico aos 17,2; 34,4 e 43 dias após tratamentos, com maiores índices de entupimento tubular e aumento de vacuolização no epitélio germinativo do testículo. O uso, a manipulação e armazenagem destes pesticidas requerem de normas e protocolos mais estritos para não alterar o meio ambiente e a saúde pública.*

grupo control y cinco grupos experimentales, cada uno constituido por cinco individuos. Los ratones fueron alimentados con pellet comercial y agua *ad libitum*. El Comité de Ética/Bioética de la Universidad de Tarapacá aprobó los protocolos de investigación en cumplimiento al trabajo con animales de experimentación, según los principios de las 3Rs (CONICYT, 2009).

A cada grupo experimental se le administró por vía intraperitoneal (i.p.) y en dosis única 240mg·kg<sup>-1</sup> (1/12 de la DL<sub>50</sub>) de malathion (ANASAC, Chile) vehiculizado en aceite de maíz. Al grupo control solo se les administró aceite de maíz. Luego de 1; 8,6; 17,2; 34,4 y 43 días, los animales fueron sacrificados según normas estandarizadas de eutanasia (CONICYT, 2009). Estos tiempo fueron empleados considerando que cada ciclo de la espermatogénesis en ratones

dura 8,6 días; 17,2 días corresponde a dos ciclos; 34,4 días representa cuatro ciclos de la espermatogénesis y es equivalente a una onda de la espermatogénesis; y 43 días es una onda más un ciclo (Bustos-Obregón y González-Hormazabal, 2003). Una vez sacrificados los animales se extrajeron ambos testículos por vía retroperitoneal.

El testículo derecho fue fijado por 8h en Bouin alcohólico e incluido en parafina (punto de fusión 56-58°C), practicándose cortes de 5µm de espesor para técnica histológica de hematoxilina y eosina. Se analizó la integridad del epitelio seminífero, cuantificando la discontinuidad y vacuolización del epitelio germinal, y el taponamiento tubular, cuyos resultados se expresaron en porcentajes. Además, se cuantificaron las diferentes poblaciones del epitelio seminífero por túbulos:

espermatogonias (A, B e In), paquitenos y espermátidas alargadas y redondas (Monesi, 1962; Setchell, 1978).

Paralelamente, el testículo izquierdo luego de ser liberado de la túnica albugínea, fue preincubado por 15min en Ham F-10, a pH 7,2 y 35°C, 100% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego se adicionó 50µl de bromodeoxiuridina (BrdU) y se incubó por 1h. Posteriormente se fijó en Bouin alcohólico (4h) e incluyó en parafina de punto de fusión 56-58°C. Se practicaron cortes de 5µm que fueron montados en portaobjetos pretratados con Vectabond para inmunocitoquímica según los protocolos del kit comercial anti-BrdU (ZYMED® Inc, San Francisco, CA, EEUU). Los resultados se expresaron como promedios de células marcadas (en proliferación) por túbulo y el porcentaje de túbulos con células marcadas.

### Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el Software Origin 8.0, utilizando los promedios, desviación estándar, error estándar, y correlaciones. La significancia estadística de las diferencias dentro y entre grupos se realizó mediante las pruebas t student y ANDEVA (p<0,05).

### Resultados

En la Tabla I se aprecia como efecto agudo (día 1) de la administración de malathion un aumento estadísticamente significativo en las células espermatogoniales del tipo B y en paquitenos, efecto que igualmente se observa en espermátidas redondas y alargadas por túbulos. Sin embargo las espermatogonias del tipo A muestran una disminución significativa. A partir de los 8,6 días se mantiene el alza

significativa de las espermatogonias tipo B, con bajas significativas en paquitenos, espermatidas redondas y alargadas. Todos los grupos tratados con malathion muestran una disminución significativa en las espermatogonias troncales tipo A.

En la Tabla II se muestran los resultados según uso de la técnica inmunocitoquímica de BrdU, según el número de espermatogonias positivas vs túbulos seminíferos con células marcadas, y el porcentaje de túbulos con células marcadas en relación al total de túbulos, bajo los efectos del malathion. Se observa una disminución significativa en el número de espermatogonias marcadas desde el tratamiento a los 8,6 días y hasta el final post-tratamiento (43 días). Igual comportamiento se

observa en los túbulos marcados, pero esta baja no es significativa.

En la Tabla III se observa un porcentaje alto de túbulos seminíferos con taponamiento tras la administración de malathion (1/12 DL<sub>50</sub>), característica que continúa en ascenso durante todo el periodo de evaluación. La vacuolización celular y epitelial alcanza un valor máximo de 37,3 % al día 34,4 post-inyección de malathion.

En la Figura 1 se muestra una sección testicular con tinción inmunocitoquímica de DAB/HRP con uso de anticuerpos específicos anti-BrdU y contraste con hematoxilina. En el estrato basal del compartimiento tubular se observan células teñidas de color marrón intenso.

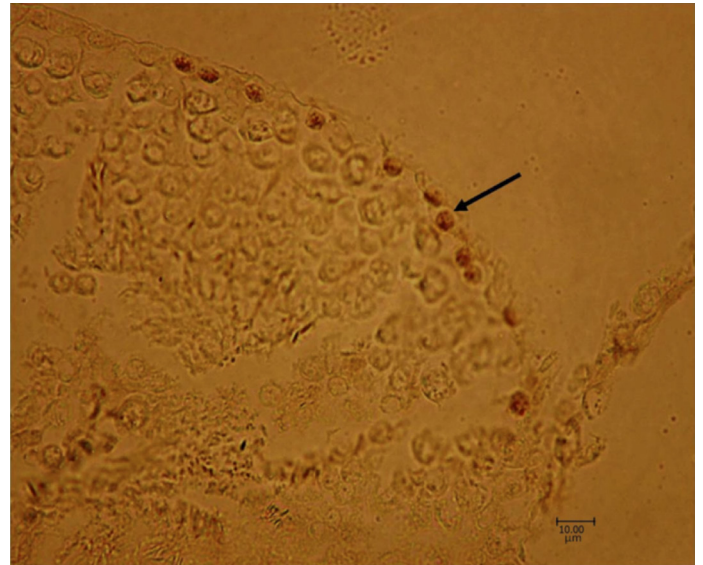


Figura 1. Microfotografía de túbulo seminífero de ratón (40X) de grupo tratado con malathion 1/12 LD<sub>50</sub> (17,2 días post-tratamiento), sometido a técnica de inmunocitoquímica (BrdU). Se observan células marcadas positivamente de color marrón intenso, en proliferación (flecha). Barra: 10µm.

TABLA I  
DISTRIBUCIÓN DE LA RAZÓN ENTRE LA POBLACIÓN CELULAR DEL EPITELIO GERMINATIVO VS TÚBULOS SEMINÍFEROS EN TESTÍCULO DE RATÓN ADULTO CEPA CF1, TRATADOS CON 1/12 DL<sub>50</sub> MALATHION A 1; 8,6; 17,2; 34,4; 43 DÍAS POST-INYECCIÓN

	Control	día 1	día 8,6	día 17,2	día 34,4	día 43
A/túbulo	2,95	0,97*	2,01	1,20*	1,60*	1,90
In/túbulo	2,99	2,90	1,30*	3,00	2,00*	2,60
B/túbulo	7,78	12,81*	11,30*	12,00*	7,00	13,00*
P/túbulo	46,90	58,10*	40,30*	45,28	40,60*	42,10*
SR/túbulo	72,39	115,44*	40,36*	76,37	59,94*	52,02*
SA/túbulo	32,20	48,02*	24,52*	38,58	29,05	20,74*

A: espermatogonia troncal, In: espermatogonia intermedia, B: espermatogonia Tipo B, P: paquitenos, SR: espermatida redonda, SA: espermatida alargada. \* p<0,05.

TABLA II  
INMUNOCITOQUÍMICA CON TÉCNICA DE BRDU EN ESPERMATOGONIAS Y TÚBULOS MARCADOS VS TÚBULOS SEMINÍFEROS, DE RATONES ADULTOS CEPA CF1 TRATADOS CON 1/12 DL<sub>50</sub> MALATHION A 1; 8,6; 17,2; 34,4; 43 DÍAS POST-INYECCIÓN

	Control	día 1	día 8,6	día 17,2	día 34,4	día 43
Espermogonias marcadas	17,3 ±4,0	17,4 ±2,9	9,70 ±2,9*	15,82 ±3,4*	14,26 ±3,0	11,11 ±2,8*
Túbulos marcados	0,65 ±0,17	0,64 ±0,1	0,48 ±0,21	0,51 ±0,23 n	0,46 ±0,3	0,48 ±0,13

Promedio ± desviación estándar. \* p<0,05.

TABLA III  
ANÁLISIS HISTOLÓGICO PARA DETERMINAR TAPONAMIENTO Y VACUOLIZACIÓN EN TÚBULOS SEMINÍFEROS DEL TESTÍCULO DE RATÓN ADULTO INDUCIDO POR MALATHION (1/12DL<sub>50</sub>), EN DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL, A 1; 8,6; 17,2; 34,4; 43 DÍAS POST-INYECCIÓN

	Control	día 1	día 8,6	día 17,2	día 34,4	día 43
Vacuolización	17,6	11,3*	8,0*	5,0*	37,3*	23,0*
Taponamiento	32,8	30,0	46,0*	53,0*	26,6	39,0*
Total túbulos	250	250	250	250	250	250

\* p<0,05.

## Discusión

Choudhary *et al.* (2008) describen que en ratas el malathion induce efectos significativos sobre algunas variables testiculares como disminución del peso testicular asociado a una menor densidad espermática en el epidídimo y una caída en los índices de fecundación. Sin embargo, también aumentan el contenido total de proteínas y colesterol testiculares. Paralelamente afecta la expresión de las enzimas fosfatasa (ácida y alcalina) y los niveles de testosterona, que disminuyen.

Los OP provocan daños a nivel del epitelio germinal de testículo en ratones CF1, los que se traducen en taponamiento de los túbulos seminíferos, causado por el debilitamiento de las uniones intersertolianas adluminales. Este taponamiento podría ser considerado como una respuesta aguda al malathion, lo que implica la liberación prematura de las células meióticas durante la espermiogénesis (Bustos-Obregón y González-Hormazabal, 2003). La espermatogénesis en ratón se desarrolla en base a cuatro ciclos de 8,6 días cada uno, con 12

estadios celulares diferentes, los cuales están determinados por diferentes asociaciones de células. Algunos de estos estadios se caracterizan por ser de tipo mitótico, mientras que otros son de progreso en el desarrollo de la espermatogénesis (Setchell, 1978). Malathion alteraría la frecuencia de los diferentes estadios del ciclo espermatogénico, comportamiento que se observa en las Tablas I y II, con disminución de las células en síntesis de ADN y en la disminución de túbulos con células marcadas.

Otros estudios donde se evaluó la replicación de ADN mediante incorporación de timidina tritiada describen los efectos inhibitorios sobre la proliferación celular en presencia de paraoxón, que es otro OP utilizado comúnmente en agricultura (Rodríguez y Bustos-Obregón, 2000).

Los OP posiblemente inhiban la síntesis de ADN en testículo de mamíferos, causando daños genéticos y epigenéticos (Blasiak *et al.*, 1999). La capacidad del malathion para atravesar las membranas celulares e ingresar al núcleo para interactuar con el ADN estaría dada por sus características de lipo-solubilidad (Karunaratne y Hemingway, 2001) El uso de técnicas inmunocitoquímicas de incorporación de BrdU permite demostrar la síntesis de ADN en los tejidos analizados. Lo descrito indicaría que estas células entraron en mitosis durante el pulso de BrdU y el periodo de incubación, es decir ocurrió la fase 'S' del ciclo celular (Figura 1).

La dosis utilizada manifiesta sus efectos tóxicos a través del taponamiento del lumen tubular. Resultados similares observa Massoud *et al.* (2010) en el tejido hepático de ratas utilizando el mismo OP.

Las grandes limitaciones en los estudios sobre la toxicidad de plaguicidas están representadas por la inmensa gama de tóxicos químicos sintéticos empleados en el mundo y la dificultad para determinar los efectos en su composición pura, ya que por lo general suelen asociarse al uso de mezclas químicas de diferentes presentaciones para aumentar su efecto tóxico

en las plagas, ejerciendo una acción sinérgica en todos los sistemas orgánicos y siendo uno de los más afectados los parámetros reproductivos, con acción directa en el testículo y el epidídimo, alterando la meiosis y el accionar del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Saadi *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2011). Efectos similares han sido descritos para las personas que trabajan con estos pesticidas, quienes por lo general no siguen normas ni protocolos estrictos de manipulación y almacenamiento; se reporta que malathion induce un daño significativo en la calidad seminal, con una baja concentración de espermatozoides, una pobre motilidad y un alto porcentaje de teratozoospermia (Hossain *et al.*, 2010).

Por ello es importante destacar que el uso de pesticidas en la agricultura requiere de mejores políticas de manejo adecuado, de tal manera que no alteren el medio ambiente y la salud pública humana, como ocurrió en el norte de Chile (Olalquiaga y Lobos, 1993; Chirinos y Geraud-Pouey, 2011; Strada *et al.*, 2012).

## Conclusiones

Malathion, a 1/12 de la LD<sub>50</sub>, en dosis única (i.p.), altera la progresión en el desarrollo de la espermatogénesis, provocando una disminución de las células en síntesis de ADN y la proliferación celular en testículo de ratones adultos de la cepa CF1, expresando efectos desde agudo en los primeros días de análisis (1 y 8,6 días) hasta un efecto crónico en los análisis de post-tratamientos a los 17,2, 34,4 y 43 días.

Ratones CF1 tratados con malathion expresan mayores índices de taponamiento tubular y aumento de vacuolización en el epitelio germinativo del testículo.

Los efectos del pesticida malathion podrían traducirse en una disminución de la fertilidad, infertilidad y esterilidad, así como también en mutaciones transmisibles a las nuevas generaciones.

El uso de estos agroquímicos requiere de mejores procedimientos de manejo y almacenaje

para no alterar el medio ambiente y la salud pública humana.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subvencionado por el proyecto UTA Mayor N° 4712-13, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.

## REFERENCIAS

- Baconi D, Barca M, Manda G, Ciobanu A, Balalau C (2013) Investigation of the toxicity of some organophosphorus pesticides in a repeated dose study in rats. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 54: 349-356.
- Bello-Ramírez M, Carreón B, Nava A (2000). A theoretical approach to the mechanism of biological oxidation of organophosphorus pesticides. *Toxicology* 149: 63-68.
- Blasiak J, Jaloszynski P, Trzeciak A, Szyfter K (1999) *In vitro* studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutat. Res. / Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.* 445: 275-283.
- Brenner L (1992) Malathion fact sheet. *J. Pestic. Ref.* 12: 29-37.
- Bustos-Obregón E, González-Hormazabal P (2003) Effect of a single dose of malathion on spermatogenesis in mice. *Asian J. Androl.* 5: 105-107.
- Chirinos D, Geraud-Pouey F (2011) El manejo de plagas agrícolas en Venezuela. Análisis y reflexiones sobre algunos casos. *Interciencia* 36: 192-199.
- CONICYT (2009) *Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal*. 4º Taller de Bioética. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica. (Enero, 2009). Santiago, Chile.
- Choudhary N, Goyal R, Joshi SC (2008) Effect of malathion on reproductive system of male rats. *J. Environ. Biol.* 29: 259-262.
- Espinoza-Navarro O, Bustos-Obregón E (2014) Effects of malathion on cellularity and sperm differentiation in testis and epididymis of adults rats. *Int. J. Morphol.* 32: 119-124.
- Hashjin G, Dizaj F, Attaran H, Koohi M (2013) Malathion induce anxiety in the male adult mouse. *Arch. Med. Sci.* 9: 368-371.
- Hossain F, Ali O, D'Souza UJ, Naing DK (2010) Effects of pesticide use on semen quality among farmers in rural areas of Sabah, Malaysia. *J. Occup. Health* 52: 353-360.
- Joshi S, Sharma P (2011) Male reproductive toxicity of organophosphorus compounds: A review. *Toxicol. Environ. Chem.* 93: 1486-1507.
- Karunaratne S, Hemingway J (2001) Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in population of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bull. WHO* 79: 1060-1064.
- Kwong T (2002) Organophosphate pesticides: Biochemistry and clinical toxicology. *Therap. Drug. Monit.* 24: 144-149.
- Lu X, Ma Y, Wang C, Zhang X, Jin D, Huang C (2012) Cytotoxicity and DNA damage of five organophosphorus pesticides mediated by oxidative stress in PC12 cells and protection by vitamin E. *J. Environ. Sci. Health B* 47: 445-454.
- Massoud A, Derbalah S, Iman A, Abd-Elaziz A, Ahmed S (2010) Oral toxicity of malathion at low doses in Sprague-Dawley rats: A biochemical and histopathological study. *Monofyia Vet. J.* 7: 183-196.
- Monesi V (1962) Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *J. Cell Biol.* 14: 1-18.
- Olalquiaga G, Lobos C (1993) *La Mosca del Mediterráneo en Chile: Introducción y Erradicación*. Servicio Agrícola y Ganadero. Ministerio de Agricultura. Chile. 268 pp.
- Rodríguez H, Bustos-Obregon E (2000) An *in vitro* model to evaluate the effect of an organophosphoric agropesticide on cell proliferation in mouse seminiferous tubules. *Andrologia* 32: 1-5.
- Saadi L, Lebailli N, Benyousi M (2008) Exploration of cytotoxic effect of malathion on some rat organs structure. *Comm. Agric. Appl. Biol. Sci.* 73: 875-881.
- Setchell B (1978) Cell associations and spermatogenic cycle in the mammalian testis. En Finn CA (Ed.) *The Mammalian Testis*. Cornell University Press. Ithaca, NY, EEUU. pp. 198-210.
- Sogorb M, Vilanova E (2002) Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* 128: 215-228.
- Strada J, Ricca A, Conles M, Silva M, Rojas D, Casini C, Piati F, Martínez M (2012) Evaluación de plaguicidas en granos de maíz (*Zea mays L.*) y trigo (*Triticum aestivum L.*) posterior a la aplicación en el almacenamiento y en el campo. *Interciencia* 37: 412-417.
- Yu Y, Yang AM, Zhang JH, Hu SK, Yan H (2011) Synergistic effect of dichlorvos, dimethoate and malathion mixture on reproduction toxicity in male mice. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 45: 810-814.