

# *Acta Toxicológica Argentina*

---

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina  
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 14  
N° 1  
Julio 2006

Acta Toxicológica Argentina es el órgano de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina. Tiene por objetivo básico la publicación de trabajos originales, comunicaciones breves, actualizaciones o revisiones, temas de divulgación, comentarios bibliográficos, notas técnicas y cartas al editor. Asimismo, se publicarán noticias relacionadas con los diferentes campos de la Toxicología.



Asociación Toxicológica Argentina

Asociación civil (Personería Jurídica N° 331/90)

Adherida a la IUTOX

*Acta  
Toxicológica  
Argentina*

**Asociación Toxicológica Argentina**

**Comisión Directiva**

**Presidente**

Edda C. Villaamil Lepori

**Vicepresidente**

Susana I. García

**Secretario**

Gerardo D. Castro

**Tesorera**

Sandra O. Demichelis

**Vocales**

Gabriela Fiorenza

Cristina Rubio

Mirta Ryczel

**Vocales Suplentes**

Ricardo Aristu

Liliana Bulacio

María del Carmen Villarruel

**Organo de Fiscalización**

**Titulares**

María del Carmen Magariños

Adriana Ridolfi

**Suplente**

Daniel González

**Comité Científico**

Marta A. Carballo

José A. Castro

Oswaldo H. Curci

Ricardo Duffard

Aldo S. Saracco

**Tribunal de Honor**

Carlos García

Estela Giménez

María Rosa Llorens

**Acta Toxicológica Argentina**

**Director**

Ricardo Duffard *LATOEX, FBIOyF-UNR*

**Comité de Redacción**

Ofelia C. Acosta de Pérez *Fac. Ciencias Vet.-UNNE, CONICET*

Valentina Olmos *FFyB - UBA*

Noemí R. Verrengia Guerrero *FCEyN - UBA*

**Comité Editorial 2004**

José A. Castro *CEITOX-CITEFA / CONICET - Argentina*

Antonio Colombi *Universidad de Milán - Italia*

Franz Delbeke *Universidad de Gante - Belgica*

Heraldo Donnewald *Poder Judicial de la Nación - Argentina*

Ana S. Fulginiti *Universidad de Córdoba - Argentina*

Nilda G. G. de Fernícola *CETESB - Brasil*

Veniero E. Gambaro *Universidad de Milán - Italia*

Carlos A. García *Instituto de Estudios Bioquímicos - Argentina*

Estela Gimenez *ANMAT - Argentina*

Hector Godoy *INTA / CIC - Pcia. de Bs. As. - Argentina*

Amalia Laborde *Universidad de la República - Uruguay*

Nelly Mañay *Universidad de la República - Uruguay*

Carlos Reale *Univ. Nacional del Sur - Argentina*

Felix G. Reyes *Universidad de Campinas - Brasil*

Irma Rosas Pérez *Univ. Autónoma de México - México*

Marta Salseduc *Lab. Bagó. Univ. Austral - Argentina*

Roberto Tapia Zuñiga *Chile*

Enrique Tourón *Argentina*

Norma Vallejo *Universidad de Bs. As. - Argentina*

Eduardo Zerba *CIPEIN - CITEFA / CONICET - Argentina*

## **INDICE**

*(CONTENTS)*

EDITORIAL .....	1
PREVENCIÓN EN SALUD AMBIENTAL PARA POBLACIONES EXPUESTAS A PLAGUICIDAS: ENTREVISTAS EN COMUNIDADES RURALES Y TALLER EDUCATIVO PARA AGENTES MULTIPLICADORES. <i>PREVENTION IN ENVIRONMENTAL HEALTH FOR PESTICIDE EXPOSED POPULATIONS: INTERVIEWS IN RURAL COMMUNITIES AND WORKSHOP FOR MULTIPLYING AGENTS</i>	
<i>Rovedatti, María Gabriela; Trapassi, Jorge; Vela, Lorena ; López, Alicia; Santa Cruz, Silvia y Magnarelli, Gladis</i> .....	2
ESTUDIO TOXICOLOGICO DE UN INYECTABLE APOCRIFO CONTENIENDO HIERRO COMO PRINCIPIO ACTIVO <i>TOXICOLOGICAL STUDY OF A COUNTERFEIT MEDICINAL PRODUCT CONTAINING IRON SORBITOL</i>	
<i>Bezzi, María Paula; Rodríguez, Yanina; Barlaro, Claudia; Gruñeiro, Elena; Bindstein, Edith; Chiale, Carlos</i> .....	8
EFFECTO DEL HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO SOBRE LA FIMBRIACIÓN DE BACTERIAS UROPATÓGENAS <i>EFFECT OF THE HERBICIDE 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID ON FIMBRIATION OF UROPATHOGENIC BACTERIA</i>	
<i>Balagué, Claudia.; Evangelista de Duffard, Ana María</i> .....	12
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES <i>INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS</i> <i>INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES</i> .....	17

## **EDITORIAL**

Tanto las personas como las Instituciones deben ser evaluadas por sus logros. La Asociación Toxicológica Argentina (ATA) tiene entre sus mayores y más apreciadas pertenencias a su Revista. Esta publicación de ATA es un espacio donde todos aquellos que realizan investigaciones relacionadas con la Toxicología pueden acercar sus producciones al resto de la sociedad.

En noviembre del año pasado la Asamblea de ATA renovó el cargo de Director de la Revista, el cual me fue otorgado y acepté de buen agrado. Agradezco la confianza depositada en mi persona y espero poder continuar con el excelente trabajo de mi antecesor.

Como Director de la Revista escribo esta editorial para comunicar sus nuevos lineamientos. No obstante, me pregunto: ¿qué significa decir "nuevos" para esta revista creada en 1983 con el objeto de dar respuesta a una necesidad de un Área del conocimiento de poco reconocimiento a nivel nacional, como lo era la Toxicología?

Tal vez tan solo sea adaptar los lineamientos al tremendo progreso que ha tenido la Toxicología en todas sus ramas en los últimos años.

En vista al continuo crecimiento de la ATA y de su Revista, me he propuesto como objetivos inmediatos mantener la vigencia de la publicación y su presencia en Latinoamérica; ampliar el espectro de los autores contribuyentes; incrementar la exigencia en las evaluaciones de los trabajos inéditos que se reciban y hacer docencia en redacción científica.

Otro objetivo inmediato es desarrollar un "lugar de encuentro periódico", donde los toxicólogos, encontremos los datos actuales concernientes a los efectos adversos de un agente químico, físico o biológico tanto como su mecanismo de acción.

A partir de este desafío, quiero incluir como objetivo a mediano plazo, el de favorecer la calidad de los trabajos presentados, en cuanto a la metodología científica relacionada a la evaluación de los riesgos a la salud humana y animal que la exposición a los agentes químicos, físicos o biológicos puedan acarrear estimulando la publicación de resultados que sean posibles de comparar internacionalmente.

Con la colaboración del Comité de Redacción, de los investigadores que proporcionen trabajos inéditos, de los árbitros nacionales e internacionales y, por supuesto, de nuestros lectores, podremos alcanzarlos.

Atentamente,

Dr. Ricardo Duffard  
Director de la Revista ATA

## PREVENCIÓN EN SALUD AMBIENTAL PARA POBLACIONES EXPUESTAS A PLAGUICIDAS: ENTREVISTAS EN COMUNIDADES RURALES Y TALLER EDUCATIVO PARA AGENTES MULTIPLICADORES

Rovedatti, María Gabriela<sup>b,d</sup>; Trapassi, Jorge<sup>c,d</sup>; Vela, Lorena<sup>c</sup>; López, Alicia<sup>a</sup>; Santa Cruz, Silvia<sup>a</sup> y Magnarelli, Gladis<sup>c,d</sup> (\*)  
a: Hospital Área Programa Cinco Saltos. Martín Fierro 845, (8303) Cinco Saltos.  
b: Carrera de Psicología. Facultad de Ciencias de la Educación. Irigoyen 2000, (8324) Cipolletti.  
c: Escuela de Medicina. Toschi y Arrayanes, (8324) Cipolletti.  
d: Laboratorio de Investigaciones Químicas, Bioquímicas y de Medio Ambiente (LIBIQUIMA). Facultad de Ingeniería. Buenos Aires 1400, (8300) Neuquén. Universidad Nacional del Comahue. ARGENTINA. Tel/fax: 0299-4490385 .

(\*) Autor a quien dirigir la correspondencia: E-mail: gmagnarelli@yahoo.com.ar

**Resumen: PREVENCIÓN EN SALUD AMBIENTAL PARA POBLACIONES EXPUESTAS A PLAGUICIDAS: ENTREVISTAS EN COMUNIDADES RURALES Y TALLER EDUCATIVO PARA AGENTES MULTIPLICADORES.** María Gabriela Rovedatti; Jorge Trapassi; Lorena Vela; Alicia López; Silvia Santa Cruz y Gladis Magnarelli. *Acta Toxicol. Argent. (2006) 14 (1): 2-7*. La zona frutihortícola del alto Valle de Río Negro, en Argentina, constituye una región de exposición residencial a plaguicidas en razón de la dinámica ambiental de estos compuestos y la situación geográfica de sus comunidades. Considerando que los comportamientos preventivos de la población dependen del nivel educativo, este trabajo se planificó con el objetivo de capacitar al personal de salud del hospital de Cinco Saltos, localidad situada en esta región, como agentes multiplicadores en el fortalecimiento de dichas conductas. Previo a la capacitación, se realizaron entrevistas domiciliarias en un asentamiento rural en el que, si bien el 92% de las mujeres estaba alfabetizada, el 81% desconocía el período anual de fumigaciones y sólo el 12% conocía las vías de incorporación. Se registraron conductas de riesgo para el uso doméstico de plaguicidas y para la exposición residencial. Aunque el 95% identificaba a los niños como el grupo social más vulnerable y el 58% estimaba que la exposición materna afecta al feto, solamente el 56% tomaba precauciones durante el período de fumigación y el 92% utilizaba plaguicidas en el hogar.

La encuesta diagnóstica aplicada al personal de salud reveló un importante grado de desconocimiento sobre la exposición indirecta. En base a la información recabada en ambas actividades se dictó un Taller sobre toxicología de plaguicidas cuya acreditación incluyó el diseño de un plan de trabajo para la transferencia hacia las comunidades de riesgo. También se llevaron a cabo acciones para la difusión de esta problemática en medios locales.

**Abstract: PREVENTION IN ENVIRONMENTAL HEALTH FOR PESTICIDE EXPOSED POPULATIONS: INTERVIEWS IN RURAL COMMUNITIES AND WORKSHOP FOR MULTIPLYING AGENTS.** María Gabriela Rovedatti; Jorge Trapassi; Lorena Vela; Alicia López; Silvia Santa Cruz y Gladis Magnarelli. *Acta Toxicol. Argent. (2006) 14 (1): 2-7*. In Argentina, the agricultural area of High Valley of Río Negro and Neuquén, is a region of pesticide residential exposition in view of the environmental dynamics of these compounds and the geographic situation of their communities. Considering that people prevention behavior depends on their educational level, this work was designed with the purpose of preparing health workers of Cinco Saltos Hospital, location settled in this area, as multiplying agents to strengthen those conducts. Previously to this preparation, interviews were performed in a rural community where, though 92% of the women were alphabetized, 81% ignored the time covered by the annual fumigation period and only the 12% knew about pesticides routes of absorption. Risk behaviors were registered for domestic use of pesticides and for residential exposure. Although children were identified (95%) as the most vulnerable social group and 58% estimated that maternal exposition affects the fetus, only 56% took cares during fumigation period and 92% used pesticides at home.

A diagnostic poll performed with the health workers revealed an important lack of knowledge about indirect exposition. According to the information obtained in both activities a Workshop about pesticides toxicology was organized, whose approval included the design of a work plan to be carried out with the communities under risk. Additionally, actions were performed to diffuse this theme in local media.

**Palabras clave:** plaguicidas, exposición residencial, prevención, riesgo.

**Key words:** pesticides, residential exposure, prevention, risk.

### INTRODUCCIÓN

Clásicamente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define prevención primaria como aquellas acciones destinadas a disminuir la incidencia de enfermedades en una población. Estas medidas tienen por objeto promover un estado óptimo de salud, proteger al individuo de los agentes que puedan agredirlo y establecer barreras contra los agentes ambientales. Es así que la toxicología se ha ampliado con el concepto de salud ambiental, siendo la exposición crónica a productos químicos responsable de muchas enfermedades y, en particular, del 60% de los síntomas neurológicos infantiles, Arroyo (1). En América Latina este panorama se ve agravado por

la pobreza y la inclusión temprana de los niños en el mercado laboral, Carrizales et. al. (2).

Se ha establecido que el riesgo de contraer enfermedades relacionadas con el ambiente es mayor en el período perinatal y está relacionado con la exposición materna a tóxicos, los cuidados y la nutrición en el período prenatal y las condiciones del hogar en los días cercanos al nacimiento, Briggs (3). Existe, además, evidencia creciente que indica que la exposición perinatal a tóxicos produce cambios irreversibles, los cuales determinan las condiciones de salud en el adulto.

Las enfermedades ambientales son de tratamiento muy costoso y, a menudo, sus efectos sobre la salud son irreversibles pero prevenibles en su

mayoría, EPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos) (4). Dentro de la prevención primaria, las acciones directas de educación tanto de los adultos como de los niños respecto al manejo de las sustancias tóxicas pueden contribuir a reducir la exposición, Gordon et. al. (5). Dicha agencia estimula actividades que aumenten el conocimiento de la población sobre los riesgos de la salud asociados al medio ambiente y en el 2006 el enfoque se centra en los niños y los plaguicidas, EPA (6).

Se estima que en América latina unas seis millones de personas sufren exposición no laboral a estos tóxicos, Yáñez et. al (7). Argentina se incluye en esta problemática y a diferencia de las estrictas medidas de clausura y tiempos de re-entrada a las zonas fumigadas establecidos en los países desarrollados, aquí se permite la residencia en forma permanente en dichas áreas. La región de mayor producción de frutas de pepita y de carozo de la Argentina es el Alto Valle de Río Negro y Neuquén donde la legislación sobre el uso de plaguicidas y agroquímicos de la Provincia de Río Negro (8) prevé, además de un régimen de contralor efectivo de su uso para asegurar la salud humana y el ambiente, una acción paralela de educación y concientización de la comunidad.

La ciudad de Cinco Saltos, de aproximadamente 20.000 habitantes, está ubicada en la Provincia de Río Negro, dentro de esta región productora. La práctica de la actividad frutícola bajo riego se desarrolló en la zona desde la segunda década del siglo pasado en forma creciente, lo que trajo aparejado un explosivo crecimiento poblacional. La expansión de la planta urbana de Cinco Saltos se vio limitada por una antigua y elevada terraza fluvial, por lo que la mayor presión de avance urbano se orientó hacia las chacras destinadas al uso frutícola.

Esta dinámica del medio urbano-rural generó fenómenos tales como regresión de cultivos por loteos, nuevas construcciones en áreas no adecuadas y conflictos de usos por pequeñas chacras intercaladas en el espacio urbano, Massolo (9). Los plaguicidas más utilizados son los organofosforados y carbamatos cuyos residuos aparecen en aguas superficiales y subterráneas con una vida media corta de horas o días, Loewy et. al (10,11), sin embargo, la frecuencia de aplicación durante el período octubre-marzo es quincenal. La polución del aire es fluctuante, con picos de intensidad en primavera-verano, la cual es dispersada rápidamente por vientos de mediana y alta intensidad. En cambio, la presencia de plaguicidas en suelos es más persistente y tiende a mantenerse en el lugar de aplicación, Kirs (12). Esta dinámica ambiental, sumada a la ubicación geográfica de Cinco Saltos y localidades aledañas, determina que el riesgo de exposición a estos compuestos no sólo alcance a individuos laboralmente expuestos sino a la población en general. De hecho, hemos reportado el impacto de la exposición resi-

dencial a plaguicidas sobre biomarcadores de exposición y efecto en placenta, sangre de embarazadas y parámetros antropométricos de neonatos, Magnarelli et. al (13), Souza et. al (14), en un muestreo llevado a cabo con el hospital de dicha localidad. Se evidencia entonces, la necesidad de disminuir el riesgo para la salud que genera el uso intensivo de estos agentes.

En el campo de la salud, los comportamientos preventivos se relacionan en forma directa con el nivel educativo de la población por lo que la modalidad de educación no formal encuentra un importante espacio para su desarrollo. Entendemos que la Universidad debe cumplir un papel protagónico en esta tarea ya que es el ámbito donde se generan los conocimientos que sustentan estas acciones.

En concordancia con lo anteriormente expuesto, el propósito de este trabajo fue contribuir a mejorar la protección de la población del riesgo para la salud asociado al uso de plaguicidas y aumentar su conocimiento e información mediante la capacitación de agentes de salud, considerando a éstos últimos como multiplicadores en la difusión de acciones de prevención.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

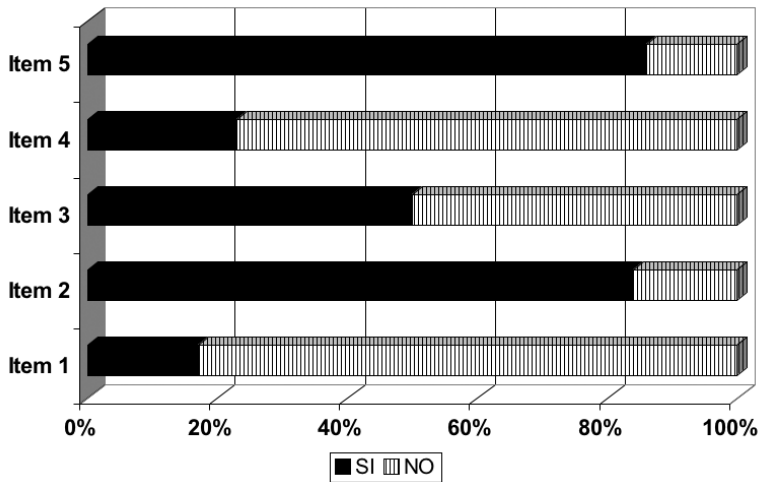
Los destinatarios directos de esta capacitación fueron los agentes sanitarios, las obstetras y los enfermeros del Hospital de Cinco Saltos, dado el nexo naturalmente establecido entre ellos y la población destinataria final. La población destinataria final la constituyó las mujeres en edad fértil y las embarazadas que asistían al Hospital de Cinco Saltos.

### **Encuesta diagnóstica para los destinatarios directos**

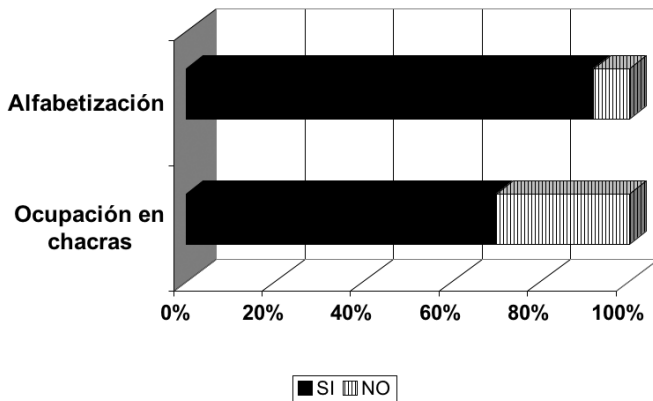
Con el objetivo de obtener información sobre los conocimientos previos del personal de salud del Hospital se realizó una encuesta diagnóstica acerca de la toxicología de los plaguicidas y de la percepción del rol del agente de salud en la prevención de la exposición a estos tóxicos.

Relevamiento domiciliario de la población destinataria final.

El objetivo de esta actividad fue registrar aspectos vinculados con el nivel de conocimiento sobre la toxicidad de plaguicidas, vías de entrada, grupos etéreos más vulnerables, hábitos y conductas de riesgo. Se llevó a cabo en un área rural ubicada en la zona de influencia del Hospital de Cinco Saltos: el asentamiento de San Isidro que posee 143 viviendas, está rodeado de chacras y en época de fumigación las consultas más frecuentes de esta población se refieren a erupciones y problemas respiratorios. En base a un diseño aleatorio se entrevistó a las mujeres de 28 viviendas y se realizó una observación directa por parte del encuestador sobre el lugar de almacenamiento de plaguicidas en las mismas.



**Figura 1:** Resultados de la encuesta diagnóstica realizada a los alumnos del Taller Educativo expresados en porcentaje. Item 1: Conoce la adecuada disposición de los envases, 2: Conoce la dinámica de los plaguicidas en el medio ambiente, 3: Conoce las vías de entrada, 4: Conoce las propiedades de los plaguicidas. 5: Tiene conciencia de su rol en la prevención.



**Figura 2:** Resultados de la encuesta domiciliaria, expresados en porcentaje, sobre la ocupación de los hombres de la casa y el nivel de alfabetización de las mujeres entrevistadas en San Isidro.

NIVEL EDUCATIVO	PRIMARIO INCOMPLETO	PRIMARIO COMPLETO	SECUNDARIO COMPLETO	TERCIARIO
%	38	46	8	8

**Tabla 1:** Nivel educativo, expresado en porcentaje, de las mujeres entrevistadas en San Isidro.

**Taller Educativo**

Se llevó a cabo un Taller Educativo de 16 horas presenciales con el objetivo de capacitar a los destinatarios directos. Sus contenidos incluyeron: propiedades de los plaguicidas; dinámica en el medio ambiente; intoxicación aguda; primeros auxilios; exposición crónica; exposición laboral y residencial; efectos de la exposición sobre emba-

razadas y neonatos de la zona y medidas de prevención primaria y secundaria. Como estrategias educativas se utilizaron dramatizaciones, grupos de discusión utilizando material de divulgación sobre el tema preparado por nuestro grupo de trabajo, Abad et al. (15), demostraciones didácticas, método de casos y clases expositivas. Los alumnos acreditaron el Taller con un 80% de asistencia y con la presentación de una propuesta grupal de trabajo sobre prevención dirigida a los destinatarios finales. Por último, el desarrollo del Taller fue evaluado por los alumnos respondiendo una encuesta anónima.

**Difusión en los medios**

Se entregaron afiches, que fueron diseñados en base a las conductas de riesgo detectadas, con el objetivo de ser exhibidos en las salas del Hospital, centros periféricos y escuelas. También se distribuyeron folletos a los participantes del Taller para ser repartidos a los destinatarios finales.

La difusión se completó con la asistencia de los autores a programas radiales y de televisión y la publicación de artículos en diarios y revistas de circulación local.

**Análisis de datos**

Los datos fueron analizados considerando la distribución porcentual para cada ítem analizado.

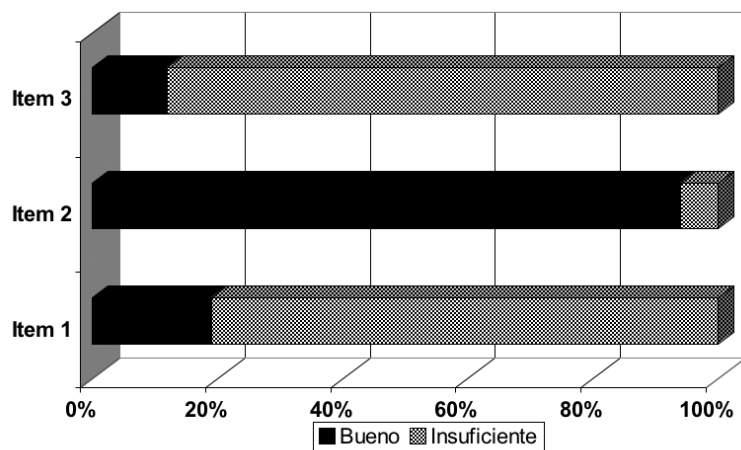
**RESULTADOS**

Los conocimientos previos del personal de salud acerca de las propiedades y toxicología de plaguicidas evaluados con la encuesta diagnóstica se observan en la *Figura 1*. Los aspectos en los que presentaron mayor desconocimiento fueron: propiedades de los plaguicidas (77%), vías de entrada al organismo (55%) y disposición adecuada de envases (85%). Se verificó un alto grado de concientización sobre su propio rol en la prevención de la salud respecto al uso de estos agentes (86%).

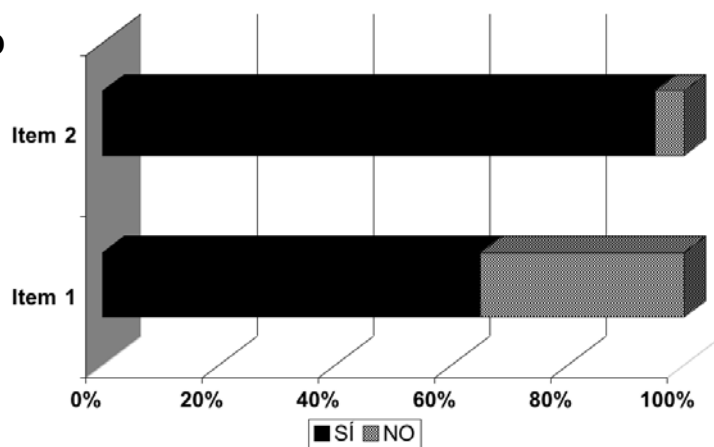
El Taller fue evaluado por los alumnos como una actividad útil y motivante. La producción de propuestas de prevención presentada por ellos resul-



a



b



**Figura 3:** Resultados de la encuesta domiciliaria realizada a las mujeres de San Isidro, expresados en porcentaje. **a:** Ítem 1: Conocimiento acerca de la duración del período de fumigación; ítem 2: Conocimiento acerca de la exposición de la población general; ítem 3: Conocimiento acerca de las vías de entrada de los plaguicidas al organismo. **b:** Susceptibilidad al efecto de los plaguicidas. Ítem 1: Conoce que la exposición materna afecta al feto; ítem 2: Identificación de los niños como el grupo etéreo más vulnerable.

CONDUCTAS DE RIESGO	SI %	NO %
Uso de plaguicidas en el hogar	92	8
Ubicación de los plaguicidas en lugar inseguro *	54	46
Cooperación de los niños en la manipulación de plaguicidas	23	77
<b>DESTINO DE LOS ENVASES</b>		
Lavado y utilización con el mismo fin	11	89
Reutilización con otros fines	4	96
Incineración	46	54
Almacenamiento sin ningún tratamiento	19	81
Eliminación con la basura	19	81

**Tabla 2:** Conductas de riesgo relacionadas con el uso de plaguicidas en el hogar. Los resultados se expresan en porcentaje.

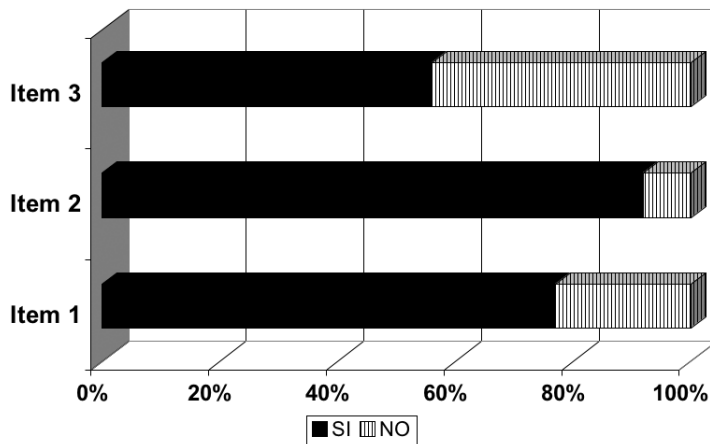
\*: Observación directa por parte del encuestador.

tó acorde a la problemática regional y de alta factibilidad (datos no mostrados).

Al analizar las características de la población entrevistada durante el relevamiento domiciliario, en cuanto al nivel educativo se observó que un 92% de las mujeres estaban alfabetizadas (*Figura 2*) y que el 46% completó la escuela primaria, mientras que un mínimo presentó un nivel de escolarización secundario o terciario (*Tabla 1*). En lo referente a la ocupación del jefe de familia, una alta proporción de los hombres (69%) se ocupaba de tareas relativas a la fruticultura en las chacras aledañas (*Figura 2*).

Como se indica en la *Figura 3a*, aunque la mayoría (96%) de las entrevistadas tenía conocimiento acerca de quiénes están expuestos a los plaguicidas en la zona, el 88% poseía conocimiento insuficiente acerca de las vías de entrada de estos tóxicos y, sorprendentemente, el 81% desconocía la duración del período de fumigación en la zona. El 95% identificaba a los niños como el grupo etéreo más vulnerable y el 58% afirmaba que la exposición materna afecta al feto (*Figura 3b*). Las conductas de riesgo detectadas en relación al uso doméstico de plaguicidas se indican en *Tabla 2*. Se evidencia que el 92% de la población utilizaba plaguicidas en el hogar y que la ubicación de los mismos no ofrecía seguridad en el 54% de los casos, mientras que en la mayoría de los hogares no se involucraba a los niños en la manipulación de los plaguicidas. La conducta de riesgo más frecuente (46%) respecto al destino de los elementos usados en la preparación de los plaguicidas fue la incineración.

Respecto a las conductas de riesgo relacionadas con la fumigación en las chacras aledañas (*Figura 4*) sólo el 56% tomaba precauciones durante el período de fumigación tales como cerrar las ventanas y no dejar jugar a los niños afuera o retirar la ropa del cordel. El 92% consumía frutas de esas plantaciones sin respetar los tiempos de carencia y el



**Figura 4:** Resultados de la encuesta domiciliar realizada a las mujeres de San Isidro, expresados en porcentaje: Conductas de riesgo relacionadas con el uso de plaguicidas en chacras aledañas. Item 1: Se bañan en canales de riego, 2: Ingieren frutas de los árboles, 3: Toman precauciones cuando fumigan.

77% se bañaba en los canales de riego en época coincidente con el periodo de fumigación.

### DISCUSIÓN

Considerando los resultados obtenidos, tanto la encuesta diagnóstica como el trabajo de campo mostraron la necesidad de realizar acciones concretas de prevención referidas al uso de plaguicidas.

Los agentes de salud estaban concientizados de su rol en prevención y también poseían un muy alto nivel de motivación respecto al tema como lo demostró la evaluación del Taller y la producción de propuestas. Sus conocimientos previos respecto a los temas de exposición aguda y exposición laboral crónica eran buenos. No obstante, desconocían las propiedades de los plaguicidas y aspectos generales relacionados con la exposición residencial tales como vías de entrada y conductas de riesgo.

Las encuestas domiciliarias demostraron que, si bien la mayoría de la población de mujeres estaba alfabetizada, gran parte de ella ignoraba la fecha del periodo anual de fumigaciones en las chacras aledañas y sólo una pequeña proporción conocía las vías de incorporación de estos tóxicos. Se observaron conductas de riesgo referidas a la utilización de plaguicidas en el ámbito doméstico y rural, varias de ellas relacionadas con el riesgo infantil dentro del hogar (almacenamiento inseguro de plaguicidas) y fuera de él (consumir frutas de chacras aledañas, no tomar precauciones cuando fumigan en las cercanías y bañarse en canales de riego). Este relevamiento corroboró la presunción previa acerca de la necesidad de la educación preventiva de la población en relación a esta problemática.

Acorde a esta necesidad, la realización del Taller Educativo ayudó a los destinatarios directos a

reconocer, comprender y dirigir esfuerzos hacia el diseño e implementación de herramientas útiles de prevención. Esta actividad convocó no solamente a diversos profesionales de la salud, sino también a docentes, con lo que se amplió el espectro de destinatarios y ámbitos donde pueden desarrollarse las actividades de prevención en la zona. Resultó, entonces, una modalidad adecuada para cumplir con el objetivo de capacitación ya que la dinámica de grupo facilitó la comunicación y la apropiación del objeto del conocimiento, como lo demostró su evaluación por parte de los alumnos. Posibilitó, además, las relaciones inter-grupales e inter-institucionales. Los destinatarios directos del Taller presentaron propuestas dirigidas a distintos

grupos sociales, las cuales son altamente factibles de ser llevadas a cabo, por lo que se estima que estos profesionales resultarán excelentes multiplicadores.

En conclusión, dado que la prevención del impacto negativo del uso de plaguicidas no ha sido identificada aún como una problemática de la Salud Pública local, las acciones educativas presentadas en este trabajo representan estrategias relevantes para contribuir al protagonismo de los trabajadores de este sector en esta tarea.

**Agradecimientos:** A la Comisión Directiva de la Asociación Toxicológica Argentina (ATA) por su aval al inicio del Proyecto. A la Comisión de Capacitación y Docencia del Hospital de Cinco Saltos por la colaboración en la organización del Taller y a la Cooperativa Obrera de Cinco Saltos por ceder el espacio para su realización. A la Agente Sanitaria de San Isidro, Sra. Elena Valdez, por su colaboración en las encuestas domiciliarias. A la Diseñadora Gráfica Marina Magrini por la elaboración de los afiches y folletos.

Subsidio: Secretaría de Extensión de la Universidad Nacional del Comahue.

### BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Arroyo H. A. (2004). Encefalopatías tóxicas. Rev.Neurol. 38 (11), 1083-1089.
2. Carrizales L., Batres L., Ortiz M., Mejía J., Yañez L., García E., Reyes H. y Díaz Barriga F. (1999). Efectos en salud asociados con la exposición a residuos peligrosos. Scientiae Naturae 3, 5-28.
3. Briggs D. (2003). Indicators to improve children's environmental health. World Health Organization, Ginebra.
4. Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA) (2005). Salud Ambiental Infantil. Resumen de Actividades de EPA, Octubre, 100-F-05-045.

5. Gordon B., Mackay R. y Rehfuess E. (2004). Inheriting the world. The atlas of children health and the environment. World Health Organization, Ed., Ginebra.
6. Pediatric Environmental Health Specialty Unit (PEHSU) [en línea]. Actualizado al 13 de julio de 2005. Occupational and Environmental Medicine Program University of Washington Harborview Medical Center. <<http://www.depts.washington.edu/phsu/index.html>>. [Consulta: 12 de diciembre de 2005].
7. Yáñez L., Ortiz D., Calderón J., Batres L., Carrizales L., Mejía J., Martínez L., García-Nieto E. y Díaz Barriga F. (2002). Overview of human health and chemical mixtures: problems facing developing countries. *Environ. Health Perspect.* 110, 901-909.
8. Ley 2175 y decreto reglamentario 729/94. Consejo Provincial de Ecología y Medio Ambiente. Ministerio de Economía. Provincia de Río Negro.
9. Massolo A. (1998). Municipio y desarrollo local en la región del Comahue. Editorial Educo, Neuquén.
10. Loewy R.M., Kirs V., Caravajal G., Venturino A. y Pechen de D'Angelo A.M. (1999). Groundwater contamination by azinphos-methyl in the Northern Patagonic Region (Argentina). *Science Total Environ.* 225, 211-218.
11. Loewy R.M., Carvajal G., Novelli M. y Pechén de D'Angelo A.M. (2003). Effect of Pesticide use in Fruit Production Orchards on Shallow Ground Water. *J. Environ. Sci. Health, B-Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, Marcel Dekker Inc. B38 (3), 317-325.
12. Kirs V.E. (2000). Dinámica y degradación de plaguicidas organofosforados en suelos del Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Tesis de Maestría, Facultad de Ingeniería, Univ. Nac. del Comahue.
13. Magnarelli G., Souza M.S., Rovedatti M.G., Sánchez S., Santa Cruz S., Rodríguez A., Morales N., Ricciuti E., Zuin E. y Pechen de D'Angelo A.M. (2003). Estudio preliminar: efecto de plaguicidas organofosforados en embarazadas de la región frutícola de Río Negro. *Acta Toxicológica Argentina* 11 (2), 74.
14. Souza M.S., Magnarelli G.G., Rovedatti M.G., Santa Cruz S., Pechén de D'Angelo A.M. (2005). Prenatal exposure to pesticides: analysis of human placental acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and catalase as biomarkers of effect. *Biomarkers* 10, 376-389.
15. Abad A., Magnarelli G. y Rodríguez Ponte M.R. (1995). Pesticidas: ¿Remedios para curar o venenos para matar? Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura - Oficina Regional de Educación para América Latina y el Caribe (UNESCO - OREALC).

## ESTUDIO TOXICOLOGICO DE UN INYECTABLE APOCRIFO CONTENIENDO HIERRO COMO PRINCIPIO ACTIVO

Bezzi, María Paula; Rodríguez, Yanina; Barlaro, Claudia; Gruñeiro, Elena; Bindstein, Edith; Chiale, Carlos. Institución donde se realizó el trabajo: Departamento de Farmacología, Instituto Nacional de Medicamentos (INAME), Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Caseros 2161, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Código Postal: 1264 Teléfono: 4340-0800 Int. 2664. Fax: 4340-0853 Correspondencia: Elena Gruñeiro: gruneiro@anmat.gov.ar

**Resumen: ESTUDIO TOXICOLOGICO DE UN INYECTABLE APOCRIFO CONTENIENDO HIERRO COMO PRINCIPIO ACTIVO.** María Paula Bezzi; Yanina Rodríguez; Claudia Barlaro; Elena Gruñeiro; Edith Bindstein; Carlos Chiale. *Acta Toxicol. Argent. (2006) 14 (1): 8-10.* Una mujer embarazada murió luego de la administración parenteral de un preparado de hierro (sorbitol), producto que fue identificado por la Autoridad Sanitaria Argentina como un medicamento apócrifo. Su análisis químico determinó que el contenido de hierro era 3.5 veces mayor al rotulado. Los estudios toxicológicos demostraron que su administración representa un riesgo sanitario y podría ser el causante de la muerte.

**Abstract: TOXICOLOGICAL STUDY OF A COUNTERFEIT MEDICINAL PRODUCT CONTAINING IRON SORBITOL.** María Paula Bezzi; Yanina Rodríguez; Claudia Barlaro; Elena Gruñeiro; Edith Bindstein; Carlos Chiale. *Acta Toxicol. Argent. (2006) 14 (1): 8-10.* After the injection of an iron sorbitol preparation a pregnant woman died. Its chemical analysis determined a huge amount of iron (3.5-fold higher than the labeled). Results obtained by toxicological studies show that such medicinal product represents a sanitary risk and probably it could be presumed as the cause of death..

**Palabras clave:** Toxicidad hierro sorbitol, intoxicación por hierro parenteral.  
**Key Words:** Iron sorbitol toxicity, Iron parenteral intoxication.

### INTRODUCCIÓN

Las preparaciones con hierro (Fe) son muy eficaces en el tratamiento de la anemia ferropénica (deficiencia de Fe). La administración por vía oral es la vía de elección para esta terapéutica ya que, si la dosis administrada parenteralmente satura la capacidad de combinación plasmática puede quedar Fe libre y aparecer reacciones sistémicas severas con riesgo de muerte. Estas incluyen anafilaxia, colapso circulatorio con shock y paro cardíaco. De modo que se debe recurrir a la vía parenteral solamente cuando la oral no es posible y tiene que haber indicaciones específicas para su administración (1, 2 y 4).

Debido al fallecimiento de una paciente embarazada en el Hospital A. P. Viedma de Río Negro posterior a la administración intramuscular de un producto inyectable que contenía Fe (solución estéril de un complejo de hierro III, sorbitol y ácido cítrico, estabilizado con dextrina y sorbitol), se remitió una muestra del mismo al Instituto Nacional de Medicamentos (INAME) para su estudio.

El Programa de Pesquisa de Medicamentos Ilegítimos del INAME determinó que se trataba de un medicamento apócrifo.

El Departamento de Química y Física del INAME determinó que el producto apócrifo contenía 343 % del valor de hierro declarado en el rótulo y que el producto original, del mismo número de lote, contenía la cantidad declarada.

El objetivo de este trabajo fue establecer la relación causa efecto entre la concentración de Fe y el efecto tóxico de un producto apócrifo.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1-Ensayo de toxicidad

("undue toxicity" de la monografía de "iron sorbitol injection" de la Farmacopea Británica)

### Animales y tratamientos

Para la realización del ensayo se utilizaron ratones de la cepa CF1, provistos por el bioterio del INAME, de ambos sexos, con pesos comprendidos entre 17 y 22 gr. Los animales fueron mantenidos con dieta balanceada y agua ad libitum. Durante el ensayo se mantuvieron en un ambiente de temperatura y humedad controlada, con periodo de luz de 12 horas y aislados de ruido. Se asignaron aleatoriamente a los grupos controles y tratados. El cuidado y tratamiento de los animales se realizó de acuerdo al protocolo de la Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA).

### Procedimiento analítico

Se preparó, una solución con 20 µl del producto y 0.2 ml de solución fisiológica (SF) por ratón. Se inyectaron 0.2 ml de la solución anterior por vía intravenosa (vena de la cola) a un total de diez ratones y se procedió a controlar la posible letalidad producida por esta concentración del producto. De acuerdo a la técnica utilizada (3), no deben morir más de tres ratones (30%) dentro de los cinco días posteriores a la administración. Si más de tres ratones mueren, debe repetirse el ensayo con otro grupo de 20 ratones. Para cumplir con el ensayo (3) no más de 10 de los 30 ratones totales utilizados en los dos ensayos combinados, pueden morir dentro de los cinco días posteriores a la administración del producto ensayado.

### Esquema experimental

Se realizó el ensayo antes descrito con las siguientes muestras:

- con el producto apócrifo
- con el producto original
- con el producto original en una concentración 3.5 veces mayor

- con solución fisiológica (SF)

Además, se realizó el siguiente ensayo. Se administró a diez ratones el producto apócrifo, luego de dos horas se le administró el antídoto específico para el Fe (Deferoxamina) y se repitió la administración del mismo tres veces más cada doce horas.

Dosis: 100 mg/kg de ratón por vía intraperitoneal.

## 2- Observación animal

Con el objeto de detectar signos de toxicidad durante el transcurso del ensayo se observaron en su caja hogar a los ratones sometidos a los distintos tratamientos.

## 3-Necropsia (observación macroscópica)

Se realizó necropsia de los animales muertos que recibieron el producto apócrifo y de los animales controles (tratados con SF), previa dislocación cervical bajo anestesia con éter. Se extrajeron y compararon macroscópicamente los siguientes órganos: hígado, riñón e intestino delgado; por estar afectados en una intoxicación por Fe.

## RESULTADOS

Se observó una notoria diferencia de mortalidad entre los animales tratados con el producto apócrifo, el original y SF (100%, 0% y 0% respectivamente). Los 10 ratones inicialmente tratados con el producto apócrifo murieron el día dos del ensayo y mostraron signos severos de toxicidad pocos minutos después de la administración del producto. En la repetición del ensayo con un grupo de 20 ratones más, dos murieron el día uno y los dieciocho restantes el día dos del ensayo.

La administración del producto original en una concentración 3.5 veces mayor que la recomendada provocó una mortalidad del 90 %. En el ensayo con diez ratones, nueve murieron el día

uno y uno el día tres del ensayo. En la repetición con veinte ratones más, dieciséis murieron el día uno del ensayo, uno el día cuatro y tres ratones sobrevivieron (Tabla 1).

PRODUCTO ENSAYADO	MORTALIDAD %
Producto apócrifo	100
Producto original	0
Producto original en concentración 3.5 veces mayor	90
Solución Fisiológica	0

Tabla 1. Mortalidad producida por preparaciones con hierro.

En el caso de intoxicación sistémica en humanos se debe administrar 15 mg/kg/hora de Deferoxamina por infusión intravenosa hasta normalizar la ferremia. Ante la imposibilidad de realizar un tratamiento similar en los ratones en nuestro laboratorio se decidió tratar a los mismos con el esquema propuesto en la parte experimental. Esto se realizó con el objetivo de observar reversión de la toxicidad por el uso del antídoto específico para el Fe. No obstante, a pesar de no ser el tratamiento de desintoxicación el recomendado, la disminución de la mortalidad a un 50 % demuestra que la intoxicación observada se debe al alto contenido de Fe. Los ratones tratados con el producto apócrifo mostraron inmediatamente signos de toxicidad con respecto a los controles. Presentaron: somnolencia, piloerección, menor número de movimientos, dificultades respiratorias, alteraciones neurológicas (parálisis del tren posterior), alteraciones del ritmo cardíaco y heces negras. Los ratones tratados con el producto original o con SF no presentaron estos signos. No hubo diferencias entre sexos.

La necropsia reveló un aumento de tamaño y decoloración del hígado y de los riñones, así como

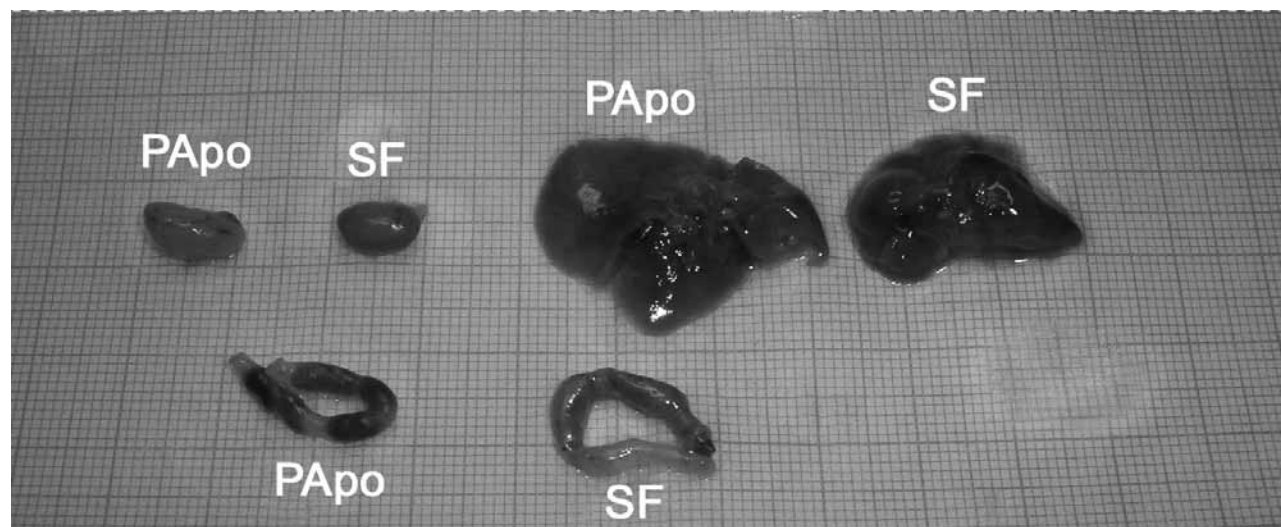


Foto 1. Necropsia (observación macroscópica) PApo: producto apócrifo (riñón, hígado e intestino delgado). SF: solución fisiológica (riñón, hígado e intestino delgado).

depósitos oscuros en intestino delgado en los animales tratados con el producto apócrifo (*Foto 1*).

## **DISCUSIÓN**

Las especialidades medicinales deben cumplir con los requisitos establecidos en la Farmacopea Argentina o Farmacopeas internacionalmente reconocidas. La Farmacopea Británica requiere que un inyectable que contiene Fe (sorbitol) cumpla con el requerimiento del ensayo de Toxicidad descrito en la monografía correspondiente (3). El producto apócrifo no satisface este requerimiento. Por tratarse de un medicamento apócrifo se desconoce el método y las condiciones de elaboración, las materias primas utilizadas y controles realizados; por lo tanto, no puede descartarse a priori que la toxicidad sea producida por una sustancia distinta al Fe. La mortalidad registrada del 100 % en los animales tratados con el medicamento apócrifo, la observación en los mismos de signos compatibles con intoxicación por Fe y la observación macroscópica de órganos como hígado, riñón e intestino delgado con características también compatibles con intoxicación por Fe demostraron que el medicamento apócrifo es altamente tóxico y que esta toxicidad podría deberse al elevado contenido de Fe (1, 2, 4 y 5).

La administración del medicamento original en una concentración 3.5 veces mayor produjo un

porcentaje de mortalidad similar (90%) al producido por el medicamento apócrifo y la administración del antídoto a los animales tratados con el medicamento apócrifo redujo considerablemente el porcentaje de mortalidad. Estos hechos demuestran que los efectos observados están relacionados con el contenido de Fe.

Se puede concluir que la administración de un inyectable que contiene Fe en una concentración 3.5 veces superior a la habitual representa un riesgo sanitario elevado pudiendo comprometer la vida humana.

## **BIBLIOGRAFÍA CITADA**

1. Hillman, R. (1996). Fármacos hematopoyéticos: factores del crecimiento, minerales y vitaminas. Las bases farmacológicas de la terapéutica, Goodman & Gilman. Hardman J., Limbird, L. Mc Graw-Hill Interamericana, 9ª edición, México D.F., 1391 pp.
2. Physicians Desk Reference, 58ª edición (2004). Thomson PDR, Montvale, NJ, p 3321.
3. Iron sorbitol injection. Farmacopea Británica (2002), p 2254.
4. Manuel Litter (1986). Drogas antianémicas o hematinicas. Hierro y antagonistas. Vitamina B12 y ácido fólico. Farmacología Experimental y Clínica, El Ateneo, 7ª edición, Buenos Aires, 1235 pp."
5. Therapeutics Index, Sección 3 (1984). Clinical Toxicology of Commercial Products. Gosselin R., Smith R., Hodge H. Tracy T., Williams & Wilkins, 5ª edición, Baltimore, p 179.

# Calidad sin fronteras

Laboratorios Bagó,  
empresa argentina,  
reafirma su permanente  
compromiso con la salud  
y la innovación de  
sus productos.

Esta filosofía sustentada  
en más de 70 años de  
trayectoria permite que  
nuestros productos estén  
presentes en 40 países  
de todo el mundo.



Argentina  
15:30

Rusia  
21:30



**La Calidad Terapéutica se dice de muchas maneras,  
pero tiene el mismo nombre en todo el mundo.**

**Bagó**

ÉTICA AL SERVICIO DE LA SALUD

## EFFECTO DEL HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO SOBRE LA FIMBRIACIÓN DE BACTERIAS UROPATÓGENAS

Balagué, Claudia.; Evangelista de Duffard, Ana María  
Laboratorio de Toxicología Experimental. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Suipacha 531. (2000) Rosario. Argentina. TE/FAX: 0341 4804598.  
Correspondencia: Claudia Balagué. E-mail: cbalague14@yahoo.com.ar

**Resumen: EFECTO DEL HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO SOBRE LA FIMBRIACIÓN DE BACTERIAS UROPATÓGENAS.** Claudia Balagué y Ana María Evangelista de Duffard. *Acta Toxicol. Argent. (2006) 14 (1): 12-17.* Existen algunos datos epidemiológicos que demuestran que, en poblaciones rurales, la frecuencia de lesiones inflamatorias de origen infeccioso en el riñón es mayor en individuos expuestos a pesticidas. Estudios previos han demostrado que el herbicida 2,4-D altera las propiedades de adherencia bacteriana a riñón, mediada por fimbrias de *Escherichia coli* uropatógena, si bien aún no se ha estudiado el mecanismo que podría estar involucrado. El 2,4-D demostró capacidad de generar uniones covalentes a proteínas de superficie gram negativos. Debido a este hallazgo, se hipotetizó que la unión del herbicida a proteínas involucradas en la síntesis, exportación o ensamble de las subunidades fimbriales podía alterar la expresión de las fimbrias. En este trabajo se demuestra una unión covalente del herbicida a proteínas de membrana externa de *Escherichia coli* uropatógena y paralelamente una disminución de la fimbriación, determinada por tres técnicas diferentes: hemoaglutinación, cuantificación de proteínas de superficie y microscopía electrónica. Una conclusión importante está referida a que la exposición accidental de trabajadores rurales al 2,4-D en muy bajas dosis y durante un corto período de tiempo tendría un efecto protector de la pielonefritis por disminución de la fimbriación; mientras que los altos niveles de exposición predispondrían a la recurrencia del proceso infeccioso en el modelo de la pielonefritis ascendente no obstructiva en ratón (Balagué *et al* 2002). Probablemente los estudios epidemiológicos que asocian exposición a los herbicidas e infección renal estén relacionados con este último tipo de exposiciones.

**Abstract: EFFECT OF THE HERBICIDE 2,4-DICHLOROPHOXYACETIC ACID ON FIMBRIATION OF UROPATHOGENIC BACTERIA.** Claudia Balagué y Ana María Evangelista de Duffard. *Acta Toxicol. Argent. (2006) 14 (1): 12-17.* Epidemiological data demonstrate, on rural populations, that the frequency of inflammatory lesions in renal tissue is higher for individuals exposed to pesticides. Previous studies demonstrated that the herbicide 2,4-D altered the bacterial adherence properties to renal tissue, mediated by fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*, but the mechanism involved is still unknown. The acid 2,4-D has the ability to perform covalent bonds to proteins in gram-negative bacteria. Because of this fact, we hypothesized that the 2,4-D acid binds proteins involved in the synthesis, export or ensemble of fimbrial subunits, modifying fimbrial expression. In this work we demonstrated a covalent bond of the herbicide to outer membrane proteins in uropathogenic *E. coli* and a parallel decrease of fimbriation, assayed by three different methods: hemmaglutination, surface protein quantification and electron microscopy. An important conclusion is that the accidental exposure of rural workers to 2,4-D may have a protective effect by a decrease in fimbriation, when it is used in low doses and during a short period of exposure. But, it must be considered that high doses and several days of exposure had adverse effects, like recurrence of infection, in the mouse model of ascending pyelonephritis (Balagué *et al*, 2002). Probably, the epidemiological studies that associate the herbicide exposure with renal infection were due to the last kind of exposure described.

**Palabras clave:** 2,4-D, fimbrias, *Escherichia coli*, infección urinaria.

**Key Words:** 2,4-D, fimbriae, *Escherichia coli*, urinary infection.

### INTRODUCCIÓN

La exposición accidental u ocupacional a xenobióticos puede modificar la interacción hospede-ro-bacteria. Existen algunos datos epidemiológicos que demuestran que en poblaciones rurales la frecuencia de lesiones inflamatorias de origen infeccioso en el riñón es mayor en individuos expuestos a pesticidas (7,9-13,4%) que en individuos controles (1,5%), (1). El ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) es un herbicida que se excreta por la vía renal de manera inalterada o, en baja proporción, en sus formas conjugadas (2) en el sitio de adhesión de las cepas de *Escherichia coli* productoras de pielonefritis - las células tubulares renales -.

Las bacterias que exitosamente infectan el tracto urinario poseen una constelación de factores que contribuyen a la virulencia (3). La adherencia bacteriana es un pre-requisito de patogenicidad, dado que el sistema de flujo continuo de orina elimina

permanentemente los microorganismos. Colonizar específicamente a los túbulos renales a través de interacciones adhesina - receptor requiere de la presentación de diversos tipos de adhesinas y/o de una regulación estricta de su expresión. Los principales tipos de adhesinas de superficie de *E. coli* uropatógena son de naturaleza fimbrial. Duguid *et al* (4) describió que las fimbrias son apéndices de la superficie celular bacteriana compuestas por subunidades proteicas ensambladas que median la adherencia a células epiteliales y simultáneamente la aglutinación de eritrocitos; y además clasificó a las fimbrias en dos tipos: las que producían un tipo de hemoaglutinación que se inhibió por la adición de manosa en el medio de reacción (manosa - sensibles, MS) y las hemoaglutinantes manosa - resistentes (MR).

En *E. coli* pielonefritogénica las fimbrias se encuentran codificados en el cromosoma bacteriano en un segmento denominado isla de patogenicidad



dad. En esta cepa, los determinantes de virulencia hallados constantemente, son hemolisina (una proteína citolítica) y fimbria P o la fimbria relacionada Prs (5,6). Se han descrito varios mecanismos diferentes que intervienen en la regulación de la expresión de la fimbria P. Uno de ellos involucra al fenómeno de variación de fase, que permite a la población bacteriana el cambio de fase fimbriada a no fimbriada con una frecuencia de  $10^{-2}$  células por generación (7).

Muy diversas condiciones del medio ambiente regulan la expresión de la fimbria P tales como cambios en la temperatura, osmolaridad y la adición al cultivo de concentraciones subinhibitorias de algunos antibióticos u otros compuestos tales como salicilato. Sin embargo no todos los cambios ambientales alteran la expresión de P en el mismo nivel regulatorio y algunos interfieren con el ensamble de las subunidades fimbriales. Estudios previos han demostrado que 2,4-D altera las propiedades de adherencia mediada por fimbrias en *E. coli* (8), si bien aún no se ha estudiado el mecanismo que podría estar involucrado. El objetivo de este estudio fue conocer cual sería el mecanismo por el cual 2,4-D modifica la colonización renal por bacterias uropatógenas en personas expuestas a este herbicida.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Ensayo de hemaglutinación:** La cepa uropatógena en estudio, T149, y la cepa control no patógena HB101 (9), fueron clasificadas según su capacidad de hemoaglutinación. Para ello se obtuvieron glóbulos rojos humanos y de cobayo, elegidos por sus receptores predominantes globósidos y manósidos, respectivamente, se lavaron y resuspendieron en buffer fosfato salino (PBS, pH 7,2) con o sin manosa al 2%. Se determinó el título de hemoaglutinación de las cepas crecidas en agar factor antigénico de colonización (CFA) y resuspendida en PBS hasta un valor de  $10^{10}$  bacterias/ml. Diluciones seriadas de la suspensión de microorganismos (50 µl) se enfrentaron con una gota de una suspensión de cada tipo de eritrocito al 5% en microplacas. La hemoaglutinación se observó por 10 min. a temperatura ambiente y se consideró manosa - resistente cuando se produjo el mismo título de aglutinación en presencia de manosa (10).

**Ensayo de reconocimiento del receptor específico:** La cepa T149 que resultó manosa-resistente, a partir del ensayo anterior, fue caracterizada según la especificidad de su receptor. Para ello, se prepararon suspensiones en PBS de antígeno de Forssman (GbO5) o de globósido (GbO4) de 200 µg/ml. A 0,5 ml de cada solución se le agregó 20 µl de una suspensión al 20% en PBS de eritrocitos de cobayo y las mezclas fueron incubadas por 3 h a 37°C. Luego de 3 lavados, los eritrocitos se resuspendieron en PBS al 3 % y se usaron para los ensayos de hemoaglutinación descriptos anteriormente (11).

**Cuantificación de hemolisina:** Las cepas se desarrollaron durante 4 h en caldo de carne alcalino suplementado con 0,2 % de glucosa. Luego de una centrifugación, los sobrenadantes en diluciones seriadas, se incubaron durante 2 h a 37°C con igual volumen (0,5 ml) de una suspensión de eritrocitos de carnero al 2 % en SF.

Posteriormente se efectuó una centrifugación de 3 min. a 7.000 rpm para descartar los glóbulos rojos no lisados. La hemoglobina liberada se midió a 540 nm y el valor se normalizó por unidad de densidad optica (DO) de cultivo bacteriano (12).

**Determinación de proteínas de superficie:** La extracción de proteínas de superficie se realizó según la técnica descrita por Hoschützky *et al* (13). Brevemente, en 2ml de NaCl 75mM se suspendieron 1013 bacterias/ml desarrolladas en agar CFA durante 24 h. Las suspensiones se calentaron a 65°C durante 30 min. con agitación. Luego de una centrifugación para separar las bacterias defimbriadas, el sobrenadante se trató con glicina 20 mM y EDTA 5 mM y se precipitó con sulfato de amonio 10%. Para separar a los lípidos contaminantes se redisolviaron en etanol al 50% y se precipitaron las proteínas de superficie con LiCl 250 mM. Se realizó su cuantificación por el método de Bradford (14).

**Microscopía electrónica:** Se realizó la observación de las células bacterianas por tinción negativa. Se colocó una gota de cada suspensión bacteriana de  $10^{10}$  -  $10^{11}$  bacterias/ml, desarrolladas en caldo CFA, en la superficie de una grilla soporte recubierta con Formvar (polivinil formaldehído). Se mezcló una gota de colorante negativo electrodensito (1 % de ácido fosfotúngstico) y se dejó secar. La observación de 100 células por ensayo se hizo en un microscopio electrónico de transmisión perteneciente al Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias (INTA, Castelar). Las fimbrias y flagelos se vieron como estructuras filamentosas transparentes al haz de electrones.

**Ensayos con 2,4-D:** Se efectuaron todos los ensayos anteriormente descriptos, en medios controles o suplementados con distintas concentraciones de 2,4-D (Sigma Chemical), según se observa en *tablas y figuras*.

**Determinación de la unión del 2,4-D a proteínas de E. coli:** Las cepas bacterianas se desarrollaron en 10 ml de medio Vogel-Bonner (V-B) durante 6 h a 37°C. Luego de sucesivos lavados, los microorganismos se resuspendieron en 2 ml de PBS. La exposición de las células comenzó con el agregado del herbicida  $^{14}\text{C}$ -2,4-D ( $2 \cdot 10^6$  dpm/ml) conjuntamente con una solución concentrada de 2,4-D (en etanol) para lograr una concentración final de 100 µM de 2,4-D. La incubación se realizó durante 2 h a 37°C y luego de 3 lavados las bacterias se resuspendieron en 1 ml de PBS. Los niveles del xenobiótico radioactivo unido a las proteínas de *E. coli* se determinaron precipitando la suspensión con igual volumen de acetona (4°C), se centrifugó (2.000 rpm durante 10 min.) para obtener el sedi-

mento de proteínas y se lavó varias veces para eliminar el radioactivo libre. Finalmente, el sedimento se solubilizó en Tris 50 mM (pH 7,4), 2% SDS, y se lo calentó a 80°C durante 10 min. Los niveles de <sup>14</sup>C provenientes de las proteínas bacterianas se midieron por espectrometría líquida de centelleo. Se tomaron alícuotas conteniendo 400 µg de proteínas, se las colocó en viales con 3,5 ml de medio de centelleo [PPO 5 mg/ml y POPOP 0,5 mg/ml en Tritón X-100 - Tolueno (34:66)] y se realizó la lectura en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Beckman Instruments Co, Fullerton, CA). La eficiencia de conteo se determinó mediante el método de estándar externo según Horrocks (15). Luego, las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12%. Se sumergió el gel en solución intensificadora de señal (Enlightning Amershan) durante 45 min. y se secó al vacío. El gel se expuso frente a una placa X-Omat de alta sensibilidad a -80°C durante 2 meses.

**Análisis estadístico:** Todos los datos se presentan como la media ± el desvío estándar, las diferencias fueron analizadas por ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer.

**RESULTADOS**

**Identificación de las fimbrias:** Los resultados de las cepas estudiadas por hemoaglutinación se representan en la *Tabla I*. T149 se presentó como una cepa P fimbriada, mientras que HB101 no reveló fimbrias hemoaglutinantes.

**Efecto de 2,4-D sobre la hemolisina y sobre la fimbriación:** La cepa T149 presentó características hemolíticas sobre glóbulos rojos de carnero. El título de hemolisina resultó 1:8 y se calculó en base al porcentaje de hemólisis que genera esta dilución con respecto a la máxima hemoglobina liberada (Absorbancia = 1). T149 alcanzó un 25 % de este valor en la dilución 1:8, mientras HB101 no provocó una hemólisis significativa. El título de hemolisina no se modificó en presencia de 2,4-D 1 mM (*Figura 1*).

Los resultados cuantitativos de los efectos de 2,4-D, ensayado en dos concentraciones diferentes, sobre la fimbriación de T149 se presentan en la *Tabla II*. Ambas concentraciones del herbicida (0,1 y 1 mM) disminuyeron la adherencia bacteriana a glóbulos rojos. Asimismo, los valores obtenidos de la cuantificación de proteínas superficiales y

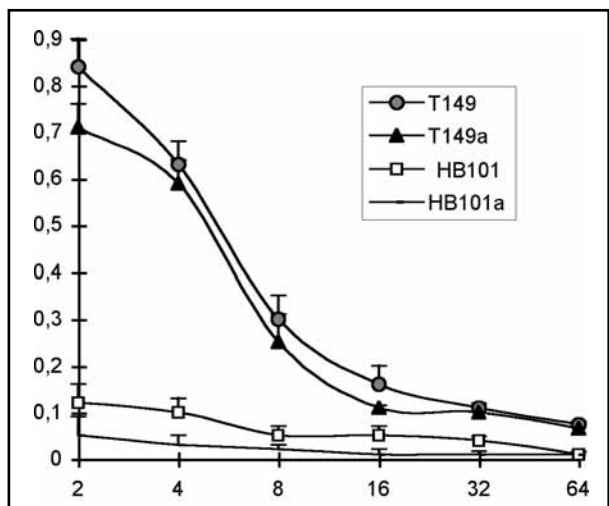
Especie de eritrocitos y receptor							
Cepa	Humanos grupo A (P1)		Cobayo				Tipo fimbrial
	-	manosa	-	manosa	GbO5	GbO4	
T149	1,81±0,17	1,81±0,00	-	-	-	1,81±0,17	P
HB101	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla I.** Títulos de hemoaglutinación de eritrocitos recubiertos de receptores específicos. Los valores se expresan como el log de la inversa de la máxima dilución con aglutinados visibles y representan la media de tres ensayos independientes ± DS. **GbO5:** globopentaosilceramida o antígeno de Forssman; **GbO4:** globotetraosilceramida o globósido.

Medio, suplemento	Título de hemoaglutinación <sup>a</sup>	Proteínas de superficie (mg/g peso seco)	Células fimbriadas (%) <sup>b</sup>
control	1,81 ± 0,17	0,24 ± 0,06	80 ± 12
2,4-D 0,1 mM	1,20 ± 0,00 *	0,12 ± 0,04 *	25 ± 9 *
2,4-D 1 mM	0,90 ± 0,17 **	0,05 ± 0,01**	8 ± 2 **

**Tabla II.** Efecto de 2,4-D sobre la adherencia a eritrocitos, proteínas de superficie y fimbriación de *E. coli* T149. Los valores representan la media ± DS de tres ensayos independientes; a log de la inversa de la máxima dilución con aglutinados visibles; b observadas por microscopía electrónica; \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 significativamente diferente respecto al control.

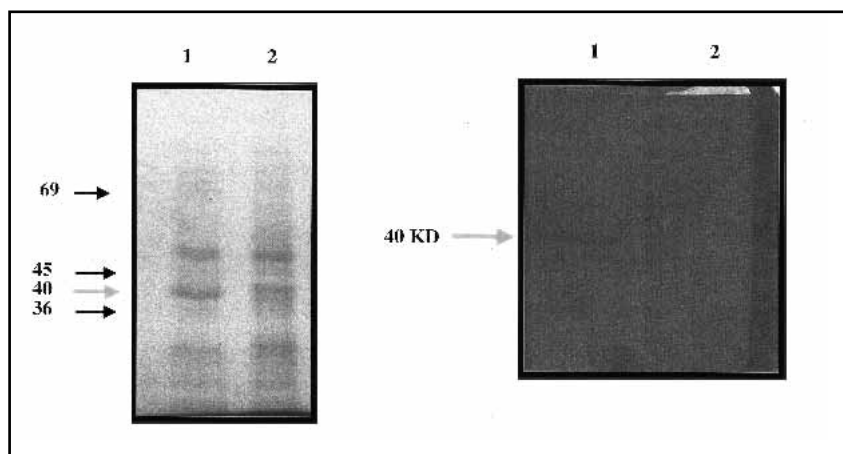
los números de células fimbriadas fueron significativamente menores por efecto de los tratamientos. En las microfotografías electrónicas se presentan algunos microorganismos representativos de la población en las condiciones de cultivo



**Figura 1.** Actividad hemolítica de las cepas, expresada como la cantidad de hemoglobina liberada de glóbulos rojos de carnero. Los valores representan la media de tres experimentos independientes +DS. La letra a significa exposición a 2,4-D a la concentración 1 mM.



**Figura 2.** Microscopías electrónicas de células representativas de la población de la cepa bacteriana T149, desarrolladas en medio control (izquierda) o suplementado con 2,4-D 1 mM (derecha). Las estructuras con aspecto de pelos son las fimbrias, mientras que las prolongaciones más largas son los flagelos bacterianos.



**Figura 3.** Unión covalente del  $^{14}\text{C}$ -UL-2,4-D a proteínas de *E. coli* pielonefritogénica en cultivos bacterianos. La calle 1 muestra a la cepa T149 y la calle 2 a la cepa HB101 no patogénica. Izquierda: electroforesis de proteínas totales en gel de poliacrilamida al 12 %. Se sembraron en cada calle 30  $\mu\text{g}$ . Derecha: fluorografía que demuestra exclusivamente en la calle 1 unión covalente del  $^{14}\text{C}$ -UL-2,4-D con proteínas de pesos moleculares próximos a los 40 kD. La ubicación en ambos paneles fue corroborada mediante los marcadores de peso molecular.

ensayadas (Figura 2). El 80% de las células bacterianas desarrolladas en el medio control (izquierda) se mostró abundantemente fimbriada y con algunos flagelos. Las fimbrias tenían una longitud entre 0,25 y 1 nm, y se encontraron distribuidas sobre toda la superficie celular. Las zonas oscuras que rodean a las células se asocian a los carbohidratos de superficie que no excluyen el colorante

negativo. El tratamiento con 2,4-D disminuyó la proporción de células fimbriadas y además cada célula mostró una menor fimbriación (derecha). Estas alteraciones persistieron con la concentración 0,1 mM del herbicida, no obstante resultaron menos notorias.

**Unión del 2,4-D a proteínas bacterianas:** El 2,4-D ha podido generar uniones covalentes a proteínas de bacilos gram negativos (16). Debido a este hallazgo, se hipotetizó que la unión del herbicida a proteínas involucradas en la síntesis, exportación o ensamble de las subunidades podía alterar la expresión de las fimbrias; en consecuencia se decidió analizar esta posibilidad mediante la unión específica del  $^{14}\text{C}$ -UL-2,4-D a proteínas

en experimentos *in vivo* del cultivo bacteriano. La cantidad de compuesto radioactivo unido a proteínas está representada por la medida de la radioactividad, ya que la precipitación de las proteínas celulares fue seguida de lavados exhaustivos (17). La radioactividad detectada en la preparación proveniente de las bacterias incubadas durante 2 h con el herbicida marcado correspondió a una actividad específica de  $2.350 \pm 200$  dpm/mg de proteína para la cepa T149. Al explorar la selectividad del xenobiótico radioactivo para unirse covalentemente, se detectó radiactividad mediante fluorografía sobre bandas de proteínas correspondientes a pesos moleculares próximos a los 40 kD para esta cepa uropatogénica y no se detectó radioactividad en el perfil proteico de la cepa no patogénica HB101 (Figura 3).

## DISCUSIÓN

Debido a la relevancia de la fimbria P en la pielonefritis y a su asociación con hemolisina en la misma isla de patogenicidad, se resolvió proseguir los estudios previos de los efectos de 2,4-D sobre

la cepa que expresaba alto título de ambos factores de virulencia (T149). Con anterioridad demostramos alteraciones inducidas por 2,4-D en la capacidad de adherencia a eritrocitos de esta cepa (8). En este trabajo se demuestra que el herbicida disminuyó significativamente el contenido de proteínas de superficie, resultados que son confirmados y relacionados con fimbrias por microscopía electrónica. Cabe destacar que el tratamiento con ambas concentraciones del herbicida (0,1 y 1 mM) disminuyó la proporción de células fimbriadas del 80% al 25% y 8 % y adicionalmente estas células revelaron una menor fimbriación (Figura 2). Estos resultados demostraron que las reducciones de los títulos de hemoaglutinación y la disminución del contenido de proteínas de superficie se debieron a una menor fimbriación de la población bacteriana. Por el contrario, la presencia de flagelos y la actividad de la exotoxina hemolisina no se encontró alterada por la exposición a 2,4-D, por lo que se dedujo que estos factores permanecieron intactos.

La disminución de la expresión fimbrial puede obedecer a varios mecanismos: una alteración en la exportación y/o ensamble de las subunidades proteicas a nivel de las membranas citoplasmática y/o externa, una inhibición de la síntesis de las mismas por alguno de los mecanismos regulatorios como variación de fase, o una pérdida de la isla de patogenicidad, como ha sido descrito para otras cepas uropatógenas (5). Algunos de estos eventos podrían ser descartados, así si fimbria P y hemolisina se encuentran en la misma isla de patogenicidad, no habría una delección de la isla en presencia de 2,4-D debido a que la actividad hemolítica se mantuvo inalterada. Tampoco sería probable una alteración generalizada de las proteínas de exportación de subunidades flagelares, fimbriales y hemolisina por rigidez de las membranas. Si bien previamente determinamos un aumento significativo en la proporción de ácidos grasos saturados / insaturados (18), esta rigidez no alteraría la funcionalidad de las proteínas de membrana involucradas en la expresión de todos los factores de virulencia.

La especificidad de la inhibición fimbrial podría responder a una modificación de la síntesis, y/o exportación de las subunidades proteicas de estas estructuras. La translocación inicial de las subunidades a través de la membrana citoplasmática ocurre por el sistema de secreción general Sec (19), dicha translocación podría encontrarse alterada por los cambios en el ambiente lipídico de la membrana citoplasmática. Una hipótesis probable, entonces, sería una funcionalidad disminuida del sistema Sec. Sin embargo Sec es una proteína esencial y la alteración de su función involucraría modificaciones de parámetros de crecimiento microbiano.

Estas modificaciones no fueron detectadas, tal como se demostró previamente (18), por lo que podría asumirse que la vía de exportación a través

de la membrana citoplasmática no se encuentra alterada.

La fimbria P se exporta completamente por la vía chaperona periplásmica - acomodador de membrana externa, y las proteínas implicadas son específicas de cada tipo fimbrial. La unión covalente a proteínas involucradas en la exportación o ensamble de las subunidades en la membrana externa podría alterar la fimbriación. Para corroborar esta presunción se efectuó el ensayo de unión de 2,4-D radioactivo a proteínas de *E. coli*. La banda radioactiva se detectó dentro del rango de pesos moleculares de proteínas de membrana externa (40 kD, Figura 3). Considerando que no se reveló esta unión covalente (2,4-D - proteína) en la cepa no fimbriada HB101, podría tratarse de proteínas de membrana externa implicadas en el ensamblaje fimbrial como PapC y/o sus precursores. Probablemente la unión del xenobiótico a estas proteínas altere sus funciones de acomodadoras. Otra probable hipótesis es que la unión del 2,4-D a proteínas de membrana dispare la variación de fase fimbrial. No se puede descartar la inducción de variaciones de fase de estas fimbrias. Esta es una respuesta muy rápida a cambios ambientales y permite una adecuada adaptación. Se conoce que una proteína involucrada en el metabolismo global de aminoácido y que responde a la concentración de leucina intracelular (Lrp) participa de este mecanismo regulatorio. Previamente, fue descrito por Fabra *et al* (20) un ingreso disminuido de leucina al interior celular de bacilos gram-negativos inducido por el 2,4-D.

Hasta el momento no existen evidencias claras con respecto a cuáles son las señales que disparan estos cambios de fase. Podría sugerirse que los desbalances en la composición de fosfolípidos de la membrana citoplasmática, así como la unión covalente del 2,4-D a proteínas de membrana externa pueden desencadenar las transformaciones fenotípicas observadas. La regulación de la expresión fimbrial ha sido estudiada generando variantes del cultivo *in vitro* que simulan a las condiciones presentes dentro del huésped (temperatura, osmolaridad, privación de nutrientes), pero no se conocen hasta el momento variaciones de fase inducidas por la exposición a xenobióticos. Resulta entonces de interés continuar con estos estudios.

Una conclusión importante está referida a que la exposición accidental de trabajadores rurales al 2,4-D en muy bajas dosis y durante un corto período de tiempo tendría un efecto protector de la pielonefritis por disminución de la fimbriación; mientras que los altos niveles de exposición predispondrían a la recurrencia del proceso infeccioso en el modelo de la pielonefritis ascendente no obstructiva en ratón (8).

Sería importante determinar si los estudios epidemiológicos que asocian exposición a los herbicidas y cicatrices renales están relacionados con este último tipo de exposiciones.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Allazov, S. (1994). The characteristics of acute infectious-inflammatory kidney diseases in pesticide exposure. *Urol. Nefrol.* 2: 14-16.
2. Knopp, D., and Glass, S. (1991). Biological monitoring of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid exposed workers in agriculture and forestry. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 63: 329-333.
3. Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 80-128.
4. Duguid, J. P., Clegg, S., Wilson, M. I. (1979). The fimbrial and non - fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 12: 213-227.
5. Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschape, H., and Hacker, J. (1994). Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* 62: 606-614.
6. Guyer, D. M., Kao, J., and Mobley, H. L. T. (1998). Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: distribution of homologous sequences among isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, catheter-associated bacteriuria and from faecal samples. *Infect. Immun.* 66: 4411-4417.
7. Rhen, M., Makela, P. H., and Korhonen, T. K. (1983). P-fimbriae of *Escherichia coli* are subject to phase variation. *FEMS Microbiol. Lett.* 19: 267-271.
8. Balagué, C., Silva de Ruiz, C., Rey, R., Evangelista de Duffard, A. M., Nader-Macias, M. E. (2002) Effect of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors. *Toxicol.* 177: 143-155.
9. Boyer, H. W., and Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA en *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
10. Kunin, C. M. (1994). Urinary tract infections in females. *Clin. Infect. Dis.* 18: 1-12.
11. Leffer, H., and Svanborg-Edén, C. (1980). Chemical identification of a glycosphingolipid receptor for *Escherichia coli* attaching to human urinary tract epithelial cells and agglutinating human erythrocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* 8: 127-134.
12. van den Bosch, J. F., Postma, P., de Graaff, J., and MacLaren, D. M. (1980). Determination of the -haemolytic urinary *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 8: 75-77.
13. Hoschützky, H., Lottspeich, F., and Jann, K. (1989). Isolation and characterisation of the alpha-Galactosyl-1,4-Beta-Galactosyl-Specific adhesin (P Adhesin) from fimbriated *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57: 76-81.
14. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.
15. Horrocks, D. L. (1974). Applications of liquid scintillation counting. Academic Press, New York.
16. Fabra de Peretti, A. I., Mori de Moro, G. B., Ghittoni, N. E., Evangelista de Duffard, A. M. and Duffard, R. O. (1997). Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on *Rhizobium sp.* in pure culture. *Toxicity Assess.* 2: 217-228.
17. Boelsterli, U. A. (1993). Specific of covalent drug - protein interactions in hepatocytes and their toxicological significance in drug - induced liver injury. *Drug Metabol. Rev.* 25: 395-451.
18. Balagué, C., Sturtz, N., Duffard, R., Evangelista de Duffard, A. M. (2001) Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide on *Escherichia coli* growth, chemical composition and cellular envelope. *Environ. Toxicol.* 16: 35-45.
19. Soto, G. E., Hultgren, S. J. (1999). Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* 181: 1059-1071.
20. Fabra de Peretti, A. I., Duffard, R., and Evangelista de Duffard, A. M. (1992). Effects of 2,4-D on *Rhizobium sp* membrane fluidity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 301-306.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Oscar Di Paolo por brindar su experiencia y asesoramiento en los ensayos de unión covalente del 2,4-D a proteínas bacterianas.

## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 03279286) es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina. Tiene por objetivo básico la publicación de trabajos originales, comunicaciones breves, actualizaciones o revisiones, temas de divulgación, comentarios bibliográficos, notas técnicas y cartas al editor. Asimismo, se publicarán noticias relacionadas con los diferentes campos de la Toxicología.

Acta Toxicológica Argentina (en adelante "Acta") publicará contribuciones en español, portugués e inglés. Todas serán evaluadas por dos revisores; la selección de los mismos será atributo exclusivo del Comité Editorial. Este proceso determinará que el mencionado Comité opte por rechazar, aceptar con cambios o aceptar para su publicación el trabajo sometido a su consideración. En todos los casos los autores recibirán copia sin firma de la opinión de los evaluadores.

Las contribuciones científicas originales enviadas a consideración de ATA deberán ajustarse al siguiente formato básico:

- Página 1: título, subtítulo, nombres completos de o de los autores, laboratorio o institución donde se realizó el trabajo, dirección postal completa, incluyendo código postal, correo electrónico, teléfono y fax, autor al cual debe dirigirse toda la correspondencia.

- Página 2: título del trabajo en castellano e inglés y resúmenes de hasta 250 palabras en castellano e inglés. Tres - cuatro palabras clave en castellano, portugués e inglés.

- Página 3 en adelante: Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Bibliografía citada, Leyendas de Ilustraciones y Tablas con leyenda.

La extensión máxima de estos aportes no deberá superar las 8 (ocho) páginas. El texto deberá ser escrito en PC, en papel tamaño A4, a doble espacio, con márgenes superior, inferior e izquierdo de 4 cm. Se deberán enviar 3 juegos. Conjuntamente con las 3 copias del manuscrito, los autores deberán remitir una versión en disquete de 3 1/2 pulgadas utilizando alguno de los siguientes procesadores de texto: Word for MS-DOS; Word for Macintosh; Word Perfect for DOS, indicando programa y versión usados. En el caso que los revisores recomienden la revisión del trabajo, la nueva versión deberá enviarse en disquete y tres copias impresas consignando "versión 1".

Las comunicaciones breves deberán respetar un formato similar al indicado para las contribuciones científicas exceptuando el resumen en español. El texto no necesariamente se dividirá en las partes indicadas (Introducción, Material y Métodos, etc.); no obstante deberá contener en forma concisa la información que corresponde a esas partes. La extensión de esta categoría de aportes no deberá superar las 3 (tres) páginas.

Las revisiones, actualizaciones y temas de divulgación deberán ser lo más concisas posibles y su extensión no excederá de 6 (seis) páginas. Su redacción deberá considerar lectores con formación científica pero ajenos o alejados del tema. Se considerarán preferentemente las revisiones solicitadas por el Comité Editorial.

Los comentarios bibliográficos serán contribuciones solicitadas por el Director. El autor deberá emitir una opinión fundamentada del trabajo sometido a su consideración. Además deberá incluir la siguiente información: título en idioma original, autor/es, edición considerada, traductor, editorial y sede de la misma, tomo o volumen, número de páginas y año de edición. Se indicará claramente nombre del comentarista, institución a la que pertenece y domicilio completo. El texto no podrá ocupar más de 2 (dos) páginas.

Las notas técnicas se referirán exclusivamente a modificaciones de métodos, determinación de errores de las mismas, etc. Su extensión no superará las 2 (dos) páginas; al final deberán constar los datos que identifiquen claramente al autor/es.

Las cartas al Editor serán textos de una extensión no mayor de doscientas palabras y revestirán el carácter de correspondencia científica referida a textos publicados con anterioridad. El o los autores serán debidamente indicados.

Se solicita a los autores que tengan en cuenta las siguientes normas al preparar sus manuscritos:

- En todos los casos se deberá consignar en el ángulo superior derecho de cada hoja el apellido del autor o del primer autor y el número correlativo que corresponda, incluidas las páginas con Tablas.

- En el caso de sustancias químicas se tomará como referencia prioritaria a las normas de la IUPAC.

- Los organismos se denominarán conforme a las normas internacionales, indicando sin abreviaturas el género y la especie en itálicas o subrayados.

- Las ilustraciones (fotografías, gráficos) deben ser confeccionadas sobre materiales de alta calidad, con técnicas que permitan su reproducción sin tratamientos especiales. Es aconsejable que este material tenga las dimensiones de la caja de Acta; los autores deben tener presente que en los casos de ilustraciones en las que sea necesario proceder a su reducción, el tamaño de las letras, números y demás elementos de las mismas deben tener dimensiones mayores para que la nitidez no se vea afectada luego de la impresión.

Se enviarán un juego de originales y dos copias. Cada una de las ilustraciones deberá portar en el dorso, escrito con lápiz suave, el número que le corresponde, nombre del primer autor y mediante una flecha se indicará la posición superior. Las leyendas irán en hoja aparte.

Los costos adicionales que pudieran ocasionarse por la edición de dicho material serán a cargo del autor.

- Las tablas y sus leyendas se presentarán en forma individual, en hoja aparte, identificadas mediante numeración arábica conforme al orden en que aparecen en el texto.

La ubicación preferente de la tabla en el texto se indicará mediante una flecha. Las tablas se ubicarán al final de cada manuscrito.

- Las citas bibliográficas en el texto se indicarán mediante números correlativos, por orden de aparición, entre paréntesis; por ejemplo: "la separación de las isoenzimas se hizo por electroforesis de acuerdo a la técnica de Dietz y Lubtano (4)"

En el caso de citar artículos de más de dos autores, se indicará el apellido del primero seguido de la expresión et al.: "Castañé et al. (5) fueron los primeros en..."

Las referencias bibliográficas serán agrupadas bajo el acápite "Bibliografía citada"; la lista se ordenará conforme a los números asignados.

El formato de las citas es el siguiente:

Artículo en publicación periódica:

"Malla Reddy, P. and M. Bashamohideen (1989). Fenvalerate and cypemmerhrin induced changes

in the haematological parameters of *Cyprinus carpio*. Acta Hydrochim. Hydrobio. 17 (1), 101-107"  
Libro: "Dix, H.M. (1981), Environmental pollution. John Wiley & Sons, New York, 286 pp."

Las abreviaturas de la denominación de la revista serán las que ellas mismas indican en su texto.

- Cualquier modificación excepcional de las normas estipuladas que los autores soliciten será considerada por el Director.

- Las pruebas de galera se enviarán al autor indicado como receptor de la correspondencia. Las mismas serán revisadas y devueltas dentro de las 48 horas de recibidas.

- El autor indicado recibirá 10 separatas sin cargo. El excedente solicitado sobre esa cantidad será costado por el/los autores: la cantidad solicitada deberá ser indicada al Editor en el momento de devolver las pruebas de galera.

Toda la correspondencia referida a "Acta Toxicológica Argentina" deberá ser dirigida al Comité Editorial, Alsina 1441 (1088) Buenos Aires, Argentina Telefax ++54-11-4381-6919.

Se solicita canje con otras publicaciones temáticamente afines a Acta Toxicológica Argentina.

## INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

---

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 03279286) is the official journal of the Asociación Toxicológica Argentina (Argentine Toxicological Association) for scientific diffusion.

Acta Toxicológica Argentina (herein below "Acta") is basically aimed at publishing original full-length papers, short communications, reports on research in progress or review papers, topics of interest to workers in Toxicology, book reviews, technical communications as well as letters to the Editor. News relevant to the different fields of Toxicology will also be published.

ATA will publish articles written in either Spanish, Portuguese or English. Every article will be evaluated by two examiners. Only the Editorial Board will be responsible for selecting articles with –that is, decisions about (a) rejected articles, (b) accepted articles with, however, changes to be introduced by authors, or (c) accepted articles with no changes whatsoever are a privilege of the Editor Board. In all cases, authors will receive an unsigned copy of the examiners' evaluation. Scientific original manuscripts submitted to the consideration of the Editorial Board should adhere to the following basic format:

- Page 1: Title, and subtitle of paper. Author's full names; academic or professional affiliation, and complete name of the laboratory or institution where research was done.

Complete address (city, State or Province, zip code, country, e-mail, phone number and fax number).

- Page 2: Title of paper in Spanish and English. A list of three or four key words in Spanish or

Portuguese and English should be included.

- Page 3 onward: As a rule, full length papers should be divided into sections headed by a caption: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, caption of figures and caption of tables.

Full-length papers should not exceed eight pages.

Text should be typed with PC, on A4 paper, in double-spaced typing with at least 4 cm upper lower, and left margin. Typescripts should be submitted in triplicate. Besides the 3 copies of the manuscript, authors are requested to submit the paper on diskette (3 1/2") made in one of the next word processing systems: Word for MS-DOS; Word for MACINTOSH; Word Perfect for DOS indicating the program and version used. Revised versions of the paper, because of referee's recommendations should always be accompanied by a new diskette and 3 printouts of the manuscript.

Short communications should adhere to a similar format. However it should contain no section headings, but text is supposed to contain, in a concise way, every information relevant to the above mentioned headings (Introduction, Materials and Methods, etc.). Short communications should not exceed three pages.

Review papers, updating, and reports on research in progress should be as concise as can be. Such articles should not exceed three pages. Their wording should address a scientifically educated reader-ship that, however, can be unfamiliar with topics involved. Review papers, updating, and reports on research in progress previously request-

ed to authors by the Editorial Board will be privileged.

Book review should have been requested to authors by the Editor. Authors should sustain their contention on the book submitted to their attention. Besides, authors of any book review should submit the following information: Title of the book in its original language, full names of authors or editors of the book, edition number of the book, translator's name if any, publisher's full name, city, volume number if any, number of pages and publishing years. The full name and academic or professional affiliation of the author of any book review should be stated clearly. Book review should not exceed two pages.

Technical communications should refer exclusively to modifications in scientific methods, determinations or errors committed in scientific methods, etc.

Technical communications should not exceed two pages. At the end of a communication, authors full name and particulars should be clearly identified.

When submitting a full-length paper, authors should take the following recommendation into account:

- On the upper right angle of every page, the last name (surname) of author (or the first author) should be typed next to the corresponding page number. Pages should also be paginated.

- When referring to chemicals, IUPAC standards should be preferred.

- Organisms should be denominated according to international standards. Gender and species should be stated unabridged. When using a computer word processor, authors should use italics. When using a typewriter, authors should underline.

- Illustrations (photographs, diagrams, etc.) should be made on top quality materials, the technique of which should allow illustration to be reproduced without special treatments whatsoever. It is advisable that illustrations be the same size as in Acta page. As regards illustrations that must be reduced, authors should see to it that letters, figures, and/or any other element in illustration be bigger-sized on the original so that such letters, figures or elements be still clearly readable once illustration has been reduced. Illustrations should also be sent in triplicate (one original and two copies).

On the reverse of illustration the following elements should be written with a soft lead pencil: Figure corresponding to illustration, last name (surname) of author (or first author). An arrow should point out the upper part of illustration. Captions to illustration should be typed on a separated sheet.

## INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.), (ISSN. 153279286) é o órgão especial de difusão científica da Associação de trabalhos originais, livros, comunicações, actualizações ou revisões, tema de divulgação, comentários bibliográficos, notas técnicas e cartas ao editor. Igualmente serão

Authors should be aware that any extra charge caused by the printing of illustrations will be levied for each illustration.

- Tables and captions thereof should be submitted on separate sheets. Each page should be paginated with Arabic numerals, according to the order in which tables appear in article.

- Literature references in the text should be given at the appropriate places by numbers between brackets. For example: "Isoenzymes separation was performed by electrophoresis according to a technique developed by Diestz and Lubrano (4)".

When referring to an article written by more than one author, the last name (surname) of the first author will be followed by "et al." For example: "Castañé et al. (5) have been the first researchers in..."

- Literature references should be listed under the heading "References". References should be arranged according to the numbers given to citations in the text of article. Format of references is as follows:

- A paper published in a journal.

Malla Reddy P. and M. Bashamohiedeen (1989) Fenvalerate and Cypermethrin induced changes in the haematological parameters of *Cyprinus carpio*. Acta Hydrochim. Hydrobio. 17 (1), 101-107.

- a book: Dix H. M. (1981) Environmental pollution. John Wiley & Sons., New York, p. 286.

A bridged name of journals should be the abridged name that a journal uses.

- Any exceptional modifications to the above mentioned instructions that authors should request will be submitted to the attention of the Editor.

Proofs will be sent to author whose address has been stated in paper. Author should review proof and airmail proof back to the Editor as soon as possible (within 48 hours of receiving proof, in the Argentine Republic).

Author, or first author will receive 10 off prints at no charge.

If author or authors request extra of prints, a charge will be levied.

Author or authors should state the number of extra of prints they wish to receive when they send back the reviewed proof to the Editor. Any correspondence referred to ATA should be sent to:

Acta Toxicológica Argentina – Comité Editorial – Alsina 1441 (1088) Buenos Aires, Argentina  
Telefax: ++54-11-4381-6919.

Exchange is kindly requested with journals the scope and purpose thereof are akin to the scope and purpose of "Acta Toxicológica Argentina".

publicadas notícias relacionadas com diferentes campos da Toxicologia.

Acta Toxicológica Argentina (em adelante "Acta") publicará contribuições em espanhol, português e inglês. Todas serão avaliadas por dois revisores; a seleção deles será atribuição exclusiva do Comité



Editorial. Este processo determinará que o mencionado Comité opte por eliminar, aceitar com alterações ou aceitar para publicação o trabalho submetido para sua consideração. Em todos os casos os autores receberão cópia sem assinatura da opinião dos avaliadores.

As contribuições científicas originais enviadas à consideração da Acta deverão ajustar-se à seguinte estrutura básica:

- Página 1: título, subtítulo nomes completos do ou dos autores, laboratório ou instituição onde se realizou o trabalho; endereço postal completo, incluindo código postal, telefone e fax; autor ao qual toda a correspondência deverá ser dirigida.

- Página 2: título do trabalho em espanhol, português em inglês; resumos de até 250 palavras, em espanhol, português e em inglês. Três, quatro palavras-chaves em espanhol, português e em inglês.

- Página 3 em seguida: o Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Bibliografia indicada, Títulos de Ilustrações e Quadros com legendas. A extensão máxima destes aportes não deverá superar 8 (oito) páginas. O texto deverá ser escrito com PC em papel tamanho A4 com espaço duplo, com margens superior, inferior e esquerda de 4 cm. Deverão ser enviados 3 jogos.

Junto com as cópias do manuscrito, os autores deverão enviar uma versão em disquete (de 3 1/2"), em um dos seguintes processadores de texto: WORD for MS-DOS, WORD for MACINTOSH, WORD PERFECT for MS-DOS. Caso os revisores recomendem revisão do trabalho, a nova versão também deverá ser acompanhada de uma cópia em disquete e 3 jogos do texto em papel.

As comunicações breves deverão respeitar um formato semelhante ao indicado para as contribuições científicas. O texto não necessariamente será dividido nas partes indicadas (Introdução, Material e Métodos, etc.); não obstante, deverá conter em forma concisa a informação que corresponde a estas partes. A extensão desta categoria de aportes não deverá superar 3 (tres) páginas.

As revisões, actualizações e temas de divulgação deverão ser o mais conciso possível e sua extensão não excederá de 6 (seis) páginas. Sua redação deverá contemplar leitores com formação científica, porém, estranhos ao tema.

Considerar-se-ão preferentemente as revisões solicitadas pelo Comité Editorial.

Os comentários bibliográficos serão contribuições solicitadas pelo Diretor.

O autor deverá emitir uma opinião fundamentada sobre o trabalho submetido à sua consideração. Além disso, deverá incluir a seguinte informação: título em idioma original, autores, edição considerada, tradutor, editorial e respectivo lugar, o livro ou volume, número de páginas e ano da edição.

Será claramente indicado o nome do comentarista,

instituição à qual pertence e endereço completo. O texto não poderá ocupar mais que 2 (duas) páginas. As notas técnicas referir-se-ão exclusivamente a modificações de métodos, determinação dos respectivos erros etc. Sua extensão não ultrapassará 2 (duas) páginas; ao final deverão constar os dados que identifiquem claramente os autores.

As cartas do editor serão textos de extensão não superior a 200 palavras e terão o caráter de correspondência científica relacionada com textos publicados anteriormente. Autor ou autores serão devidamente indicados.

Solicita-se aos autores que tenham em conta as seguintes normas ao prepararem seus manuscritos:

- Em todos os casos dever-se-á consignar no ângulo superior direito de cada folha o sobrenome do autor ou do primeiro autor e o número correlativo que corresponde, inclusive as páginas com quadros.

- No caso de substâncias químicas, se adotará como referencia prioritária as normas da IUPAC.

- Os organismos serão denominados segundo as normas internacionais, indicando sem abreviaturas o gênero e a espécie em itálico ou sublinhados.

- As ilustrações (fotografias, gráficos) devem ser confeccionadas com materiais de alta qualidade, com técnicas que possibilitem sua reprodução sem tratamentos especiais. E aconselhável que este material tenha as dimensões de Acta; os autores devem ter em conta que, nos caso de ilustrações nas quais seja necessário proceder a sua redução, o tamanho das letras, números e outros elementos devem ter dimensões maiores para que a nitidez não seja afetada depois da impressão.

- Serão enviados um jogo de originais e duas cópias. Cada uma das ilustrações deverá levar no verso, escrito com lápis suave, o número que lhe corresponda, nome do primeiro autor e mediante uma seta será indicada a posição superior. Os títulos irão em folha separada.

- Os custos adicionais que possam produzir-se pela edição do referido material ficarão a cargo do autor.

- Os quadros e suas legendas serão apresentados em forma individual, em folhas separadas, identificadas segundo numeração arábica, segundo a ordem em que apareçam no texto. A localização preferida do quadro no texto será indicada mediante uma seta. Os quadros localizar-se-ão no final de cada manuscrito.

- As referências bibliográficas serão indicadas por números correlativos segundo se apresentem no texto: por exemplo, "A separação das isoenzimas foi feita por electroforese de acordo com a técnica de Dietz e Lubrano (4)".

- No caso de mencionar artigos de mais de dois autores, será indicado o sobrenome do primeiro seguido da expressão e ou: o "Castañé e ou (5) foram os primeiros em ..."

- As referências bibliográficas serão agrupadas segundo o título "Bibliografia citada"; a lista será

organizada segundo os números correspondentes. O formato das citações é o seguinte:

- Artigo em publicação periódica: o "Malla Reddy, P. and M. Bashamohideen (1989). Fenvalerate and Cypermethrin induced changes in the haematological parameters of *Cyprinus carpio*. *Acta Hydrochim. Hydrobio.* 17(1), 101-107."
- Livro: "Dix, H.M. (1981), *Environmental pollution*. John Wiley & Sons, New York, 286 pp."
- As abreviações do nome das revistas serão as que elas mesmas indiquem no texto.
- Qualquer modificação excepcional das normas estipuladas que os autores solicitem será considerada pelo Diretor.
- As provas de impressão serão enviadas ao autor

indicado como receptor da correspondência.

- As mesmas serão revistas e devolvidas dentro de 48 horas após recebidas.
  - O autor indicado receberá 10 separatas sem despesa. O excedente solicitado sobre essa quantidade será custeado por ele ou demais autores; a quantidade solicitada deverá ser comunicada ao Editor no momento de devolver as provas de impressão.
- Toda a correspondência relativa à *Acta Toxicológica Argentina* deverá ser dirigida ao Comité Editorial, Alsina 1441, Of. 302 - (1088) Buenos Aires, Argentina. Telefax: ++54-11-4381-6919.
- Solicita-se troca com outras publicações tematicamente afins com a *Acta Toxicológica Argentina*.