
Modificaciones morfológicas y metabólicas hepáticas inducidas por pesticidas

Morphological and liver changes induced by pesticides

M.J. Moreno, J.C. Arenas, A. Berjón, M.P. Fernández

INTRODUCCIÓN

Desde su aparición en los años 40 los pesticidas han sido ampliamente usados tanto en agricultura y veterinaria como en salud pública en muchos países. Desde el punto de vista de la salud pública los pesticidas han sido claves en el control de vectores transmisores de enfermedades a los animales y al hombre. Por otra parte, la aplicación de los pesticidas a las tierras de cultivo ha supuesto un incremento notable en la producción agrícola al disminuir las pérdidas ocasionadas por las plagas. Por todo ello su utilización ha ido en aumento y actualmente resultan fundamentales para conseguir unos niveles de cultivo apropiados para las demandas.

Sin embargo, los pesticidas son venenos, deliberadamente añadidos al medio ambiente con el propósito de destruir ciertas formas de vida. La toxicidad y la persistencia en el medio son características buscadas, pues de ellas depende su finali-

dad plaguicida; pero es en estas características donde radica su peligrosidad.

Una vez que los pesticidas han accedido al medio ambiente se integran en complejos ciclos biogeoquímicos que les permiten penetrar inalterados en las cadenas alimentarias y concentrarse de esa forma en las especies de un nivel trófico superior, entre ellas el hombre.

Por ello, aparte del riesgo de una intoxicación accidental provocada por la exposición a una dosis única y generalmente alta del pesticida, el hombre se encuentra expuesto a lo largo del tiempo a pequeñas dosis de pesticidas presentes tanto en el medio ambiente como en los alimentos ingeridos.

La utilización de pesticidas supone por tanto un arma de doble filo. Se hace necesaria una evaluación de la relación beneficio/riesgo que deriva del uso de estos compuestos.

Según la OMS (1972), el 90% de los pesticidas que penetran en el organismo

ANALES Sis San Navarra 1998, 21 (Supl. 3): 91-98.

Departamento de Fisiología y Nutrición. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra.

Correspondencia:

A. Berjón San Juan
Departamento de Fisiología y Nutrición.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Navarra
31008 Pamplona
Tfno. 948 42 56 00 (Ext. 6225)
Fax 948 42 56 49

humano lo hacen a través de la vía oral junto con los alimentos. Una vez que atraviesan el epitelio intestinal se dirigen al hígado donde van a ser metabolizados.

Resulta por tanto de interés conocer los efectos de estos xenobióticos o los subproductos derivados de su biotransformación sobre la propia función hepática donde con mayor frecuencia e intensidad se ejerce el efecto tóxico.

Para la realización de este trabajo se seleccionaron de entre los pesticidas más utilizados, un fungicida (captan), dos insecticidas (lindano y deltametrina) y un herbicida (paraquat).

Las referencias sobre la toxicidad del captan son escasas, habiéndose descrito disminución de la ingesta y peso, polidipsia, diarrea, hipotermia y postración en rata¹. Estudios bioquímicos en eritrocitos humanos aislados² muestra una depleción de potasio intracelular que era prevenido cuando las células se preincubaban con GSH.

La toxicidad del lindano ha sido mucho más estudiada, siendo conocida su capacidad para ser transportada a través de la piel³, su acumulación en los tejidos⁴ y su capacidad para generar radicales libres en hepatocitos aislados. Asimismo Sandy y col.⁵ describen procesos de peroxidación lipídica hepática del paraquat.

Por todo ello en el presente trabajo se plantea ahondar en la hepatotoxicidad de estos xenobióticos en tratamientos *in vitro* e *in vivo* de rata, estudiando los efectos en relación con la hepatotoxicidad, gluconeogénesis, consumo de oxígeno, generación de radicales libres y sus repercusiones a nivel celular y subcelular (mitocondrial y lisosomal).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar machos (230-280g) alimentadas *al libitum*. En los experimentos *in vitro* las ratas eran privadas de alimentación sólida durante las 48 horas previas al experimento con el fin de provocar una depleción del glucógeno hepático. Las ratas fueron criadas y mantenidas en el "Centro de Investigación en Farmacobio-

logía Aplicada" de la Universidad de Navarra de acuerdo con las normas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio).

Aislamiento de hepatocitos

Los estudios "in vitro" se realizaron en hepatocitos aislados de rata obtenidos según la técnica de perfusión con colagenasa descrita por Berry y Friend⁶. La viabilidad de los hepatocitos aislados se enjuició en base al principio de exclusión del azul tripano. Se consideraron viables únicamente aquellas células que no se tiñeron con dicho colorante y sólo se emplearon suspensiones con un mínimo de 85% de células íntegras.

Tratamientos con los pesticidas

"*In vitro*": Los pesticidas se añadían al medio de incubación en el que se mantenía la suspensión de hepatocitos disolviéndolos previamente en agua (paraquat) o en dimetilsulfóxido (lindano, captan y deltametrina). Cuando se usaba dimetil-sulfóxido como disolvente, éste era añadido a los experimentos control.

"*In vivo*": Se realizaron tratamientos subagudos de siete días de duración con administración oral diaria de lindano en una sola dosis de 10 mg/ día. El lindano se administraba disuelto en aceite de oliva a razón de 0,2 ml/100 g de peso animal. Un grupo de animales control recibía la misma cantidad de aceite de oliva y otro grupo de ensayo no recibía nada.

En otro ensayo se estudiaron los efectos de la administración aguda de paraquat (70 mg/k) disuelto en agua (0,2 ml/K) por vía oral en una única administración.

Citotoxicidad y gluconeogénesis

La citotoxicidad se valoró por la liberación al medio de los enzimas citosólicos y/o mitocondriales: lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (ASAT), y alaninoaminotransferasa (ALAT). La actividad de estos enzimas fue determinada según las técnicas de Bergmeyer y Horder⁷ y Bergmeyer y col.⁸

La actividad gluconeogénica se determinó midiendo la producción de glucosa pro-

ducida al incubar la suspensión de hepatocitos con distintos precursores (piruvato, lactato, glicerol, L-alanina y fructosa). La técnica utilizada fue la de Bergmeyer y col.⁹

Peroxidación lipídica

Para la valoración del grado de peroxidación lipídica, se empleó el método de Buege y Aust (1978), basado en la detección del malonildialdehído (MDA) como producto de la peroxidación lipídica.

Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno por hepatocitos aislados de rata se determinó por una técnica polarográfica con utilización de un electrodo tipo Clark.

Glutación

Los hidroperóxidos formados a través de la peroxidación lipídica pueden seguir un segundo camino que implica consumo de glutatión (GSH) celular. Esta segunda vía consiste en la reducción de los hidroperóxidos lipídicos por la enzima glutatión peroxidasa (Selenio-dependiente) y el concurso de la glutatión-reductasa, NADP y glucosa 6-P deshidrogenasa.

El nivel de activación de esta vía puede ser evaluado por la actividad de los enzimas o bien determinando la modificación, respecto del nivel basal, de glutatión que es el sustrato utilizado como reductor.

La técnica utilizada para determinar los niveles de glutatión en hepatocitos aislados de rata fue la de Hissin y Hilf¹¹.

Aislamiento microsomal

La fracción microsomal de los hepatocitos fue aislada siguiendo la técnica de Lake¹². Partiendo de ratas sometidas a 24 horas de ayuno se obtenía el homogenado hepático. Manteniendo la temperatura entre 0 y 4°C se centrifugaba a 10.000 g durante 20' y una vez separado el sobrenadante se volvía a centrifugar el pellet resuspendido a 100.000 g durante una hora. El pellet resuspendido contenía la fracción aislada de los microsomas. El grado de lesión microsomal se valoró en función de la actividad glucosa 6 fosfatasa.

Actividad mitocondrial

Se valoraron la actividad lactato deshidrogenasa¹³, los niveles de ATP¹⁴, consumo de oxígeno potencial de membrana¹⁵, GSH y peroxidación lipídica¹⁶ y alteraciones citológicas a nivel de microscopía óptica y electrónica.

RESULTADOS

Citotoxicidad

El análisis comparativo de la acción citotóxica de los cuatro pesticidas expresada en los niveles de liberación de LDH, muestra una mayor sensibilidad de los hepatocitos al lindano (con aumentos significativos a partir de 0,3 mM de lindano), seguida del captan y de la deltametrina, en tanto que los hepatocitos muestran una mayor resistencia a la acción del paraquat que produce daño celular a partir de concentraciones de 2,5 mM. Para todos los pesticidas estudiados los efectos citotóxicos eran concentración-dependientes. El mayor efecto tóxico del lindano, captan y deltametrina respecto al paraquat se relaciona sin duda con la liposolubilidad de aquellos. Esto propicia un mejor acceso a través de la membrana citoplasmática, así como su paso al interior de orgánulos celulares: mitocondrias, peroxisomas y otros sistemas de membrana.

Gluconeogénesis

La actividad gluconeogénica fue estudiada a partir de distintos precursores: lactato, piruvato, glicerol, L-alanina y fructosa respectivamente, todos ellos a la concentración de 20 mM. En condiciones control la ruta metabólica más eficiente fue la que utiliza fructosa como precursor, con una capacidad de síntesis de 1,24 μ moles de glucosa / min, g de tejido y la menos eficaz fue la que utilizaba L-alanina (0,21 μ moles de glucosa / min, g tejido).

Los pesticidas ensayados mostraron entre sí una distinta potencia inhibitoria de la gluconeogénesis y para cada uno de ellos variaba en función de la concentración y del sustrato presente en el medio de incubación. Los hepatocitos mostraron una mayor sensibilidad al captan que a 100

μM producía inhibición de la gluconeogénesis con todos los sustratos.

Peroxidación lipídica

Paraquat, captan, deltametrina y lindano inducen peroxidación lipídica dosis-dependiente, la cual se expresa por el incremento en la formación de malonildialdehído (MDA) por los hepatocitos aislados.

Al igual que sucede con la citotoxicidad y gluconeogénesis el paraquat es el

que induce un menor grado de peroxidación lipídica (Tabla 1), sólo detectable a partir de concentraciones 1 mM, en tanto que los hepatocitos muestran una sensibilidad máxima para el lindano, de modo que concentraciones de 50 μM inducen aumentos significativos en los niveles de MDA. El lindano 300 μM llega casi a triplicar la formación de MDA lo que indica el potente efecto de este xenobiótico en la peroxidación lipídica de los fosfolípidos de membrana.

Tabla 1. Efecto del paraquat, captan, deltametrina y lindano sobre la peroxidación lipídica en hepatocitos aislados de rata. La peroxidación lipídica se expresa por los niveles de malonildialdehído (MDA). Cada valor expresa la media \pm SEM de al menos 9 experimentos.

	moles MDAx10 ⁷ /5.10 ⁶ célulasx60 minutos		
	Control	[pesticida]	
Paraquat	2,78 \pm 0,20	P0,1mM	3,18 \pm 0,23 ns
		P1 mM	4,56 \pm 0,26**
		P10 mM	6,27 \pm 0,22***
Captan	2,65 \pm 0,05	C10 μM	3,36 \pm 0,09*
		C100 μM	3,57 \pm 0,10**
		C500 μM	5,30 \pm 0,09***
Deltametrina	2,89 \pm 0,12	D10 μM	3,25 \pm 0,06 ns
		D1 mM	3,42 \pm 0,08*
		D5 mM	3,57 \pm 0,07*
Lindano	2,51 \pm 0,21	L50 μM	3,65 \pm 0,31*
		L100 μM	7,10 \pm 0,43***
		L300 μM	7,22 \pm 0,48***

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; ns no significativo

Consumo de oxígeno

El paraquat (5 y 10 mM) inducen incrementos notables en el consumo de oxígeno, que se hacen más evidentes a los tiempos de incubación y concentración más reducidos (Tabla 2). El lindano sólo produce un incremento moderado del consumo de oxígeno para las concentraciones más bajas, en tanto que lindano 300 μM así como el captan a las concentraciones ensayadas inhiben el consumo de oxígeno, probablemente debido a que la expresión de la peroxidación lipídica sobre el consumo de oxígeno queda enmascarada por un daño generalizado sobre el metabolismo hepatocelular.

GSH celular y mitocondrial

La incubación de hepatocitos en presencia de los distintos pesticidas durante una hora respectivamente produce consumo de GSH celular lo que se traduce en una reducción del mismo (Fig. 1). En relación con el lindano la inhibición aumenta con la concentración de pesticida. Sin embargo, cuando se miden separadamente los niveles totales de GSH celular y los depósitos de GSH mitocondriales se observa que estos últimos no experimentan modificaciones en presencia de lindano con ninguna de las concentraciones antes usadas, ni siquiera con tiempos de incubación de dos horas. Así, en presencia de lin-

Tabla 2. Efecto del captan, paraquat y lindano sobre el consumo de oxígeno en hepatocitos aislados de rata para distintas concentraciones de pesticida y a distintos tiempos de incubación. Los valores se expresan en % respecto del consumo de oxígeno medido en los controles (100%). Cada valor representa la media±SEM de al menos 9 muestras correspondientes al menos a tres animales distintos.

		Tiempo de incubación (minutos)				
		15'	30'	60'	90'	120'
Paraquat	50 µM		95,2±3,1 ns	89,2±2,7 *	81,3±3,8 *	
	100 µM		70,6±2,1 ***	61,4±6,8 ***	51,4±2,6 ***	
	200 µM		9,6±2,1 ***	6,2±0,5 ***	7,0±0,9 ***	
Paraquat	5 mM		162,7±5,4 ***	152,8±4,2 ***	133,6±4,9 ***	116,1±3,6
	10 mM		147,8±6,4 ***	154,4±8,2 ***	124,1±3,6 ***	80,1±4,0
Lindano	50 µM	105,1±3,2 ns	110,6±2,4 *	114,8±3,7 *	113,6±3,0 *	116,5±6,1 *
	100 µM	99,1±3,8 ns	113,7±2,3 *	123,1±1,1 ***	112,9±1,8 **	96,9±3,4 ns
	300 µM	76,3±2,4 ***	78,4±2,7 ***	72,1±1,9 ***	74,5±3,5 **	70,7±2,1 ***

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; ns no significativo.

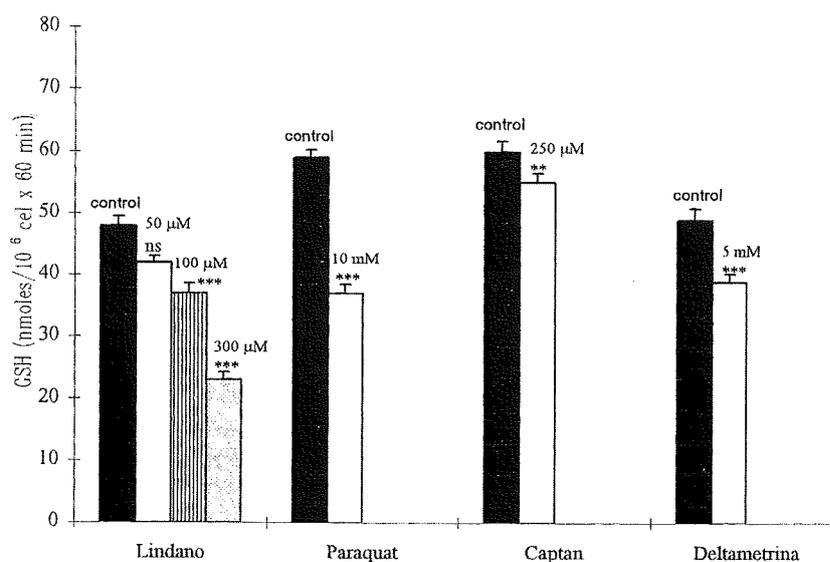


Figura 1. Niveles de glutatión (GSH) en hepatocitos aislados de rata incubados durante 60 minutos en presencia de lindano (50, 100 y 300 µM), paraquat (10mM), captan (250 µM) y deltametrina (5 mM) respectivamente. Los resultados expresan la media±ESM de al menos 10 experimentos. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; ns no significativo.

dano 300 μM y para tiempos de incubación 30, 60, 90 y 120 minutos los niveles mitocondriales de GSH en los controles (6,3 nmoles/ 10^6 células), son muy similares a los obtenidos para todas las concentraciones y tiempos de incubación ensayadas de lindano (6,1 nmoles/ 10^6 células con lindano 300 μM y 120 minutos). El contenido de GSH mitocondrial viene a representar aproximadamente el 20% del total celular.

Función mitocondrial y lisosomal

La incubación de hepatocitos en presencia de lindano 50, 100 y 300 μM durante tiempos de 15, 30, 60, 90 y 120 minutos respectivamente produjo reducciones de los niveles totales de ATP. La disminución en el contenido total de ATP se hace manifiesta a partir de los 60 minutos de incubación, con una reducción dependiente de concentración. En cambio la reducción en el ATP mitocondrial sólo se observa con lindano 300 μM y únicamente para el tiempo de incubación de 120 minutos. En estas condiciones (lindano 300 μM durante 120 minutos) el ATP mitocondrial en presencia de lindano (2,5 nmoles / 10^6 células) se reduce en un 28% respecto del control (3,5 nmoles) mientras que el ATP celular total se reduce en un 65%.

El potencial de membrana mitocondrial se reduce en presencia de lindano a partir de la concentración de 100 μM con una relación dosis-tiempo dependiente. El potencial redox se determinó midiendo la capacidad de retención de rodamina de los hepatocitos previamente cargados con este compuesto.

La función microsomal fue estudiada mediante la determinación de la actividad glucosa-6-fosfatasa en esta fracción celular. La incubación de microsomas aislados durante 45 minutos en presencia de lindano 100 μM reduce la actividad enzimática (0,18 nmoles de Pi / min, mg de prot.) en 50%. La preincubación durante 10 minutos de microsomas en presencia de vitamina E (25 μM) previene los efectos provocados por el lindano de modo que no se modifica la actividad glucosa-6-fosfatasa.

Modificaciones ultraestructurales

La incubación de hepatocitos durante 60 minutos en presencia de lindano 100 μM

produce modificaciones ultraestructurales notables entre las que cabe destacar: pérdida de microvellosidades, con aparición de evaginaciones de la membrana plasmática y aumento del citosol, en el que aparecen un alto número de vacuolas lipídicas dispersas, así como abundantes lisosomas secundarios sin localización concreta en el mismo. No se observaron alteraciones en la ultraestructura mitocondrial ni del retículo liso.

Citotoxicidad de los tratamientos *in vivo*

La administración oral de una dosis diaria (10 mg/ K) de lindano durante siete días produjo una disminución de la ingesta a partir del segundo día de administración del orden del 15% con reducción del peso corporal (8%) e incremento de la masa hepática relativa del 16%. El aislamiento de los hepatocitos al final del periodo de tratamiento mostró los efectos hepatotóxicos del lindano con un incremento de más del 100% en los niveles de ALAT y del 80% de ASAT. Asimismo la peroxidación lipídica produce incrementos del 40% del MDA, no observándose efectos sobre la gluconeogénesis ni sobre los niveles de GSH.

Por otro lado la administración oral única de 70 mg/K de paraquat no induce modificaciones de la ingesta, peso corporal y hepático. La incubación de hepatocitos a partir de ratas tratadas mostró claros efectos hepatotóxicos con incremento en la LDH (58%) y ALAT (130%). La gluconeogénesis sólo se inhibe cuando se utiliza fructosa (34% de inhibición) o L-alanina (30%), no observándose efectos a partir de precursores como el piruvato, lactato y glicerol, resultados que al igual que lo dicho para el lindano difieren notablemente respecto de lo observado *in vitro*. En cambio sí se observa peroxidación lipídica que se manifiesta tanto en el incremento de malondialdehído (33%) como el glutatión (16%).

DISCUSIÓN

A las concentraciones utilizadas en los experimentos *in vitro* para cada uno de los pesticidas, la hepatotoxicidad de los mismos, expresada por la liberación de LDH

de los hepatocitos aislados, muestra una mayor sensibilidad de los mismos al lindano seguida de paraquat y deltametrina, siendo el paraquat el que ejerce un menor efecto, probablemente debido a su escasa liposolubilidad respecto de los otros tres.

Lindano, paraquat, captan y deltametrina producen inhibición de la gluconeogénesis en grado variable entre sí y esta inhibición para cada xenobiótico es función de la concentración, tiempo de incubación con el pesticida y sustrato presente en el medio. Videla y col.¹⁸ observan que los pesticidas organoclorados producen una inhibición de la actividad glucosa-6-fosfatasa, enzima clave en la ruta gluconeogénica; ésta podría ser una de las causas de la inhibición de la gluconeogénesis inducida por estos xenobióticos.

El captan a 500 μM produce una fuerte inhibición de la gluconeogénesis (más del 80%) con todos los sustratos, lo que induce a pensar en un daño celular más general en el que podrían verse afectados múltiples sistemas enzimáticos.

En cuanto a los efectos sobre la peroxidación lipídica, todos ellos producen incrementos en los niveles de MDA. Estos aumentos son dosis-dependientes para paraquat, captan y lindano no mostrando relación con la dosis en los tratamientos con deltametrina. Los trabajos de Sandy y col.⁵ confirman la inducción de procesos de peroxidación lipídica en tratamientos con paraquat y sugiere que ésta podría ser la causa de los trastornos fisiológicos causados por el herbicida. De los resultados obtenidos con deltametrina puede deducirse que la peroxidación lipídica no parece ser la única causa, ni siquiera la principal, de las consecuencias fisiopatológicas observadas en las intoxicaciones con deltametrina.

El paraquat para todas las dosis ensayadas y el lindano (a 50 y 100 μM) producen notables incrementos en el consumo de oxígeno lo que sugiere un fuerte efecto inductor de procesos peroxidativos. Todo ello resulta coherente con los aumentos observados en los niveles de MDA, que es un índice indirecto de la peroxidación lipídica. Hardwick y col.¹⁹ observan resultados análogos en microsomas hepáticos incubados en

presencia de paraquat. La reducción del consumo de oxígeno con dosis mayores de lindano invierte la situación, de modo que se observa inhibición en el consumo de oxígeno; ello podría deberse a que los procesos peroxidativos resultan enmascarados por un daño sobreañadido a nivel mitocondrial, como quedó establecido en los estudios tanto ultraestructurales de las mitocondrias, como de su potencial redox. La fuerte inhibición del consumo de oxígeno observada en presencia de captan también parece deberse principalmente a un daño mitocondrial más que a los procesos peroxidativos. De hecho el captan tiene escasos efectos tanto en la formación de MDA como en la desaparición de GSH, sin embargo ejerce efectos inhibitorios muy potentes en el consumo de oxígeno (90%) y en la gluconeogénesis con todos los sustratos utilizados.

Los pesticidas inducen la formación de radicales libres, los cuales producen diferentes formas de oxígeno activado (superoxidos, peróxido de hidrógeno) que actúan preferentemente sobre los lípidos celulares insaturados. Los hidroperóxidos lipídicos originados pueden formar radicales libres continuando el proceso de peroxidación de otros lípidos, en especial de las membranas celulares. Esta peroxidación puede ser parcial o totalmente bloqueada por antioxidantes naturales como la vitamina E.

Como resultado de la peroxidación se produce lesión de la membrana y liberación de malondialdehído (MDA), a la vez que modifica los niveles de glutatión (GSH).

Este proceso tiene lugar cuando los endoperóxidos se encuentran en moléculas de ácidos grasos conteniendo, al menos, tres enlaces dobles interrumpidos por metilenos, lo que conlleva a la formación de malondialdehído, como producto de ruptura. Por consiguiente, la concentración de MDA en los tejidos puede considerarse como índice sensible para la evaluación de la extensión de la reacción de peroxidación, planteamiento que sostienen distintos autores²⁰.

Los resultados obtenidos tras la administración oral de lindano y paraquat con-

firman en gran parte los hallazgos con hepatocitos aislados. Sin embargo, no tenemos una explicación clara para la falta de efecto observada en relación con la gluconeogénesis.

De todo lo expuesto se puede concluir que el paraquat, lindano, captan y deltametrina, pesticidas de uso corriente en agricultura, producen un considerable daño sobre muchas de las funciones hepáticas, una buena parte de las cuales podrían estar ocasionadas por los trastornos derivados de la formación de radicales libres.

BIBLIOGRAFÍA

1. STEVENS J, FARMER J, DIPASQUALES J. The acute inhalation toxicity of technical captan and folpet. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978; 45: 320-329.
2. KUMAR S, SIKKA H, SAXENA J, ZWEIG G. Membrane damage in human erythrocytes caused by captan and captafol. *Pest Bioch Physiol* 1975; 5: 338-347.
3. GALLELI G, MANGINI S, GERBINO C. Organochlorine residues in human adipose and hepatic tissues from autopsy sources in northern Italy. *J Toxicol Environ Health* 1995; 46: 293-300.
4. GEYER HJ, STEINBERG CE, SCHEUNERT I, BRUGGEMANN R, SCHUTZ, W KETTRUP et al. A review of the relationship between acute toxicity (LC50) of gamma-hexachlorocyclohexane (gamma-HCH, Lindane) and total lipid content of different fish species. *Toxicology* 1993; 83:169-179.
5. SANDY MS, MODEUS P, ROSS D, SMITH MT. Role of redox cycling and lipid peroxidation in bipyridyl herbicide cytotoxicity. Studies with a compromised isolated hepatocyte model system. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 3095-3101.
6. BERRY MN, FRIEND DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969; 43: 506-520.
7. BERGMAYER HV, HORDER M. IFCC methods for measurement of catalytic concentrations of enzymes. *Clin Chim Acta* 1980; 105: 147-172 F.
8. BERGMAYER HV, BOWERS GN, HORDER M, MAS AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase *Clin Chim Acta* 1978; 24: 58-73.
9. BERGMAYER HV, BERNT E, SCHMIDT F, STARK H. *Methods of Enzymatics Analysis* (ed. Bergmeyer, H.V.) 1974; 2nd ed. vol 3. Academia Press, New York 1196-1201.
10. BUEGE JA, AUST SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-307.
11. HISSIN PJ, HILF R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochem* 1976; 74: 214-226.
12. LAKE B. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies of xenobiotic metabolism in *Biochemical Toxicology, a practical approach*; (K. Snell and B. Mullock ed.). IRL Press, Oxford. 1987; 412-432.
13. SCHMIDT E. Glutamate dehydrogenase. En: *Methods in Enzymatic Analysis*. Vol 2 (H.U. Bergmeyer ed.), Academic Press. 1974; 650-656.
14. STREHLER B. Adenosine 5 triphosphate and creatine phosphate. Determination with luciferase. En: *Methods in Enzymatic Analysis*. Vol 4 (H.U. Bergmeyer ed), Academic Press. 1974; 2112-2123.
15. EMAUS RK, GRUNWALD R, LEMASTERS JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biochys Acta* 1986; 850; 436-448.
16. HISSIN PJ, HILF R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74; 214-226.
17. LAEMMLI U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227; 680-685.
18. VIDELA LA, BARROS SBM, JUNQUEIRA VBC. Lindane induced liver oxidative stress. *Free Radical Biology Medicine* 1990; 9; 169-179.
19. HARDWICK SJ, ADAM A, SMITH LL, COHEN GM. Potentiation of the cell specific toxicity of paraquat by 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU). Implications for the heterogeneous distribution of glutathione (GSH) in rat lung. *Biochem Pharmacol* 1990; 39: 581-589.
20. TRIBBLE DL, AW TY, JONES DP. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology* 1987; 7: 377-387.