

ISSN 0327-9286

Acta
Toxicológica
Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 17
N° 1
Julio 2009

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

Susana Isabel García

Vicepresidente

Gerardo D. Castro

Tesorero

Augusto Piazza

Secretaria

Noemí Verrengia Guerrero

Vocales

Ricardo Aristu

Mirtha Nassetta

Adolfo R. de Roodt

Vocales Suplentes

Daniel A. Méndez

Graciela Bovi Mitre

Gabriela Fiorenza

Comité Científico

Nelson Albiano

Teodoro Stadler

Marta Carballo

Ana Pechén de D'Angelo

Eduardo Baroni

Organo de Fizcalización

Patricia Quiroga

Daniel González

Eduardo Scarlato

Tribunal de Honor

Estela Gimenez

María Rosa Llorens

José A. Castro

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*

Adriana S. Ridolfi *FFyB - 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)

EVALUACIÓN DE RIESGO POR PLAGUICIDAS SOBRE AGUAS SUPERFICIALES DE LA REGIÓN NORPATAGÓNICA ARGENTINA <i>Tosí, Analía P.; Pechen de D'Angelo, Ana M.; Savini, Mónica C.; Loewy, Ruth M.</i>	1
ALTERACIONES DEL DESARROLLO EMBRIONARIO, POLIAMINAS Y ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDOS POR PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN <i>Rhinella arenarum</i> <i>Lascano, Cecilia Inés; Sotomayor, Verónica; Ferrari, Ana; Venturino, Andrés</i>	8
REVISIÓN DE LA TOXICOCINÉTICA Y LA TOXICODINAMIA DEL ÁCIDO CIANHÍDRICO Y LOS CIANUROS <i>Quiroga, Patricia N.; Olmos, Valentina</i>	20
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES	33

Los resúmenes de los artículos publicados en Acta Toxicológica Argentina se pueden consultar en la base de datos LILACS, en la dirección literatura científica del sitio www.bireme.br

Acta Toxicológica Argentina está indexada en el Chemical Abstracts. La abreviatura establecida por dicha publicación para esta revista es Acta Toxicol. Argent.

Calificada como Publicación Científica Nivel 1 por el Centro Argentino de Información Científica y Tecnológica (CAICYT), en el marco del Proyecto Latindex

EVALUACIÓN DE RIESGO POR PLAGUICIDAS SOBRE AGUAS SUPERFICIALES DE LA REGIÓN NORPATAGÓNICA ARGENTINA

Tosi, Analía P.¹; Pechen de D'Angelo, Ana M.²; Savini, Mónica C.²; Loewy, Ruth M.^{2*}

¹ Subsecretaría de Medio Ambiente, Municipalidad de Neuquén, Neuquén, Argentina

² LIBIQUIMA. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional del Comahue, Neuquén, Argentina. Buenos Aires 1400, 8300 Neuquén, Argentina. TE & FAX: 054-299-4490-385

* Autor para correspondencia: mloewy@uncoma.edu.ar

RESUMEN: EVALUACIÓN DE RIESGO POR PLAGUICIDAS SOBRE AGUAS SUPERFICIALES DE LA REGIÓN NORPATAGÓNICA ARGENTINA. Analía P.Tosi; Ana M. Pechen de D'Angelo; Mónica C. Savini; Ruth M. Loewy; *Acta Toxicol. Argent. (2009) 17 (1): 1-6*. Aunque el manejo integrado de plagas se aplica en forma creciente en la Región Norpatagónica, todavía una amplia gama de plaguicidas es utilizada con el fin de controlar apropiadamente las principales plagas agrícolas. Otros agroquímicos también son aplicados en las actividades industriales asociadas. El objetivo del presente trabajo es evaluar el impacto potencial causado por estos plaguicidas sobre los organismos acuáticos y para ello se utilizan datos bibliográficos de toxicidad aguda y resultados analíticos locales. Se utilizó un procedimiento escalonado, permitiendo la selección de aquellos xenobióticos ambientales que justificarían un estudio de ecotoxicidad posterior. Los residuos máximos de metil azinfos (S-(3,4-dihidro-4-oxobenzo[d]-[1,2,3]-triazin-3-ylmethyl)O,O-dimethyl phosphordithioate), indican la probabilidad de efectos agudos en el 37% de las especies estudiadas en el río, principalmente peces y zooplancton. Este valor se incrementa en los drenajes hasta un 42%. En el caso del carbaril (1-naphthylmethylcarbamate) los residuos encontrados en drenajes afectarían al 14% de las especies estudiadas, mientras que en el río el impacto es despreciable.

Palabras clave: Plaguicidas; Agua superficial; Evaluación de riesgo; Metil azinfos; Carbaril

ABSTRACT: ASSESSING PESTICIDE HAZARDS ON SURFACE WATER FROM THE NORTHERN PATAGONIAN REGION- ARGENTINA. Analía P.Tosi; Ana M. Pechén de D'Angelo; Mónica C. Savini; Ruth M. Loewy. *Acta Toxicol. Argent. (2009) 17 (1): 1-6*. Although the Integrated Pest Management (IPM) is increasingly being applied in the Northern Patagonia Region, different pesticides are still used in order to properly control agricultural pests. Other agrochemicals are also applied in the agriculture associated activities like conservation and packaging industries. The potential impact caused by these pesticides on aquatic organisms is assessed in the present study by means of acute toxicity data available in the literature and local analytical results. A tiered procedure was used allowing the selection of those environmental xenobiotics that need further ecotoxicity studies. The observed maximum residues of azinphos-methyl, (S-(3,4-dihydro-4-oxobenzo[d]-[1,2,3]-triazin-3-ylmethyl)O,O-dimethyl phosphordithioate), indicate the probability of acute effects in 37 % of the studied species in the river, mainly fish and zooplankton. This value increased in drainage channels samples up to 42 %. Additionally, carbaryl (1-naphthylmethylcarbamate) residues found in drainage channels affect 14 % of the studied species, while in the river samples the impact was negligible.

Keywords: Pesticides; Surface water; Risk assessment; Azinphos-methyl; Carbaryl

INTRODUCCIÓN

El potencial contaminante de un plaguicida depende tanto de sus propiedades toxicológicas como de las concentraciones ambientales. En el compartimento acuático de la cuenca del Río Negro se han reportado residuos de plaguicidas en agua superficial y en agua subterránea (1-3). Respecto de las características regionales, el agua superficial muestra una significativa capacidad de recuperación debido al alto caudal y turbulencia de los ríos lo cual genera un importante proceso de oxigenación y dilución. Además, el alto nivel de heliofanía en el área favorece la ruptura química y fotolítica e incrementa la actividad de los organismos acuáticos. Esta

situación se torna menos favorable en las pequeñas corrientes de agua como los canales de drenaje. Otro compartimento incluido en esta evaluación, a modo de parámetro comparativo, es el correspondiente a las descargas agroindustriales, aunque por cierto no se espera que ningún organismo se desarrolle en ese medio. Aunque en nuestra región sólo se han registrado unos pocos episodios de intoxicación aguda con especies silvestres y población de peces, es recomendable evaluar si existe algún nivel de riesgo para las especies acuáticas. Si a través del presente estudio se confirma un efecto potencial será factible efectuar un llamado de atención temprano.

Se presenta un diagnóstico preliminar acerca del impacto causado por la actividad agroindustrial en recursos acuáticos locales, siguiendo un procedimiento ordenado de compilación, edición e interpretación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del sitio

El Alto Valle del Río Negro es una región irrigada de aproximadamente 70 mil hectáreas donde se producen fundamentalmente peras y manzanas. Con relación a esta actividad, más de veinte ingredientes activos se introducen intencionalmente en el medio ambiente para el control de plagas. El sistema bajo estudio comprende una sección del Río Negro, cercana a un área agrícola, con varios canales de drenaje que la atraviesan, desembocando en el río. A su vez estos canales son receptores de varios efluentes agroindustriales.

Hábitat acuático

El Río Negro nace de la unión de dos ríos de montaña, Limay y Neuquén. La comunidad béntica invertebrada en esta cuenca muestra los mismos grupos tróficos que en otros ríos templados (4).

El número de especies decrece desde la parte alta hacia el sitio en estudio, fundamentalmente por cambios del clima y la vegetación. Veintinueve especies fueron identificadas como exclusivas de la parte alta, 27 del área media y ninguna especie en particular pertenecía a la cuenca baja (5).

Predicción de las concentraciones ambientales

El modelo de "screening" GENEEC (6) fue aplicado para obtener una estimación preliminar de la concentración de plaguicidas en agua para metil azinfos y carbaril, compuestos detectados previamente como residuos en diferentes compartimentos acuáticos del área estudio.

Colección de datos toxicológicos

Se compilaron datos de literatura (7) y datos toxicológicos locales para los plaguicidas en uso, incluyendo un amplio rango de organismos acuáticos o aquellos que tuvieran por lo menos un estadio de vida en el agua. Los organismos sensibles fueron ordenados por grupos taxonómicos; se promedió la CL 50 (concentración letal 50), se calculó la desviación estándar (DS) y se informó el número de datos

incluidos. En todos los casos se seleccionaron aquellos experimentos llevados a cabo en estadios de desarrollo temprano.

Procedimiento de evaluación de riesgo

Se realizó un procedimiento escalonado en concordancia con el descrito en el documento Guía Técnica de Evaluación de Riesgo de la U.S. EPA (8). Se desarrolló un modelo conceptual considerando los agentes perturbadores, fuentes identificadas, posibles interacciones y potencial impacto en el ambiente acuático. Los datos de CL 50 fueron correlacionados con la concentración de residuos en el medio acuático; inicialmente con las concentraciones estimadas por GENEEC y después con las concentraciones reales obtenidas por el análisis de plaguicidas en agua. El coeficiente de riesgo (CR) fue calculado como el cociente entre la concentración máxima de plaguicida y los valores de CL 50 ($CR = \text{concentración de plaguicidas en agua} / CL\ 50$). El criterio de decisión elegido para cada tóxico ($CR < 0,1$) fue adoptado para identificar claramente aquellos plaguicidas con mínimo efecto ecológico. Aquellos plaguicidas que cumplen con esta regla de decisión se considera que presentan la mínima toxicidad aguda sobre los organismos acuáticos (9). Se ordenaron las especies (n) con respecto a su CL 50 creciente para cada plaguicida. Se les asignó un número de orden (i), se calculó el percentilo ($\text{percentilo} = i/(n+1)$) y a partir de él se derivó el porcentaje de especies afectadas.

El procedimiento presentó ciertas limitaciones al considerar el impacto sobre organismos individuales sin tener en cuenta niveles de organización mayores. Así mismo cada agente se evaluó individualmente, sin considerar efectos sinérgicos y los efectos crónicos y subletales no fueron considerados.

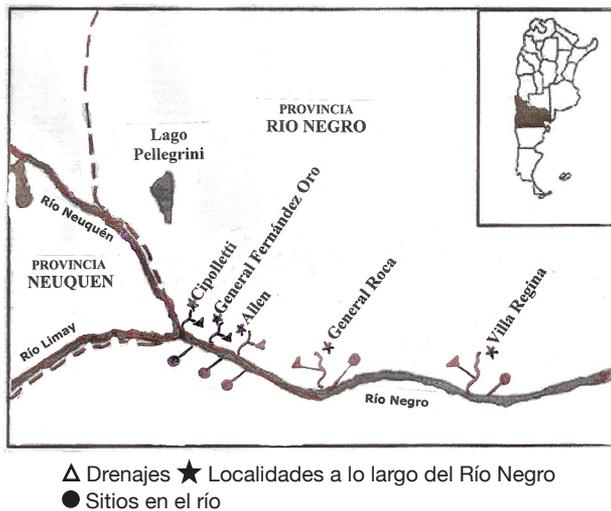
Diseño de muestreo

La intención del plan de muestreo fue cubrir el peor escenario, considerando el período de mayor actividad agroindustrial y aquellas localizaciones más influenciadas por las descargas industriales.

Los plaguicidas investigados en muestras de agua de río y canales de desagüe fueron organofosforados, conocidos como de uso frecuente en el área estudiada. La difenilamina, antiescaldante, también fue analizada como producto representativo de la aplicación postcosecha. Cinco sitios se muestrearon en cana-

les de drenaje y cinco en río, aguas abajo de cada desagüe. Una muestra adicional se tomó en el río aguas arriba de la zona en estudio, como puede verse en la *Figura 1*. Los muestreos se llevaron a cabo en marzo-abril durante dos años consecutivos. Adicionalmente, datos del contenido de plaguicidas en los efluentes agro industriales fueron evaluados retrospectivamente, con el fin de usarlos comparativamente como indicadores del mayor nivel de polución esperado.

Figura 1. Localización geográfica y sitios de muestreo



Métodos analíticos

Las muestras fueron analizadas por extracción líquido-líquido (cloruro de metileno) y cuantificadas por cromatografía gaseosa (Agilent 6890, NPD). Los límites de detección fueron

0,1 µg/L y 1 µg/L para aguas de río/desagües y efluentes industriales respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las predicciones de concentración máxima obtenidas con la aplicación del GENECC fueron de 29,02 µg/L y 78,38 µg/L para metil azinfos y carbaril, respectivamente. Estos valores son, con respecto a las concentraciones reales detectadas en el río, por lo menos diez veces mayores para metil azinfos y cuatro veces mayores para carbaril, discrepancia que puede ser atribuida a las características conservativas del modelo. Aunque un modelo es una herramienta para evaluar hipótesis alternativas, no puede ser considerado como una hipótesis en sí misma (10).

Considerando los resultados estimados por el modelo, se tomó la decisión de monitorear el río y los drenajes, teniendo como objetivo evaluar la concentración de los plaguicidas y su frecuencia de detección en el peor escenario seleccionado. Los resultados confirmaron la hipótesis que las descargas de efluentes contribuyen a la contaminación del agua superficial con residuos químicos aplicados en la agricultura y lavados de las frutas durante el proceso industrial, encontrándose una disminución en la concentración de plaguicidas desde los efluentes, pasando por los desagües hasta el río, debido a procesos de dilución consecutivos (*Tabla 1*). Las concentraciones y frecuencias de detección en drenajes y río mostraron un aumento en el segundo año en coincidencia con un leve aumento en las cantidades vendidas en ese período.

Tabla 1. Concentraciones máximas y frecuencias de detección de distintos plaguicidas en: río, drenajes y descargas de efluentes.

COMPUESTOS	RÍO				CANALES DE DRENAJE				DESCARGA EFLUENTES	
	Año 1		Año 2		Año 1		Año 2		Max	Frec
	Max	Frec	Max	Frec	Max	Frec	Max	Frec		
(µg/L)	(%)	(µg/L)	(%)	(µg/L)	(%)	(µg/L)	(%)	(µg/L)	(%)	
difenilamina	0,386	10	0,448	30	6,614	25	8,886	37,5	99,1	61,9
carbaril	ND	0	0,394	10	5,619	62,5	9,009	62,5	0,93	29,6
dimetoato	ND	0	ND	0	0,243	25	ND	0	ND	ND
fosmet	ND	0	ND	0	0,317	50	ND	0	0,83	46,5
m azinfos	0,193	30	1,19	50	0,906	100	1,774	50	2,05	77,5

Max: Concentración máxima detectada; Frec: frecuencia de detección. Datos de río y drenajes obtenidos en Marzo-Abril/2001- 2002. Datos de efluentes obtenidos en Marzo-Abril/2000.

Tabla 2. Resumen de evaluación de riesgo: metil azinfos.

METIL AZINFOS	Río 2001	Río 2002	Drenaje 2001	Drenaje 2002	Descarga de efluentes
Mínimo nivel detectado (ug/L)	ND	ND	0,201	ND	ND
Sin acuerdo con CR (MIN) < 0,1 (% de especies)	< 7,99	< 7,99	15,52	< 7,99	39,66
Máximo nivel detectado (ug/L)	0,193	1,19	0,906	1,774	2,05
Sin acuerdo con CR (MAX) < 0,1 (% de especies)	13,26	37,0	30,61	42,04	100

CR: Coeficiente de riesgo; (MIN) Calculado con las mínimas concentraciones detectadas en el compartimento analizado; (MAX) Calculado con las máximas concentraciones detectadas en el compartimento analizado; ND: No detectado, concentración menor a 0,1 µg/L.

Se obtuvieron datos de base temporal a través de un muestreo realizado durante la estación de “no aplicación”, cuando las industrias locales tienen actividad mínima. En este caso, las concentraciones se mantuvieron por debajo del límite de detección. Con respecto a la evaluación de riesgo, las *Tablas 2 y 3* ilustran un resumen de los resultados obtenidos, clasificados por tipo de compartimento y período para metil azinfos y carbaril.

En el caso del metil azinfos la fracción de especies susceptibles de ser dañadas aumentó de un año al otro de acuerdo a las mayores concentraciones halladas en el proceso de monitoreo, observándose en el segundo año una afectación del 37 y 42% en ríos y canales respectivamente. Las especies afectadas pertenecen a peces, zooplancton, insectos y crustáceos. El percentilo fue calculado sobre un total de 57 especies.

Tabla 3. Resumen de evaluación de riesgo: carbaril.

CARBARIL	Río 2001	Río 2002	Drenajes 2001	Drenajes 2002	Descarga de efluentes
Mínimo nivel detectado (ug/L)	ND	ND	ND	ND	ND
Sin acuerdo con CR (MIN) < 0,1 (% de especies)	< 0,65	< 0,65	< 0,65	< 0,65	<0,65
Máximo nivel detectado (ug/L)	ND	0,394	5,619	9,009	0,93
Sin acuerdo con CR (MAX) < 0,1 (% de especies)	< 0,65	0,65	13,73	13,73	70,59

CR: Coeficiente de riesgo; (MIN) Calculado con las mínimas concentraciones detectadas en el compartimento analizado; (MAX) Calculado con las máximas concentraciones detectadas en el compartimento analizado; ND: No detectado, concentración menor a 0,1 µg/L.

Para el carbaril, no se observaron cambios significativos entre los 2 períodos. Si bien la concentración se duplicó de un año a otro, sólo una especie se incluye en ese segmento particular incrementando muy levemente el percentilo. Los coeficientes de riesgo para los demás plaguicidas estudiados fueron siempre menores que el criterio seleccionado ($CR < 0,1$), lo que significa un mínimo riesgo agudo para los organismos acuáticos (datos no mostrados). Se construyó un gráfico de Distribución de Especies Sensibles (11) para los 2 plaguicidas en estudio, distribución estadística estimada de una muestra de datos toxicológicos y visualizada como una función de distribución acumulativa (Figura 2). Ambos plaguicidas han sido identificados como los de mayor probabilidad de producir efectos agudos en las especies más sensibles. Este gráfico puede ser usado para visualizar rápidamente el número de es-

pecies que pueden ser afectadas por un determinado nivel de tóxico encontrado en un dado compartimento acuático y también puede ser aplicado para calcular la concentración para la cual una específica proporción de especies puede sufrir efectos tóxicos directos, en referencia a la concentración de riesgo (12).

CONCLUSIONES

Este estudio presenta una evaluación de riesgo basada en la información de exposición obtenida del modelo de screening, la concentración real de los compuestos en el agua superficial y la toxicidad de las sustancias, representada por su CL 50. El primer paso del procedimiento escalonado permitió la predicción de concentraciones en agua, de los plaguicidas más usados en la región. La caracterización de las fuentes de contaminación no puntuales es compleja, debido a la dispersión difusa y episódica,

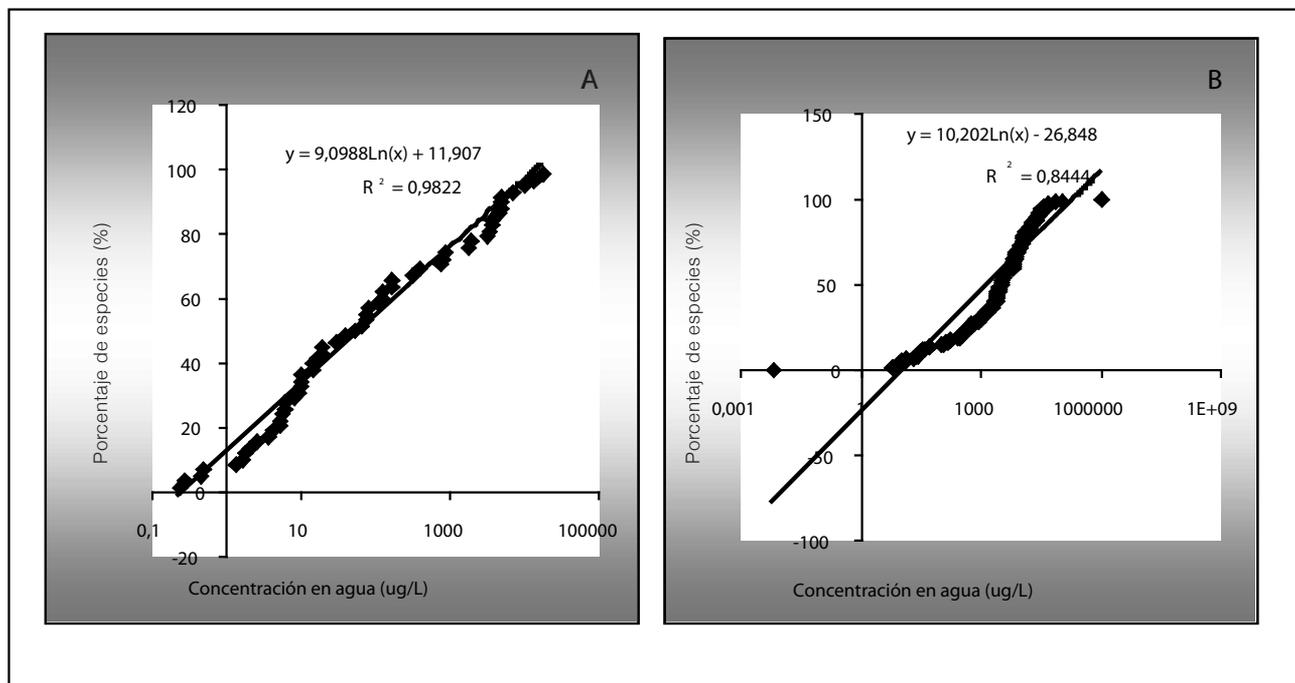


Figura 2. Distribución de Especies Sensibles A: Toxicidad Aguda: metil azinfos B: Toxicidad Aguda: carbaril
 Porcentaje de especies afectadas = $i \times 100 / (n+1)$
 i = número de orden de las especies listadas de acuerdo a su CL 50 creciente. n = número total de especies.

y a menudo la estandarización de los puntos y tiempos de muestreos no simulan adecuadamente la aplicación intermitente de los residuos químicos. Sin embargo, las estimaciones alcanzadas acordaron razonablemente bien con los resultados químicos, pudiéndose atribuir la discrepancia a las características conservativas del modelo GENECC.

El siguiente paso fue relacionar los datos de toxicidad con los riesgos ambientales. Por lo menos 2 insecticidas, carbaril y metil azinfos fueron potencialmente capaces de afectar la supervivencia de algunas especies en el Río Negro y en los drenajes adyacentes. Otros contaminantes, tales como dimetoato, fosmet y difenilamina, fueron menos peligrosos para las

especies acuáticas, teniendo en cuenta su concentración y toxicidad en el ambiente acuático. Los desbalances en el ecosistema podrían ocurrir cerca de las descargas de los drenajes. Dado que no viven especies endémicas en la región estudiada, las especies afectadas pueden ser reincorporadas con el flujo permanente del río, sin riesgo de extinción o destrucción de la cadena trófica. Sin embargo, no puede desprejiciarse que las condiciones hidrogeológicas podrían cambiar en el tiempo, la biodisponibilidad de los contaminantes puede ser alterada y así variar su efecto sobre el sistema.

El desarrollo agrícola, forestal y urbano es esencial para el estilo de vida humano, en consecuencia se requiere la caracterización y manejo de los polutantes para garantizar la coexistencia del desarrollo de la tierra y la preservación del ecosistema acuático.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Natale, O.; Gómez, C.; Vermeulen, J.; Casamiquela, C.; D'Angelo, A.M.; Loewy, R.; Alcalde, R.; Vernier, B.; Schultz, F.; Cardot, L. (1995). Anexo 2, Estudio de caso: Plaguicidas en el Río Negro, Argentina. En: Manual de Evaluación y Manejo de sustancias tóxicas en aguas superficiales, 5409/C44/40272; CEPIS-OPS-INCYTH.
2. Loewy, R.M.; Kirs, V.; Carvajal, G.; Venturino, A.; Pechén de D'Angelo, A. (1999). Groundwater contamination by azinphos-methyl in the Northern Patagonic Region. *Sci. Total Environ.* 225, 211-218.
3. Loewy, R.M.; Carvajal, L.G.; Novelli, M.; Pechén de D'Angelo, A.M. (2003). Effect of Pesticide Use in Fruit Production Orchards on Shallow Ground Water. *J. Environ. Sci. Health.* B38 (3), 317-325.
4. Maltby, L.; Blake, N.; Brock, T.C.M.; Van den Brink, P.J. (2005). Insecticide species sensitivity distributions: The importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 379-388.
5. Wais, I.R. (1990). Lista de los macroinvertebrados bentónicos de la cuenca del Río Negro, Patagonia, Argentina; incluyendo observaciones sobre grupos tróficos. *Acta Limnol. Brasil.* III, 829-845.
6. US Environmental Protection Agency. Water models: GENECC2 Generic Estimated Environmental Concentration [en línea] <http://www.epa.gov/oppefed1/models/water> (consulta Octubre 2005).
7. Kegley, S.E.; Hill, B.R.; Orme, S.; Choi, A.H. PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, San Francisco (CA) North America [en línea] <http://www.pesticideinfo.org> (consulta: Octubre 2008).
8. US Environmental Protection Agency. Guidelines for Ecological Risk Assessment. [en línea] <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm> (consulta: Septiembre 2006).
9. Urban, D.J.; Cook, N.J. (1986). Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Ecological Risk Assessment, U.S. EPA Publication 540/09-86/167.
10. Glaser, D.; Bridges, T. (2007). Separating the wheat from the chaff: The Effective Use of Mathematical Models as Decision Tools. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 3(3), 442-449.
11. Brock, T.; Gertie, H.P.; Maltby, L.; Van den Brink, P. (2006). Aquatic Risk of Pesticides, Ecological Protection Goals, and Common Aims in European Union Legislation. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2(4), 20-46.
12. Aldenberg, T.; Jaworska, J. (2000). Uncertainty of the hazardous concentration and fraction affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 1-18.

www.bago.com



Cuidados Intensivos

En Laboratorios Bagó trabajamos intensamente en la investigación y desarrollo de medicamentos, aportando máxima calidad y efectividad terapéutica para la Argentina y el mundo.

 **Bagó**

É T I C A A L S E R V I C I O D E L A S A L U D

ALTERACIONES DEL DESARROLLO EMBRIONARIO, POLIAMINAS Y ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDOS POR PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN *Rhinella arenarum*

Lascano, Cecilia Inés; Sotomayor, Verónica; Ferrari, Ana; Venturino, Andrés*.

LIBIQUIMA, Instituto Multidisciplinario de Investigación y Desarrollo de la Patagonia Norte (IDEPA) - CONICET - Universidad Nacional del Comahue - Buenos Aires 1400. Neuquén (8300), Argentina.

*Autor a quien dirigir la correspondencia: aventu1@yahoo.com.ar

Resumen: ALTERACIONES DEL DESARROLLO EMBRIONARIO, POLIAMINAS Y ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDOS POR PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN *Rhinella arenarum*. Cecilia Inés Lascano; Verónica Sotomayor; Ana Ferrari; Andrés Venturino. *Acta Toxicol. Argent. (2009) 17 (1): 8-19*. Los plaguicidas organofosforados (OP) son masivamente aplicados en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, afectando al ecosistema. Utilizamos un modelo embrionario de anfibios (*Rhinella arenarum*) para estudiar mecanismos por los cuales OP como metilazinfos (MA) y clorpirifos (CP) podrían provocar teratogénesis. Los embriones fueron desarrollados en diferentes concentraciones de MA o CP hasta opérculo completo (OC), analizando: malformaciones, histología, glutatión reducido (GSH) y enzimas antioxidantes, poliaminas, actividad de ornitina-decarboxilasa (ODC) y proteína-quinasa-C (PKC).

Ambos OP provocaron un incremento tiempo/concentración-dependiente de malformaciones, llegando a 100% de teratogénesis en estadios avanzados y a las mayores concentraciones, incluyendo: exogastrulación, curvaturas de aleta caudal, acortamiento axial, edema, y atrofia branquial. Se evidenció una condición de estrés oxidativo creciente: las enzimas GSH-dependientes (S-transferasa (GST), peroxidasa y reductasa) fueron inducidas tempranamente a bajas concentraciones, pero inhibidas en el estadio de OC a altas concentraciones, junto con una caída significativa de GSH (62%) para MA. MA incrementó significativamente (18X) la actividad de ODC en OC, aumentando los niveles de putrescina (60%) pero disminuyendo espermidina (56%) y espermina (100%); CP disminuyó en estadios tempranos la actividad de ODC y niveles de poliaminas.

La disminución de poliaminas podría deberse al incremento de degradación por poliamino-oxidasa, contribuyendo al estrés oxidativo inducido por OP. Esto causaría la disminución de GSH, y la activación de PKC en OC (55%), que participaría en el control positivo de GST y ODC. Finalmente, el estrés oxidativo y la disminución en los niveles de poliaminas podrían ser causantes de alteraciones del desarrollo embrionario.

Palabras clave: Teratogénesis; Anfibios; Plaguicidas; Biomarcadores

Abstract: ALTERATIONS IN EMBRYONIC DEVELOPMENT, POLYAMINES AND OXIDATIVE STRESS INDUCED BY ORGANOPHOSPHATES IN *Rhinella arenarum*. Cecilia Inés Lascano; Verónica Sotomayor; Ana Ferrari; Andrés Venturino. *Acta Toxicol. Argent. (2009) 17 (1): 8-19*. Organophosphate (OP) pesticides are widely applied in the region of Alto Valle de Río Negro y Neuquén, affecting the ecosystem. We use an amphibian embryonic model (*Rhinella arenarum*) in order to assess the mechanisms by which the OP pesticides azinphos methyl (AM) and chlorpyrifos (CP) could cause teratogenesis. The embryos were developed in different concentrations of AM or CP until they reached the stage of complete operculum (CO). We analyzed malformations, histology, reduced glutathione content (GSH) and activity of antioxidant enzymes, polyamine content, ornithine decarboxilase (ODC) and protein kinase C (PKC) activities.

Both OP pesticides caused a time- and dose-dependent increase in the number of malformations, reaching 100% teratogenesis in late embryonic development at the highest OP concentrations used. Malformations assessed include exogastrulation, caudal fin curvature, axial shortening, edema, and gill atrophy. Increasing evidence of oxidative stress was observed: GSH dependent enzymes (S-transferase, GST; peroxidase and reductase) were early induced in embryos exposed to low concentrations of the OP pesticides, but their activities were inhibited in the stage of CO at high concentrations of OP. These changes were accompanied by a significant decrease in GSH content (62%) in embryos exposed to AM. Besides, AM significantly increased (18X) ODC activity in the stage of CO, along with putrescine levels (60% of increase) but spermidine and spermine levels were significantly decreased (56% and 100%, respectively). The OP pesticide CP caused an early decrease in ODC activity and polyamine levels.

The decrease in polyamine levels could be due to an increase in their degradation by polyamine oxidase, contributing to the oxidative stress induced by OP. This, in turn, would cause the decline in GSH levels and the activation of PKC in the embryonic stage of CO (55%), which is involved in the positive feedback of GST and ODC. Finally, the oxidative stress and the decrease in PA levels could be the cause of the observed embryonic alterations.

Keywords: Teratogenesis; Amphibians; Pesticides; Biomarkers

INTRODUCCIÓN

El sapo común *Rhinella arenarum* (anteriormente *Bufo arenarum*, Hensel) es una especie ampliamente distribuida en Argentina. Al igual que otros anuros, se encuentra ubicado estratégicamente en la cadena trófica y es sensible a la contaminación ambiental durante su desarrollo embrionario y larval, periodos en los que su hábitat es acuático (1). *R. arenarum* se encuentra amenazado en zonas de intensa actividad frutícola como consecuencia de la contaminación acuática por aplicación masiva de plaguicidas organofosforados (OP) (2). Particularmente, metilazinfos (MA) es el principal OP aplicado en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén, tanto en la frecuencia de aplicación (cada 15 días en el período productivo; 0,7 kg por hectárea) como en la cantidad empleada, alcanzando un total de 600 toneladas de MA pulverizadas sobre 200.000 ha por año (3). Por otra parte, 22,5 toneladas del OP clorpirifos (CP) son aplicadas anualmente a razón de 0,72 kg por ha. MA y otros OP han sido detectados en aguas subterráneas y superficiales del valle (2,4). Por lo tanto, por efecto de la deriva y el escurrimiento, dichos plaguicidas podrían afectar la fauna acuática que habita los cuerpos de agua de la región como estadios larvales de *R. arenarum* (5).

Las especies reactivas del oxígeno (EROs) son producidas constantemente en animales aeróbicos durante su metabolismo normal y participan en el control fisiológico de diversas funciones celulares. La exposición a contaminantes ambientales como plaguicidas y otros químicos pueden aumentar la producción de EROs y afectar el estado redox normal de la célula (6). El sistema antioxidante comprende un grupo de enzimas y compuestos antioxidantes de bajo peso molecular como vitamina E, ácido ascórbico, GSH y otros tioles no proteicos (7). Entre las enzimas, la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) constituyen la primera línea de defensa antioxidante. Además, las enzimas dependientes de GSH participan en la detoxificación y los procesos antioxidantes. Entre ellas se encuentran las GSH peroxidasas dependientes o no de Se (GPox), la GSH-reductasa (GR) y las GSH-transferasas (GST). Además de su papel como co-sustrato de las enzimas dependientes de GSH, este tripéptido actúa como barrador de EROs contribuyendo al control del estado redox celular (8). GSH se encuentra en altas concentraciones dentro de la mayoría de las células y participa de diversas reacciones metabólicas (9). Se ha infor-

mado que una disminución del 20-30% en los niveles de GSH podría afectar la respuesta antioxidante y conducir al daño oxidativo y muerte celular (10,11). Las defensas antioxidantes son esenciales durante el desarrollo embrionario (12-14), ya que el aumento de EROs podría alterar el desarrollo normal y conducir a la aparición de malformaciones (15,16). En embriones de la rana africana, *Xenopus laevis*, las enzimas dependientes de GSH aumentan su actividad en respuesta a la exposición al aire y a la luz luego de la eclosión de los embriones, momento a partir del cual el riesgo de exposición a contaminantes ambientales también se incrementa (13). Diversas líneas demuestran que contaminantes agroquímicos podrían actuar como pro-oxidantes, generando EROs y afectando la actividad de las enzimas del sistema antioxidante (17-21). Además de su acción anticolinesterásica, los plaguicidas OP son capaces de inducir estrés oxidativo y/o alterar la respuesta antioxidante de diferentes especies acuáticas (21-23). La detoxificación de MA y otros OP conduce al consumo de glutatión reducido (GSH) debido a la actividad de glutatión-S-transferasas (GST) (11), enzimas que resultan inducidas por compuestos electrofílicos. La actividad de proteína quinasa C (PKC) se incrementa por estos compuestos, fosforilando y activando al factor Nrf2, el cual incrementa la transcripción de GST (24,25). Por lo tanto, el estudio de las defensas antioxidantes de *Rhinella arenarum* es importante a fin de comprender los efectos subletales que surgen de la exposición a plaguicidas y que contribuyen al declinamiento de las poblaciones de anfibios. Por otra parte, entre los factores involucrados en el desarrollo normal y patológico, se ha demostrado la importancia fundamental de las poliaminas (PAs) (26-28). Los niveles alterados de PAs han sido relacionados con el cáncer y la respuesta a toxicidad (29,30). La degradación oxidativa de PAs por poliamino oxidasa (PAO) y diamino oxidasa (DAO) genera metabolitos tales como H₂O₂ y acroleína, involucrados en el estrés oxidativo (31,32). A su vez, los niveles de PAs son regulados en el primer paso biosintético a través de la actividad de la enzima clave ornitina descarboxilasa (ODC), que se encuentra a su vez altamente regulada por diversos factores de crecimiento a nivel transcripcional, traduccional, postraduccional y degradación dirigida por antizima (28,33,34). Las PAs intracelulares participan prácticamente en todos los niveles de regulación.

Se ha descrito la interacción tóxica entre el insecticida OP malatión y PAs exógenas en el sapo común *Rhinella (Bufo) arenarum* (35), hallando efectos sobre los niveles endógenos de éstas, la actividad de esterasas y estrés oxidativo (10,36). Sin embargo, no han sido aún dilucidados los mecanismos de acción de OP sobre la síntesis y degradación de PAs. Es importante además evaluar el impacto de OP sobre la regulación de ODC, ya que los xenobióticos desencadenan la regulación de diversos genes en respuesta al estrés (24,25,37), incluido el gen de ODC (38,39). Por lo tanto, el propósito del presente trabajo fue evaluar el impacto de los insecticidas organofosforados en embriones de *Rhinella arenarum* analizando alteraciones en el desarrollo embrionario y diversos factores que afectan el mismo, como: el metabolismo de PAs, el sistema antioxidante y PKC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y exposición de embriones de *Rhinella arenarum*

La ovulación de hembras de *R. arenarum* se indujo por inyección de 2500 UI de gonadotropina coriónica humana. Los ovocitos obtenidos se fertilizaron *in vitro* con homogenado de testículo. Los embriones fueron expuestos de manera continua a los plaguicidas OP desde fertilización, sin retirar su cubierta gelatinosa, hasta el último estadio embrionario de opérculo completo (OC) en recipientes de vidrio. Se mantuvo una relación de 1 embrión/mL medio Ringer de anfibios para los controles o medio Ringer más plaguicida para los expuestos. Se realizaron soluciones estándar de ambos plaguicidas en acetona. La concentración final del solvente en la solución de ensayo no fue mayor a 0,3%. Las concentraciones de metilazinfos (MA) ensayadas fueron 0,5 mg/L, 2 mg/L y 9 mg/L (CL₅₀ 96 h: 15,57 mg/L) (40), y las de clorpirifos (CP) fueron 2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L y 16 mg/L (CE₅₀ 48 h para arresto embrionario: 24 mg/L). Se utilizó un esquema semi-estático, con renovación de la solución de plaguicida cada 48 h. El desarrollo de los embriones se monitoreó bajo lupa estereoscópica y se determinaron los estadios embrionarios de acuerdo a Del Conte y Sirlin (41). Se tomaron muestras en los estadios de brote caudal (BC), boca abierta (BA) y OC, que corresponden a 4, 7 y 10 días de desarrollo respectivamente. Cada muestra consistió en 50 embriones (en el estadio de BC) o 25 embriones (en los estadios

más avanzados) por mL de buffer de homogenado (buffer fosfato de potasio 143 mM pH 7,4 más 6,3 mM EDTA). Las muestras se tomaron al menos por duplicado de cada tratamiento, en cada experimento independiente. La actividad de enzimas antioxidantes se determinó en sobrenadante de 10000 x g, realizándose por triplicado la determinación para cada muestra. Para la determinación de PKC se tomaron 50 embriones OC en 1 mL de buffer Tris 20 mM pH 7,4 más EDTA 2 mM y EGTA 2 mM, y se utilizó el sobrenadante de 1000 x g. Se realizaron dos experimentos independientes con tratamientos por duplicado. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada muestra.

Monitoreo de malformaciones en embriones de *R. arenarum* expuestos a MA

Se determinó el porcentaje de embriones malformados en cada estadio y se documentaron los defectos morfológicos encontrados.

Determinación de la actividad de enzimas del sistema antioxidante en embriones expuestos a MA

La actividad de las enzimas involucradas en la reducción de hidroperóxidos: CAT (14,42,43) y GPox Se-dependiente (14,44,45); en el metabolismo de glutatión: GR (14,46); y en la detoxificación de xenobióticos, GST (14,47), se determinó por métodos espectrofotométricos cinéticos.

Determinación del contenido de glutatión reducido (GSH) en embriones expuestos a MA

El contenido de GSH se determinó como tioles ácido-solubles (10,14) en homogenado completo.

Determinación de niveles de poliaminas (PAs) en embriones expuestos a MA y CP

Se prepararon los derivados dansilados de las PAs putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm), y se determinaron sus niveles por HPLC en fase reversa (48).

Determinación de la actividad enzimática de Ornitina Descarboxilasa (ODC) en embriones expuestos a MA y CP

La actividad de ODC se determinó utilizando ¹⁴C-Ornitina como sustrato para monitorear la reacción de decarboxilación. El ¹⁴CO₂ liberado por la actividad de ODC presente en la muestra fue atrapado en un papel de filtro embebido en KOH 2M. Dicho papel se transfi-

rió a un vial y se llevó a contador de centelleo líquido (49).

Análisis inmunohistoquímico de ODC en embriones expuestos a MA

Se analizó la presencia y distribución embrionaria de la proteína ODC por métodos inmunohistoquímicos descritos para larvas de *R. arenarum* por Yovanovich et al. (50). Se utilizó un anticuerpo primario de conejo contra ODC humana (Santa Cruz Biotechnology; ODC (H-71) sc-33539) y un anticuerpo secundario biotinilado anti IgG de conejo, seguido del agregado de estreptavidina-peroxidasa de rábano. El revelado de los cortes se realizó utilizando diaminobencidina.

Actividad de proteína-quinasa C (PKC) en embriones expuestos a MA

La actividad de proteína-serina/treonina-quinasa basal y PKC se realizó en sobrenadante de 1000 x g de embriones en OC (51,52). Se utilizó histona como sustrato, en presencia o no de diacil glicerol/fosfatidil serina y Ca^{2+} como activador específico para PKC, y se inició la reacción con $^{32}P\gamma$ ATP. Se terminó la reacción con ácido fosfórico en papel de fosfoceulosa. Se midió la radioactividad de histona fosforilada por centelleo líquido.

Análisis estadístico

Se realizaron al menos dos experimentos independientes para cada estudio, a partir de ovulaciones distintas, en los cuales cada tratamiento se realizó por duplicado, excepto para el análisis de mortalidad y malformaciones donde se realizaron triplicados. Los datos se analizaron por ANOVA seguido de Fisher LSD como test a posteriori. Para los datos de porcentaje de malformaciones se realizó previamente una transformación arcsen (raíz cuadrada (porcentaje/100)).

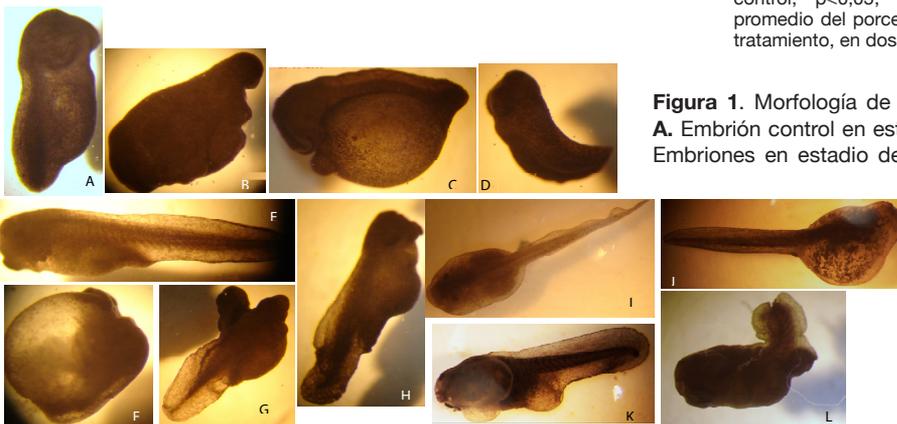


Figura 1. Morfología de embriones de *R. arenarum* expuestos a MA. **A.** Embrión control en estadio de respuesta muscular (4 días). **B, C, D.** Embriones en estadio de respuesta muscular expuestos a 0,5, 2 y 9 mg/L MA, respectivamente. **E.** Embrión control en estadio de circulación en aleta caudal (7 días y medio). **F, G, H.** Embriones en estadio de circulación en aleta caudal expuestos a 0,5, 2 y 9 mg/L MA, respectivamente. **I.** Embrión control en estadio de opérculo completo (10 días). **J, K, L.** Embriones en estadio de opérculo completo expuestos a 0,5, 2 y 9 mg/L MA, respectivamente.

RESULTADOS

Monitoreo de malformaciones en embriones de *Rhinella arenarum*

El porcentaje de embriones malformados se incrementó significativamente en embriones expuestos a 2 mg/L y 9 mg/L MA (Tabla 1), tanto en el estadio de BA como en el de OC. Se alcanzó un 100% de embriones malformados en OC debido a que todos se encontraban arres-tados en el desarrollo. Bajas concentraciones de CP no causaron un incremento significativo del número de malformaciones, mientras que 16 mg/L (valor cercano a la CL_{50}) produjo malformaciones significativas desde BC, llegando al 100% en OC. Entre las malformaciones y defectos del desarrollo se observaron: arresto del desarrollo en estadios tempranos con exogastrolución y profusa descamación celular, atrofia, protuberancias notorias en el cuerpo que alteraron la movilidad, desbalance hídrico con desarrollo de hidropesía con distintos grados de severidad, alteraciones de la aleta caudal, etc. (Figuras 1 y 2). La exposición al plaguicida MA incrementó la frecuencia de aparición de dichas situaciones.

Tabla 1. Porcentaje de malformaciones en embriones de *R. arenarum* expuestos a MA o CP.

Tratamiento	%Emb Malformados/Total Emb vivos		
	BC	BA	OC
Control	6	9	15
MA 0,5mg/L	2	9	15
MA 2mg/L	2	17*	27*
MA 9mg/L	2	16*	100*
CP 2mg/L	8		
CP 4mg/L	8		
CP 8mg/L	11		
CP 16mg/L	18*	82**	100**

Los asteriscos denotan diferencias significativas con el correspondiente control; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Los valores informados corresponden al promedio del porcentaje de malformaciones obtenido de triplicados de tratamiento, en dos experimentos independientes.

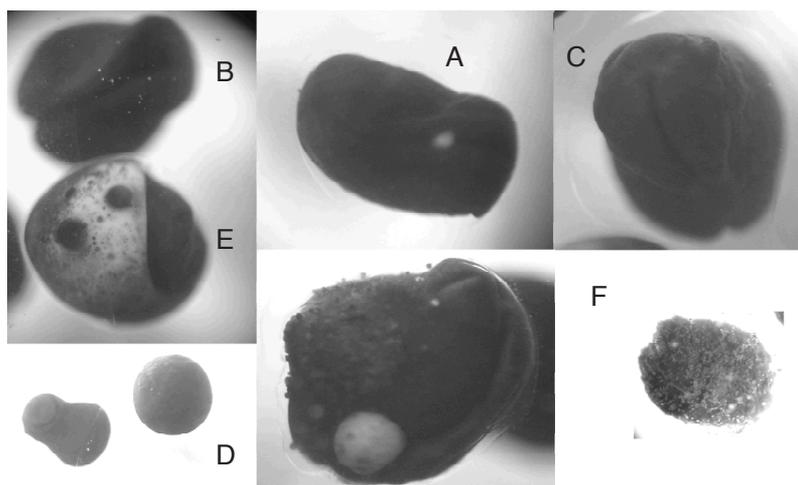


Figura 2. Malformaciones en embriones de *R. arenarum* en estadio de brote caudal expuestos a 16 mg/L CP desde fertilización. **A.** Control; **B-F.** Expuestos a CP.

En la *Figura 3* se muestran cortes transversales de embriones de *R. arenarum* en estadio de BC. Los embriones expuestos a CP poseen una mayor masa vitelina endodérmica, un ar-

quenterón (intestino primitivo) de reducidas proporciones, primordios pronéfricos de gran tamaño, y alteración de somitas, entre otros.

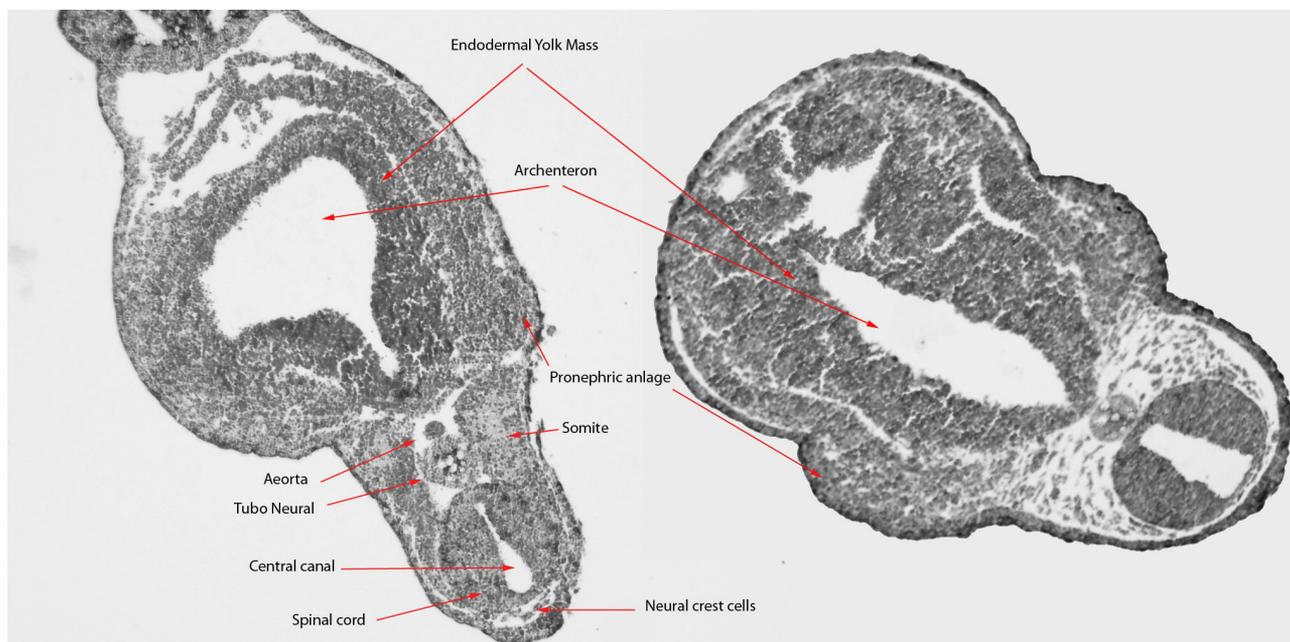


Figura 3. Histología de embriones de *R. arenarum* en estadio de BC en embriones control (izquierda) y embriones expuestos a 2 mg/L CP (derecha).

Efecto del plaguicida MA sobre el sistema antioxidante

Se procedió a la determinación del contenido de GSH y de la actividad de las enzimas CAT, GST, GR y Gpox Se-dep en embriones de *R. arenarum*. El contenido de GSH se incrementó en los controles a lo largo del desarrollo em-

brionario de *R. arenarum* (*Tabla 2*), y la exposición al plaguicida OP MA causó una tendencia al incremento a bajas concentraciones de MA y una caída en sus niveles cuando los embriones fueron expuestos a 9 mg/L (53% y 45% de disminución en los estadios de BA y OC respectivamente).

Tabla 2. Niveles de GSH (nmol/mg prot) en embriones de *R. arenarum* expuestos en forma continua a MA.

GSH (nmol/mg prot)	BC	BA	OC
Control	0,99±0,017	2,18±0,67	3,21±1,36
MA 0.5mg/L	1,67±0,49	2,43±0,34	3,62±0,73
MA 2mg/L	1,64±0,075	3,71±1,14	2,64±0,082
MA 9mg/L	1,37±0,33	1,01±0,005	1,77±0,11

Los valores informados corresponden a la Media ± ES de dos experimentos independientes, con tratamientos realizados por duplicado.

Tabla 3. Actividad de CAT, GPox Se-dep, GST y GR en embriones expuestos en forma continua a MA.

BC	CAT (UI/mg prot)	GST (mUI/mg prot)	GR (mUI/mg prot)	Gpox Se-dep (mUI/mg prot)
Control	115,24 ± 2,45	84,04 ± 4,89	2,87 ± 0,35	37,53 ± 8,22
MA 0,5mg/L	107,30 ± 1,59	103,45 ± 1,09**	2,89 ± 0,004	52,43 ± 2,56
MA 2mg/L	99,21 ± 13,51	108,77 ± 2,12**	2,78 ± 0,28	40,17 ± 4,71
MA 9mg/L	117,79 ± 0,08	111,24 ± 0,15**	3,32 ± 0,51	31,17 ± 3,75
BA				
Control	93,97 ± 4,49	54,31 ± 0,20	2,84 ± 0,20	86,15 ± 2,98
MA 0,5mg/L	91,52 ± 14,95	63,31 ± 0,74	3,34 ± 0,55	103,20 ± 14,08
MA 2mg/L	91,17 ± 0,58	64,47 ± 1,79	4,71 ± 0,02*	94,18 ± 16,99
MA 9mg/L	93,12 ± 1,67	58,33 ± 2,10	3,93 ± 0,28	62,62 ± 3,14*
OC				
Control	98,87 ± 11,73	162,30 ± 2,81	6,36 ± 1,40	98,91 ± 0,19
MA 0,5mg/L	106,10 ± 0,06	170,92 ± 2,22	9,77 ± 0,44**	71,64 ± 4,36*
MA 2mg/L	100,79 ± 0,51	192,47 ± 1,18**	10,73 ± 0,07**	76,32 ± 14,34
MA 9mg/L	108,18 ± 10,27	139,56 ± 8,91**	6,38 ± 0,74	67,89 ± 0,1*

Los asteriscos denotan diferencias significativas con el correspondiente control; *p<0,05; **p<0,01. Los valores informados corresponden a la Media ± ES de dos experimentos independientes, con tratamientos realizados por duplicado.

Por otra parte, la respuesta del sistema enzimático antioxidante fue más variable (Tabla 3). La actividad enzimática de CAT se mantuvo elevada y constante durante todo el desarrollo embrionario; no se observaron cambios significativos en su actividad por exposición al plaguicida MA. La actividad enzimática de GPox Se-dep se incrementó a lo largo del desarrollo embrionario. En los estadios de BC y BA se verificó una tendencia al incremento en la actividad de GPox Se-dep en embriones expuestos a la menor concentración de 0,5 mg/L MA, que fue reduciéndose proporcionalmente a mayores concentraciones llegando a una tendencia a la disminución en embriones expuestos a 9 mg/L MA. En el estadio de OC la actividad de GPox Se-dep disminuyó significativamente en embriones expuestos a MA, excepto para la concentración de 2 mg/L, probablemente debido a la alta dispersión experimental obtenida. La actividad enzimática de GST se incrementó significativamente en el estadio de BC a las tres concentraciones de MA empleadas: 23%,

29% y 32% para 0,5, 2 y 9 mg/L MA, respectivamente. Dicho incremento se revirtió luego de 7 días de exposición (BA), mientras que en el estadio de OC para embriones expuestos a 9 mg/L MA la actividad de GST disminuyó significativamente un 14% respecto del control. La actividad enzimática de GR se incrementó significativamente en un 66% en el estadio de BA frente a 2 mg/L MA. En OC la actividad de GR fue mayor que en estadios anteriores, siendo inducida significativamente por exposición a 0,5 mg/L y 2 mg/L MA en un 53% y 69% respectivamente, mientras que en embriones expuestos a 9 mg/L MA la actividad retornó a valores control.

Observamos una correlación directa ($r=0,877$; $p=0,0008$) entre la depleción de las reservas de GSH y la frecuencia de aparición de alteraciones morfológicas en los embriones expuestos al plaguicida MA (Figura 4). Esto sugiere una conexión entre el estado de estrés oxidativo, dado por la caída en los niveles de GSH, y la alteración de procesos de proliferación y/o di-

ferenciación celular que llevan a la aparición de malformaciones.

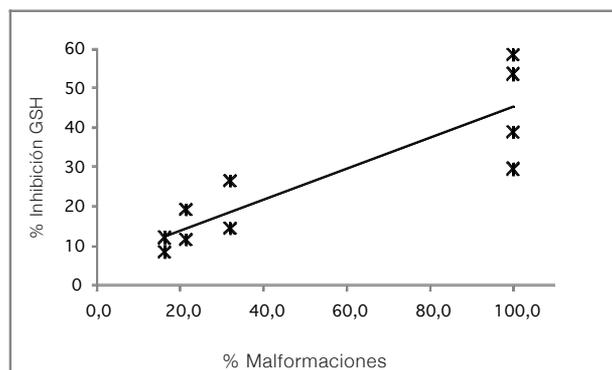


Figura 4. Correlación entre el porcentaje de malformaciones y la inhibición de GSH en embriones de *R. arenarum* expuestos en forma continua a MA.

Efectos de los plaguicidas OP sobre el metabolismo de PAs

Los niveles de PAs se incrementaron paulatinamente durante el desarrollo embrionario de *R. arenarum*. Put es la PA mayoritaria, seguida por Spd y Spm, que alcanzó niveles detectables en el estadio de OC (0,25 nmol/mg prot). CP (8 y 16 mg/L) produjo una caída temprana de Put y de Spd (Figura 5). Por otra parte, los niveles de Put se incrementaron significativamente en un 60% en embriones expuestos a 9 mg/L MA en el estadio OC, a diferencia de los niveles de Spd que sufrieron un descenso altamente significativo del 56% en dicho estadio, respecto de embriones control (Tabla 5). El tratamiento con 9 mg/L MA provocó también un descenso en los niveles de Spm por debajo del límite de detección de la técnica.

La actividad de ODC en el estadio de BC fue semejante en embriones control y expuestos a MA (Tabla 5), mientras que CP provocó una disminución progresiva hasta los 8 mg/L (Figura 5). La actividad enzimática de ODC de embriones control se incrementó en el estadio de BA respecto a BC; la actividad fue inhibida por la exposición a 0,5 y 2 mg/L MA (53%; $p < 0,05$), mientras que 9 mg/L MA provocó su aumento. En el estadio de OC la actividad de ODC se incrementó en forma altamente significativa en embriones expuestos a 9 mg/L (18 veces), comparado con embriones control. El análisis de correlación de la actividad de ODC y el porcentaje de malformaciones provocado por CP en el estadio temprano de BC marcó una alta correlación negativa; $r = 0,837$, $p = 0,0001$ (Figura 6).

Debido a la importancia que reviste la enzima ODC en el metabolismo de PAs, se procedió a su detección inmunohistoquímica. Se detectó claramente la proteína en zonas particulares del embrión, como en las glándulas cementales, siendo la marca más intensa en embriones tratados que en aquellos no expuestos a MA (Figura 7). Esto concuerda con la elevada actividad de ODC determinada en embriones expuestos a 9 mg/L MA (Tabla 5) respecto de embriones control.

Tabla 5. Niveles de Put, Spd y ODC en embriones expuestos a MA.

	BC	BA	OC
Put (nmol/mg prot)			
Control	4,60 ± 0,50	8,06 ± 0,77	13,09 ± 2,60
MA 0,5mg/L	6,29 ± 0,96	11,23 ± 1,10	11,91 ± 0,78
MA 2mg/L	6,06 ± 0,16	14,07 ± 3,29	15,68 ± 2,10
MA 9mg/L	6,44 ± 0,82	16,73 ± 5,10	20,93 ± 3,94*
Spd (nmol/mg prot)			
Control	1,24 ± 0,21	5,01 ± 0,08	10,92 ± 2,29
MA 0,5mg/L	1,32 ± 0,44	5,03 ± 0,29	9,58 ± 0,37
MA 2mg/L	1,48 ± 0,06	6,60 ± 1,34	13,12 ± 1,11
MA 9mg/L	1,71 ± 0,10	5,08 ± 1,32	4,79 ± 0,66*
ODC (nmol CO₂/h/mg prot)			
Control	2,78 ± 0,04	7,26 ± 1,29	0,26 ± 0,03
MA 0,5mg/L	3,06 ± 0,04	3,84 ± 0,46*	0,31 ± 0,06
MA 2mg/L	2,60 ± 0,09	4,31 ± 0,34*	0,27 ± 0,04
MA 9mg/L	2,51 ± 0,34	11,01 ± 1,00**	3,17 ± 1,00**

Los asteriscos denotan diferencias significativas con el correspondiente control; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Los valores informados corresponden a la Media ± ES de dos experimentos independientes, con tratamientos realizados por duplicado.

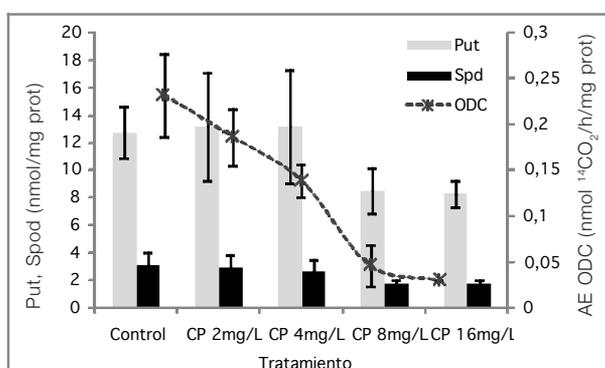


Figura 5. Niveles de PAs y actividad específica de ODC en embriones de *R. arenarum* en estadio de BC expuestos a CP. Las barras corresponden a Media ± ES de duplicados de tratamiento.

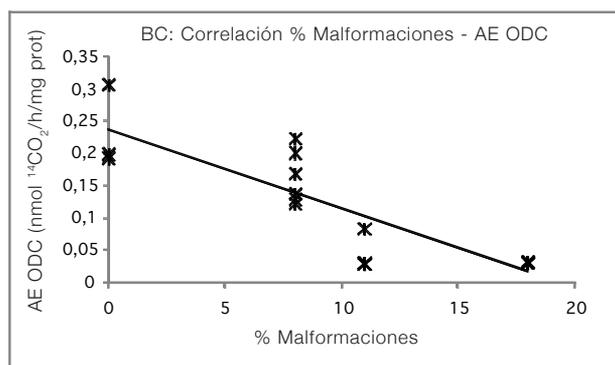


Figura 6. Análisis de correlación entre el porcentaje de embriones malformados y la actividad específica de ODC en embriones de *R. arenarum* expuestos a CP (2, 4, 8 y 16 mg/L) hasta el estadio de BC.

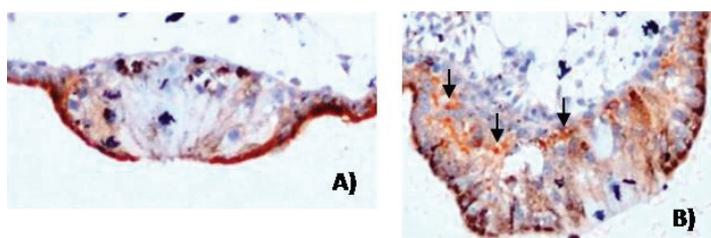


Figura 7. Análisis inmunohistoquímico de ODC en cortes transversales de embriones de *R. arenarum* en estadio de OC expuestos en forma continua a 9 mg/L MA.

Detalle de las glándulas cementales A) Control. B) Tratado. Las flechas indican células que expresan la proteína ODC.

Se determinó el efecto de la exposición embrionaria de *R. arenarum* a OP sobre la actividad de proteína quinasa. La actividad de serina/treonina quinasa basal se incrementó 3,2 veces en embriones en estadio de OC debido a la exposición continua a 9 mg/L MA ($0,22 \pm 0,01$ vs. $0,70 \pm 0,08$ nmol P/mg prot controles y MA respectivamente; $p < 0,01$). Por otra parte, la actividad medida en condiciones específicas para PKC marcó un aumento altamente significativo debido a MA 9 mg/L respecto tanto a la actividad de PKC en controles ($1,08 \pm 0,13$ vs $0,27 \pm 0,01$ nmol P/mg prot respectivamente, 4,0X de incremento; $p < 0,01$) como a su actividad quinasa basal (1,5 veces; $p < 0,05$).

DISCUSIÓN

CAT, junto con SOD, constituyen la primera línea de defensa antioxidante en *R. arenarum* (14) y *Xenopus laevis* (13). En larvas de rana toro (*Lithobates catesbeiana*) expuestas a glifosato se verifica un incremento de actividad de dichas enzimas en tejido hepático frente al aumento de EROs provocado por el plaguicida

(53). La actividad específica de enzimas relacionadas al glutatión es menor que la actividad de CAT, siendo GST la más activa, seguida por GPox Se-dep y GR. En condiciones basales, la actividad de dichas enzimas responde a cambios en el ambiente del embrión, como una mayor exposición al O₂ ambiental al momento de la eclosión o al procesamiento del agua a través de sus branquias (13,14). GST es una enzima detoxificante de fase II que se encuentra bajo control del factor de transcripción Nrf2, a través del elemento de respuesta antioxidante (ARE). GST incrementa significativamente su actividad por exposición a MA en embriones en BC como respuesta detoxificante, siendo finalmente inhibida en embriones en OC expuestos a la mayor concentración ensayada. La inhibición de la actividad específica de GPox Se-dep en el estadio de OC en embriones expuestos a MA, de manera similar a lo que ocurre con GST, sugiere un efecto debido a un exceso de EROs que supera las defensas antioxidantes, situación debida probablemente a lo prolongado de la exposición a la concentración más alta de MA ensayada (9 mg/L). Como se mencionó anteriormente, GR posee una baja actividad en embriones de *R. arenarum* comparada con otras enzimas dependientes de glutatión. Esto ha sido observado en otros embriones de anfibios (13). Hay una clara inducción de la actividad de GR en embriones expuestos hasta OC a 0,5 y 2 mg/L de MA. El incremento de actividad de GR podría indicar la necesidad de reciclar el GSH que habría sido oxidado por el aumento de EROs inducido por MA. Por otra parte en embriones expuestos a 9 mg/L MA la actividad es semejante a los valores control. Esto es concordante con lo descrito previamente para GPox, reforzando entonces la hipótesis del predominio de EROs sobre la capacidad antioxidante. Los resultados sugieren claramente una situación de estrés oxidativo en donde el GSH es depletado gradualmente; la respuesta inductiva sobre la síntesis de GSH y las enzimas antioxidantes se vería sucesivamente superada por el impacto de EROs sobre sitios susceptibles de ataque sobre las proteínas.

La correlación observada entre la depleción de GSH y la proporción de malformaciones observadas (Figura 4), lleva a pensar en primer lugar en un efecto dirigido por el estrés oxidativo sobre procesos de proliferación y/o diferenciación celular. La biotransformación de OP por los sistemas oxidativos de detoxificación

llevaría a una situación de estrés y consumo de defensas antioxidantes como el GSH. De esta manera, el estrés oxidativo causado por la metabolización de OP podría ser uno de los mecanismos a través de los cuales estas plaguicidas causan malformaciones durante el desarrollo embrionario de anfibios (54).

Es reconocida la importancia de las PAs en diversos procesos celulares que incluyen proliferación, diferenciación, muerte celular e incluso desarrollo embrionario (26). El patrón de PAs determinado en embriones de *R. arenarum* es coincidente con el de otros anfibios como *X. laevis*. Put es mayoritaria, seguida de Spd, mientras que Spm es la minoritaria o incluso indetectable (27). El incremento de Put por exposición de los embriones a MA sería consecuencia de un incremento de la actividad de ODC, una de las enzimas limitantes en la biosíntesis de PAs. La disminución de Spd y Spm podría deberse a un incremento en su degradación oxidativa (vía PAO y DAO) o bien a una alteración a nivel de la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa, que proporciona los grupos aminopropilo que se adicionarán sobre Put y que la transformarán en Spd, y luego a ésta en Spm. La degradación oxidativa de Spd y Spm también podría ser causante del aumento de Put. En el estadio de desarrollo temprano BC no se ven alterados los niveles de PAs o la actividad de ODC por exposición a MA. En el estadio de BA se altera la actividad de ODC sin modificar los niveles de PAs, y finalmente, en el estadio de OC se altera tanto la actividad de ODC como los niveles de PAs, incrementándose la actividad de ODC y aumentando Put. Esta situación de incremento de la actividad de ODC desencadenada por la exposición de los embriones a MA sería una respuesta de tipo reparadora u homeostática, a fin de permitir al embrión continuar con su desarrollo. Si bien se requieren profundizar los estudios histoquímicos de expresión de la ODC, en un primer análisis los niveles aumentados de la enzima se corresponderían con una mayor proliferación de ciertos tejidos (Figura 7).

La vía de señalización de respuesta a estrés oxidativo está dirigida por la regulación sobre el factor de transcripción Nrf-2 a través de la disminución de GSH, actuando también positivamente la fosforilación por PKC (24,25). Nuestros resultados son coincidentes con esta vía de regulación, ya que el OP MA es capaz de aumentar notoriamente la actividad de PKC en el final del desarrollo embrionario, en

respuesta a una depleción de GSH por estrés oxidativo. Este aumento es en principio un regulador positivo de GST, que aliviaría el estrés oxidativo, y de ODC, que actuaría en la reparación proliferativa de tejidos. Sin embargo, si los OP aumentasen la degradación oxidativa de las PAs en su acción deletérea sobre tejidos, estarían entonces potenciando el estrés oxidativo y provocando en consecuencia un mayor daño (10,33). Por su parte, CP produjo un descenso de la actividad de ODC que concuerda con la disminución de los niveles de Put y Spd en embriones de desarrollo temprano. El descenso de la actividad de ODC en el estadio embrionario temprano de BC se encuentra altamente correlacionado con el porcentaje de embriones que desarrollan diversas malformaciones. Estas circunstancias serían indicativas de la activación de una vía apoptótica que conduciría finalmente al arresto del desarrollo embrionario. Ambos OP estarían entonces activando diferentes respuestas, debidas a una distinta capacidad pro-oxidante, o bien a acciones a través de vías diferenciales de señalización teniendo en cuenta su variabilidad estructural.

En conclusión, el estrés oxidativo inducido por los insecticidas organofosforados y la acción potenciadora o sinérgica causada por su efecto sobre el metabolismo de PAs conllevaría a una alteración de los procesos de proliferación y diferenciación, al modificar la actividad de diversos factores de transcripción relacionados al destino celular, ocasionando así las alteraciones observadas a nivel del desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum*.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Venturino, A.; Rosenbaum, E.; Caballero de Castro, A.; Anguiano, O.L.; Gauna, L.; Fonovich de Schroeder, T.; Pechen de D'Angelo, A.M. (2003). Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* 8,167-186.
2. Loewy, M.; Kirs, V.; Carvajal, G.; Venturino, A.; Pechen de D'Angelo, A.M. (1999). Groundwater contamination by azinphos methyl in the Northern Patagonic Region (Argentina). *Sci. Total Environ.* 225, 211-218.
3. Anguiano, O.L.; Pechen de D'Angelo, A.M. (2007). Provincia de Río Negro y Provincia de Neuquén. En: La problemática de los agroquímicos y sus envases, la incidencia en la salud

de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente. Ministerio de Salud de la Nación, OPS/OMS, Buenos Aires, p. 181–201.

4. Loewy, M.; Carvajal, G.; Pechen de D'Angelo, A.M. (2003). Residuos de plaguicidas en efluentes de industrias agroalimentarias y aguas superficiales. En: Herkovits, J. (Ed.), Environmental Toxicology and Chemistry, Contributions for a Sustainable Development. Latin American Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Buenos Aires, p. 193–195.

5. Dubosq, L.; Soleño, J.; Rosenbaum, E.; Montagna, M.; Venturino, A.; Pechen de D'Angelo, A.M. (2007). Larvas de *Bufo arenarum* como sistema de biomonitoreo en aguas provenientes de explotaciones frutícolas. Acta Toxicol. Argent. 15 (supl), 44. Resumen.

6. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Press, Oxford.

7. Winston, G.W.; Di Giulio, R.T. (1991). Pro-oxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquat. Toxicol. 19, 137–161.

8. Cnubben, N.H.P.; Rietjens, I.M.; Wortelboer, H.; van Zanden, J.; van Bladeren, P.J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. Environ. Toxicol. Pharmacol. 10, 141–152.

9. Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. Free Radic. Biol. Med. 27, 916–921.

10. Venturino, A.; Anguiano, O.L.; Gauna, L.; Cocca, C.; Bergoc, R.M.; Pechen de D'Angelo, A.M. (2001). Thiols and polyamines in the potentiation of malathion toxicity in larval stages of the toad *Bufo arenarum*. Comp. Biochem. Physiol. C 130, 191–198.

11. Jokanovic, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. Toxicology 166, 139–160.

12. Dandapat, J.; Chainy, G.B.N.; Rao, K.J. (2003). Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. C 135, 221–233.

13. Rizzo, A.M.; Adorni, L.; Montorfano, G.; Rossi, F.; Berra, B. (2007). Antioxidant metabolism of *Xenopus laevis* embryos during the first days of development. Comp. Biochem. Physiol. B 146, 94–100.

14. Ferrari, A.; Anguiano, L.; Lascano, C.; Sotomayor, V.; Rosenbaum, E.; Venturino, A. (2008). Changes in the antioxidant metabolism in the embryonic development of the common South American toad *Bufo arenarum*: differential responses to pesticide in early embryos and autonomous-feeding larvae. J. Biochem. Mol. Toxicol. 22, 259–267.

15. Wells, P.G.; Bhuller, Y.; Chen, C.S.; Jeng, W.; Kasapinovic, S.; Kennedy, J.C.; Kim, P.M.; Lapos, R.R.; McCallum, G.; Nicol, C.J.; Parman, T.; Wiley, M.J.; Wong, A.W. (2005). Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. Toxicol. Appl. Pharmacol. 207, S354–S366.

16. Dennerly, P.A. (2007). Effects of oxidative stress on embryonic development. Birth Defects Res. C 81, 155–162.

17. Delescluse, ChN.; Ledirac, R.L.; Piechocki, M.P.; Hines, R.N.; Gidrol, X.; Rahmani, R. (2001). Induction of cytochrome P450A1 gene expression, oxidative stress and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. Biochem. Pharmacol. 61, 399–407.

18. Oruc, E.O.; Uner, N. (2004). Tissue specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. Comp. Biochem. Physiol. C. 137, 43–51.

19. Sharma, Y.; Bashir, S.; Irshad, M.; Gupta, D.S.; Dogra, T.D. (2005). Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. Toxicology 206, 49–57.

20. Venturino, A.; Pechen de D'Angelo, A.M. (2005). Biochemical targets of xenobiotics: Biomarkers in amphibian ecotoxicology. Appl. Herpetol. 2, 335–353.

21. Ferrari, A.; Venturino, A.; Pechen de D'Angelo, A.M. (2007). Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzymes. Pest.

Biochem. Physiol. 88, 134–142.

22. Bianchini, A.; Monserrat, J.M. (2007). Effects of methyl parathion on *Chasmagnathus granulatus* hepatopancreas: protective role of sesamol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 100–108.

23. Isik, I.; Celik, I. (2008). Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pest. Biochem. Physiol.* 92, 38–42.

24. Nguyen, T.; Sherratt, P.J.; Pickett, C.B. (2002). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 233-260.

25. Jaiswal, A.K. (2004). Nrf2 signalling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Rad. Biol. Med.* 36, 1199-1207.

26. Fozard, J.R.; Part, M.L.; Prakash, N.J.; Grove, J.; Schechter, P.J.; Sjoerdsma, A.; Koch-Weser, J. (1980). L-ornithine decarboxylase: an essential role in early mammalian embryogenesis. *Science* 208, 505-508.

27. Osborne, H.B.; Cormier, P.; Lorillon, O.; Maniey, D.; Bellé, R. (1993). An appraisal of the developmental importance of polyamine changes in early *Xenopus* embryos. *Int. J. Dev. Biol.* 37, 615-618.

28. Moinard, C.; Cynober, L.; de Bandt, J-P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin. Nutr.* 24, 184-197.

29. Pegg, A.E. (1988). Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target of chemotherapy. *Cancer Res.* 48, 759-774.

30. Deng, W.; Jiang, X.; Mei, Y.; Sun, J.; Ma, R.; Liu, X.; Sun, H.; Tian, H.; Sun, X. (2008). Role of ornithine decarboxylase in breast cancer. *Acta Biochim Biophys Sin.* 235-243.

31. Sakata, K.; Kashiwagi, K.; Sharmin, S.; Ueda, S.; Igarashi, K. (2003). Acrolein produced from polyamines as one of the uraemic toxins. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 371-374.

32. Wood, P.L.; Amin Khan, M.; Kulow, S.R.;

Mahmood, S.A.; Moskal, J.R. (2006). Neurotoxicity of reactive aldehydes: The concept of “aldehyde load” as demonstrated by neuroprotection with hydroxylamines. *Brain Res.* 190-199.

33. Palanimurugan, R.; Scheel, H.; Hoffman, K.; Dohmen, R.J. (2004). Polyamines regulate their synthesis by inducing expression and blocking degradation of ODC antizyme. *EMBO J.* 23, 4857-4867.

34. Pegg, A.E. (2006). Regulation of ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 281,14529-14532.

35. Venturino, A.; Gauna, L.; Bergoc, R.M.; Pechen de D’Angelo, A.M. (1992). Effect of exogenously applied polyamines on malathion toxicity in the toad *Bufo arenarum* Hensel. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 135-139.

36. Venturino, A.; Gauna, L.E.; Bergoc, R.M.; Pechen de D’Angelo, A.M. (2001). Toxicokinetics of malathion in larval stages of the toad *Bufo arenarum* (Hensel): effect of exogenous spermidine. *Pest. Biochem. Physiol.* 70, 142-150.

37. Dalton, T.P.; Puga, A.; Shertzer, H.G. (2002). Induction of cellular oxidative stress by aryl hydrocarbon receptor activation. *Chem. Biol. Interact.* 141, 77-95.

38. Bello-Fernández, C.; Cleveland, L. (1992). c-myc transactivates the ornithine decarboxylase gene. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 182, 445-452.

39. Li, R.S.; Abrahamsen, M.S.; Johnson, R.R.; Morris, D.R. (1994). Complex interactions at GC-rich domain regulate cell type-dependent activity of the ornithine decarboxylase promoter. *J. Biol. Chem.* 269, 7941-7949.

40. Soleño, J. (2000). Mecanismos comunes de toxicidad de plaguicidas: Interacción entre carbaril y metilazinfos. Graduate Thesis. Universidad Nacional del Comahue. 51.

41. Del Conte, E.; Sirlin, J.L. (1951). Serie tipo de los primeros estadios embrionarios en *Bufo arenarum*. *Acta Zool. Lilloana* XII, 497-501.

42. Beers, R.F.; Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown

of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem 195, 133–140.

43. Regoli, F.; Nigro, M.; Benedetti, M.; Fattorini, D.; Gorbi, S. (2005). Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuagramma antarcticum*: responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. Aquat Toxicol 75, 43–52.

44. Di Ilio, C.; Polidoro, G.; Arduini, A.; Muccini, A.; Federici, G. (1983). Glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase and g-glutamyl transpeptidase activities in human early pregnancy placenta. Biochem. Med. 29, 143–148.

45. Czarniewska, A.; Kasprzyk, A.; Ziemnicki, K. (2003). Effect of paraquat and metoxychlor on antioxidant enzymes in frog *Rana esculenta* L liver. Biol. Lett. 40, 125–133.

46. Schaedle, M.; Bassham, J.A. (1977). Chloroplast glutathione reductase. Plant Physiol 59, 1011–1012.

47. Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jacoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249, 7130–7139.

48. Schenkel, E.; Dubois, J.G.; Helson-Cambier, M.; Hanocq, M. (1996). Cytotoxicity of polyamines to *Amoeba proteus*: Role of polyamine oxidase. Cell Biol. Toxicol. 12, 1–9.

49. Gaines, D.W.; Friedman, L.; Braunberg, R.C. (1989). Facilitated micromethod for measurement of metabolically generated $^{14}\text{CO}_2$, with application to measurement of ornithine decarboxylase. Anal. Biochem. 178, 52–56.

50. Yovanovich, C.A.M.; Jungblut, L.D.; Heer, T.; Pozzi, A.G.; Paz, D.A. (2009). Amphibian larvae and zinc sulphate: a suitable model to study the role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the neuronal turnover of the olfactory epithelium. Cell Tissue Res. 336, 1–9.

51. Kendall, D.A.; Hill, S.J. (1995) Methods in Molecular Biology Volume 41: Signal Transduction Protocols. Humana Press. New Jersey.

52. Kikawa, U.; Takai, Y.; Minakuchi, R.; Inohara, S.; Nishizuka, Y. (1982) Calcium activated, phospholipid-dependent protein kinase from rat brain. Subcellular distribution, purification, and properties. J Biol Chem 257 (2), 13341–13348.

53. Costa, M.J.; Monteiro, D.A.; Oliveira-Neto, A.L.; Rantin, F.T.; Kalinin, A.L. (2008). Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. Ecotoxicology 17, 153–163.

54. Ferrari, A.; Lascano, C.; Anguiano, L.; Pechen de D'Angelo, A.M.; Venturino, A. (2009). Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during embryonic development of the toad *Rhinella arenarum* (Hensel). Aquat Toxicol 93, 37–44.

REVISIÓN DE LA TOXICOCINÉTICA Y LA TOXICODINAMIA DEL ÁCIDO CIANHÍDRICO Y LOS CIANUROS

Quiroga, Patricia N. *; Olmos, Valentina

Cátedra de Toxicología y Química Legal. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. 7°, Buenos Aires, Argentina (C1113ADD).
Tel/Fax: 5411-4964-8283/4.

*Autor a quien dirigir la correspondencia: pquiroga@ffyb.uba.ar

Resumen: REVISIÓN DE LA TOXICOCINÉTICA Y LA TOXICODINAMIA DEL ÁCIDO CIANHÍDRICO Y LOS CIANUROS. Patricia N. Quiroga; Valentina Olmos. *Acta Toxicol. Argent. (2009) 17 (1): 20-32*. El cianuro es uno de los tóxicos más peligrosos por su rápida y potente acción, muchas veces letal. Los diferentes tratamientos de la intoxicación tienen su base o explicación en el conocimiento de la toxicocinética y la toxicodinamia. La revisión de la toxicocinética del cianuro muestra que, si bien la vía de la tiosulfato-cianuro sulfotransferasa (rodanasa) es la principal vía metabólica, el complejo con albúmina sérica sería el primer proceso de detoxificación del cianuro en el metabolismo normal. El efecto protector de formadores de cianhidrinas en casos de intoxicación sigue siendo evaluado a nivel experimental. Los estudios actuales sobre la toxicodinamia del cianuro se enfocan en la afinidad de la unión del cianuro al centro binuclear hemo a_3 - Cu_B de la citocromo oxidasa en sus diferentes estados redox y en el mecanismo de inhibición de enzimas antioxidantes. Un mayor y mejor entendimiento de la detoxificación del cianuro así como de los mecanismos de acción tóxica podrían llevar al desarrollo de potenciales antídotos.

Palabras clave: Cianuro; Toxicocinética; Toxicodinamia

Abstract: REVIEW OF TOXICOKINETICS AND TOXICODYNAMICS OF CYANIDES AND HYDROGEN CYANIDE. Patricia N. Quiroga; Valentina Olmos. *Acta Toxicol. Argent. (2009) 17 (1): 20-32*. Cyanide is one of the most dangerous poisons because of its rapid and potent toxicity, most times with lethal outcomes. Different poisoning treatments are based on knowledge of cyanide's toxicokinetic and toxicodynamic. The review of cyanide's toxicokinetics shows that, although thiosulfate-cyanide sulfotransferase (rhodanese) is the major metabolic pathway, binding serum albumin would be the first process of detoxification of cyanide in normal metabolism. The protective effect of cyanohydrin formers in cases of poisoning remains experimentally evaluated. Cyanide's binding affinity to the binuclear center heme a_3 - Cu_B of cytochrome oxidase within their different redox states and cyanide's mechanism of inhibition of antioxidant enzymes are currently still being investigated. More and better understanding of cyanide's detoxification pathways and/or mechanisms of toxic action could lead to the development of new potential antidotes.

Keywords: Cyanide; Toxicokinetic; Toxicodynamic

INTRODUCCIÓN

El ácido cianhídrico es un líquido incoloro a 20°C, con ligero olor a almendras amargas. Tiene un punto de ebullición de 26°C lo cual permite muy fácilmente su pasaje al estado gaseoso. Los cianuros alcalinos como el cianuro de sodio y de potasio son sólidos blancos muy solubles en agua.

El hombre puede estar expuesto a cianuro a través de una gran variedad de compuestos, los cuales pueden ser de origen natural y antropogénico.

Ejemplos de compuestos de origen natural son los glucósidos cianogénicos, sustancias complejas formadas por una aglicona, un azúcar y una molécula de ácido cianhídrico. Alrededor de 1000 especies de plantas contienen estos glucósidos (1), que son capaces de liberar la molécula de cianhídrico en determinadas condiciones de temperatura, tiempo y/o acción de enzimas vegetales o bacterianas

(1). Se conocen aproximadamente 25 glucósidos cianogénicos diferentes, de los cuáles la amigdalina, la durrina, la linamarina, la lotaustralina, la prunasina y la taxifilina son los de mayor importancia en plantas comestibles (2). Estos compuestos están naturalmente presentes en alimentos como las almendras, las habas, la mandioca, la soja, el sorgo y la espinaca (3,4); en las semillas de manzana, los carozos de duraznos, cerezas y ciruelas (5). Aunque está descrito que el pH gástrico no es capaz de hidrolizarlos, existe evidencia que la flora intestinal de los mamíferos sí puede hacerlo (1,2).

Las principales fuentes de contaminación de origen antropogénico son las descargas (desechos) de las industrias mineras de extracción de metales preciosos, de las industrias metalúrgicas del hierro y el acero y de las industrias químicas que producen distintos compuestos de cianuro tales como ferro y ferricianuros (3).

Algunas industrias utilizan compuestos de cianuro en procesos de síntesis para la fabricación de plásticos, papel, telas, gomas, fotografía, plaguicidas (5). Otras fuentes de ácido cianhídrico son las emisiones vehiculares, el humo de cigarrillo y las emanaciones en la quema de basura y en los incendios.

La administración terapéutica de nitroprusiato de sodio como agente hipotensor puede ocasionar intoxicación por cianuro (6-10).

La etiología de la intoxicación con ácido cianhídrico y cianuros puede ser intencional (suicida u homicida), accidental, iatrogénica, alimentaria, ambiental y profesional.

La exposición al tóxico puede ser aguda o crónica. Las etiologías intencional y accidental están más frecuentemente asociadas a exposición aguda (11-15) y las etiologías profesional, ambiental y alimentaria están más frecuentemente asociadas a exposición crónica (16-19).

La toxicidad de los cianuros se manifiesta por acción general, es decir, se pueden distinguir las etapas de absorción, distribución, metabolismo y eliminación del tóxico (7). En el caso de cianuro de sodio, la acción cáustica al entrar en contacto con las mucosas (20), puede considerarse una acción local.

La principal característica del perfil toxicológico del cianuro es su rápida y potente toxicidad aguda, y los diferentes tratamientos de la intoxicación tienen su base o explicación en el conocimiento de la toxicocinética y la toxicodinamia.

El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de la toxicocinética y toxicodinamia del ácido cianhídrico y los cianuros, sus relaciones con los antidotos utilizados en la actualidad, y una actualización del tema con vistas a potenciales mecanismos de acción para nuevos antidotos.

ABSORCIÓN

El ácido cianhídrico es una molécula pequeña y tiene un pKa de 9,21 (21) que hace que no esté ionizada al pH fisiológico. En el estado gaseoso es un compuesto de elevada difusibilidad. Atraviesa rápidamente membranas por un mecanismo de difusión simple.

El ácido cianhídrico se absorbe por piel y mucosas y puede ingresar al organismo por vía inhalatoria, oral, conjuntival y dérmica (22,23). Los factores que modifican la velocidad de absorción pueden ser: a) propios del compuesto, como la liposolubilidad, la constante de disociación (24), la concentración en el sitio de ab-

sorción (directamente relacionada con la concentración o dosis de exposición); y b) propios del sitio de absorción, como la superficie de contacto, la irrigación o perfusión y el pH en el sitio de absorción.

La absorción gastrointestinal de sales de cianuro es más lenta que la absorción inhalatoria del gas cianhídrico y se ve afectada por la presencia de alimentos (22). El tiempo transcurrido entre la exposición y la aparición de los síntomas depende del tipo de compuesto involucrado (gas cianhídrico, cianuros hidrosolubles, cianuros insolubles en agua y compuestos cianogenéticos), la vía de ingreso y la dosis. Por ejemplo, la hiperpnea puede aparecer 15 segundos después de la exposición a gas cianhídrico (25) o los síntomas pueden demorarse hasta 12 horas luego de la ingestión de glucósidos cianogenéticos (22).

DISTRIBUCIÓN

Si la absorción fue por vía oral, una importante porción es detoxificada en hígado por el proceso de primer pasaje (5,22,26).

La distribución del cianuro absorbido es rápida (minutos a horas) y uniforme, se lo encuentra en prácticamente todos los tejidos (27), sin embargo, los mayores niveles suelen encontrarse en hígado, pulmones, sangre y cerebro (22,28).

Se une a muchas metaloenzimas, inactivándolas, entre las cuales encontramos enzimas que contienen hierro, cobre y cobalto (29).

En sangre, la mayor proporción de cianuro se halla dentro del eritrocito. La relación concentración de cianuro en glóbulo rojo/concentración de cianuro en plasma varía de acuerdo a distintos autores: 2/1 (29), 100/1 (30) y 199/1 (22). La alta afinidad de los eritrocitos por el cianuro podría ser interpretada como un mecanismo de detoxificación (5,31).

El cianuro puede atravesar la barrera placentaria (32). Esta afirmación se basa en que se encontraron mayores niveles de tiocianato (principal metabolito del cianuro) en sangre de cordón umbilical de fetos de madres fumadoras comparados con los niveles hallados en sangre de cordón de fetos de madres no fumadoras, lo que sugiere que el tiocianato y posiblemente el cianuro atraviesan placenta (23).

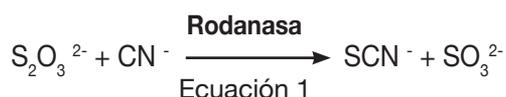
No se ha descrito acumulación del cianuro en sangre o tejidos luego de exposición crónica al tóxico (22).

METABOLISMO Y ELIMINACIÓN

El proceso de detoxificación de cianuro involucra una vía metabólica principal en la que participan enzimas intracelulares (sulfotransferasas) y vías metabólicas alternativas menores conformadas por procesos de oxidación y unión a cistina, entre otros.

Las sulfotransferasas catalizan la adición de azufre al cianuro de modo irreversible formando tiocianato (33,34), de menor toxicidad que el cianuro, que posteriormente es eliminado en la orina. El metabolismo a través de las sulfotransferasas es crítico en el proceso de detoxificación. Varias enzimas han sido caracterizadas que favorecen la transferencia de sulfuros bivalentes a aceptores nucleofílicos como el cianuro: tiosulfato–cianuro sulfotransferasa (rodanasa) EC 2.8.1.1, β-mercaptopiruvato–cianuro sulfotransferasa (MPST) EC 2.8.1.2, tiosulfato reductasa (tiosulfato tiol sulfotransferasa) EC 2.8.1.3 y cistationasa γ-liasa EC 4.4.1.1 (7).

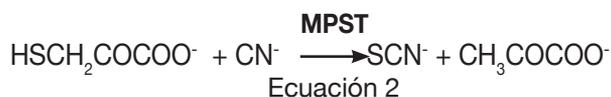
La rodanasa (EC 2.8.1.1) es una enzima mitocondrial, ubicua, presente en diferentes organismos vivos, desde bacterias al hombre (35-42). Convierte el cianuro en tiocianato al transferirle un átomo de azufre desde el tiosulfato u otro dador de azufre (Ecuación 1).



Por esta vía se detoxifica el 80% de la dosis absorbida de cianuro (43).

El sulfito producido en esta reacción es convertido a sulfato por la enzima sulfito oxidasa (EC 1.8.3.1) (44). En tejido humano se ha descrito la presencia de isoenzimas de la rodanasa (45) y una actividad de rodanasa elevada en riñón seguida por hígado, cerebro, pulmón, músculo y estómago (40).

La MPST (EC 2.8.1.2) cataliza la transferencia de azufre sólo desde el 3-mercaptopiruvato, que se forma durante el catabolismo de la cisteína, a un aceptor de azufre como el cianuro (Ecuación 2).



El 3-mercaptopiruvato es el único sustrato de la MPST. Este hecho estaría relacionado con

la presencia del grupo α-ceto y la posición del grupo sulfuro (46). Esta enzima se halla tanto en células eucariotas como procariotas. Presenta según la especie diferencias en su disposición, así, en rata se encuentra en mayor proporción en riñón e hígado localizándose en citoplasma y mitocondria (47). En pollo y paloma la actividad de MPST más alta se exhibe en hígado seguido por riñón. En pato y murciélago de la fruta los niveles más elevados se localizan en riñón (48).

La distribución subcelular de la MPST pone en evidencia que primero detoxifica el cianuro en el citoplasma y luego en la mitocondria en cooperación con la rodanasa (49). La MPST y la rodanasa son miembros de la misma familia y están evolutivamente relacionadas (50).

En la MPST humana se identificaron 3 polimorfismos genéticos, de los cuales la mutación sin sentido Tyr⁸⁵ Stop, que da lugar a la síntesis de una proteína inactiva, podría estar relacionada con un mayor riesgo de desarrollar neurotoxicidad tras la exposición a cianuro (51).

La tiosulfato reductasa (EC 2.8.1.3) cataliza la desulfuración de tiosulfatos oxidando GSH a GSSG. Durante esta reacción se forma glutathion persulfido (GSS⁺), compuesto altamente reactivo, que reacciona con el cianuro si éste está presente (52). Esta enzima se encuentra en hígado, riñón, corazón, cerebro, intestino y testículo (53). Se localiza a nivel subcelular en citoplasma y mitocondria (36).

La cistationasa γ-liasa (EC 4.4.1.1) es la cuarta enzima que participa en la detoxificación endógena del cianuro (54). Esta enzima cataliza la formación de tiocistina, un dador de azufre sustrato de la rodanasa, a partir de cistina (55).

Entre las vías metabólicas alternativas menores se encuentran: 1) formación del ácido 2-aminotiazolidín-4-carboxílico, por reacción del cianuro con cistina, que se elimina por orina (56,57). Esta vía corresponde a un 20% del metabolismo, el cual se incrementa con dosis tóxicas de cianuro (25,56); 2) oxidación enzimática y no enzimática del cianuro a cianato, que se elimina como dióxido de carbono por vía respiratoria (58); 3) combinación del cianuro con hidroxicobalamina para formar cianocobalamina (vitamina B12), que se elimina por vía renal (33,59); 4) incorporación en el pool metabólico de compuestos mono carbonados (58). Los pasos metabólicos planteados se muestran en la figura 1.

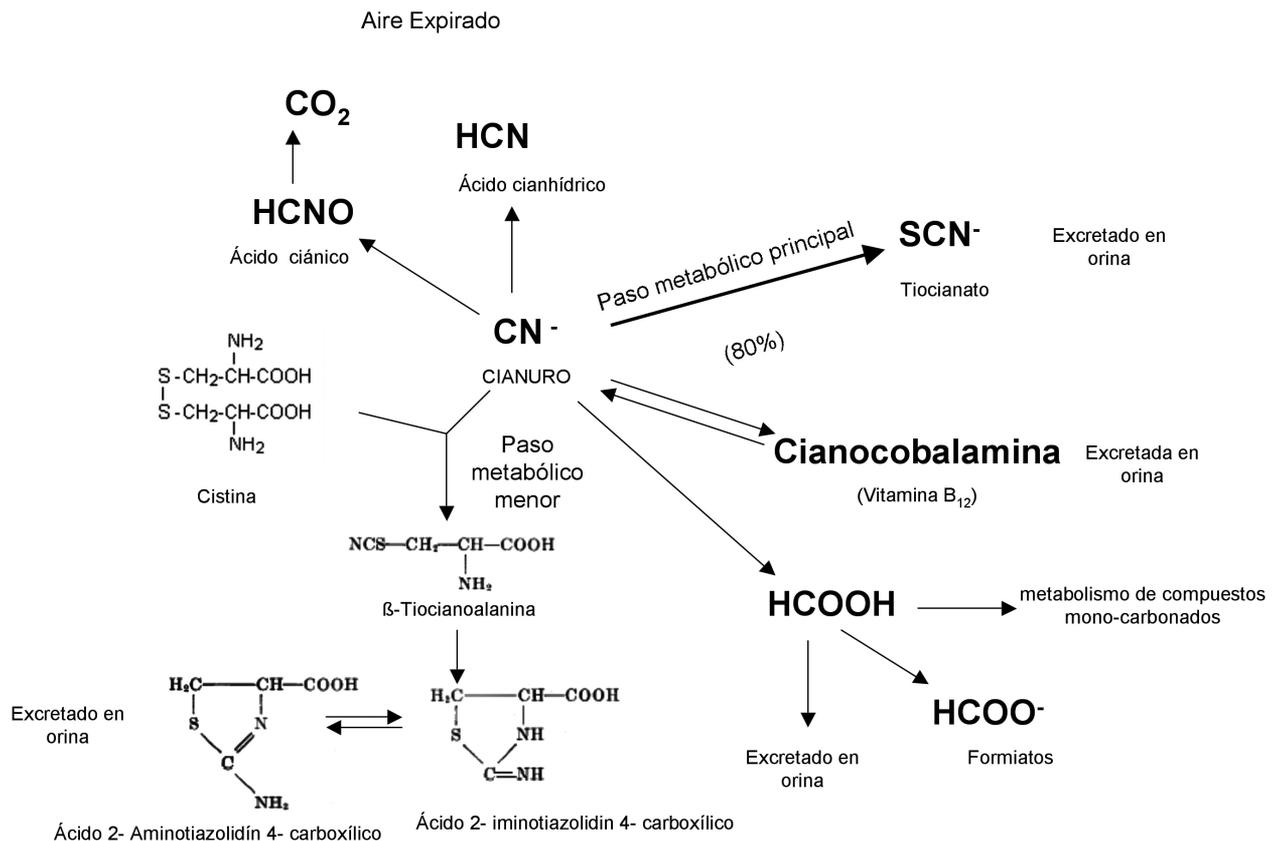


Figura 1. Esquema de los pasos metabólicos de cianuro (tomado de ATSDR, 2006 (33) con modificaciones).

El cianuro también puede ser removido por otros procesos importantes como la formación de cianmetahemoglobina en glóbulos rojos por su reacción con el hierro en estado férrico de la metahemoglobina (25,31) y por la interacción con la albúmina del suero a través de los grupos azufre – sulfona, la que exhibe un comportamiento análogo a una enzima en el proceso de detoxificación de cianuro (53,60-65). Las reacciones de cianuro con las sales o los ésteres de algunos aminoácidos (piruvato, α -cetoglutarato, oxalacetato) conducen a la formación de intermediarios cianhidrinas y a su incorporación en el metabolismo intermediario (33,53).

La combinación de las rutas metabólicas en el humano genera una capacidad de detoxificación de 0,017mg de cianuro por kilo de peso por minuto (25,66).

En humanos de ambos sexos tratados con nitroprusiato de sodio se observó una detoxificación espontánea de cianuro de aproximadamente 1 μ g/kg de peso por minuto (22,67).

El metabolismo enzimático, principal ruta de metabolización del cianuro, es eficiente, pero no tiene suficiente capacidad de detoxificación

en intoxicaciones agudas por falta de dadores de azufre endógenos; y la protección conferida por la formación de cianatos derivados es limitada, porque las células no pueden utilizar el oxígeno (22,25).

Existe escasa y muy variada información sobre datos toxicocinéticos del cianuro y sus compuestos en el hombre. Las dosis letales medias para humano estimadas en base a estudios de reporte de casos son: para exposición por vía inhalatoria CL_{50} 524 ppm por 10 minutos, por vía oral DL_{50} 1,52 mg/kg y por vía dérmica DL_{50} 100mg/kg (33). Algunos datos provenientes de reportes de casos se presentan en la *tabla 1* junto a datos toxicocinéticos provenientes de estudios en diferentes especies animales. En esta tabla se observan variaciones de la vida media relacionadas con la especie, el tipo de exposición, la dosis, el compuesto, la vía de administración y el tiempo de exposición. Además, se distingue que, de las tres especies (monogástrica: rata y cerdo, no monogástrica: cabra) evaluadas en las mismas condiciones experimentales con dosis subletales, en la cabra el cianuro presenta una vida me-

dia mayor con una constante de eliminación (Kel) menor. Este hecho permitiría asumir que el cianuro permanece más tiempo en esa es-

pecie no monogástrica, posiblemente prolongando la exposición a tiocianato, su principal metabolito.

Tabla 1. Datos toxicocinéticos en diferentes especies

Especie	Compuesto	Dosis (vía adm)	Vida media (hs)	Kel (hs ⁻¹)	Fuente bibliográfica
Humano	CNK	1g (VO)	19*		Hall, 1987 (68) Leiken, 1996-97 (69)
Humano			0,7 – 2,1		Baselt, 2000 (43) ATSDR, 2006 (33)
Humano	HCN	10ppm por 1min (VInh)	0,0045**		Stamyr, 2008 (70)
Perro	CNNa	20,4 μmol/kg (VI)		0,0568	Sylvester, 1983 (71)
Rata	CNK	3mg/kg (VO)	0,64	1,08	Sousa, 2003 (72)
Cerdo	CNK	3mg/kg (VO)	0,54	1,28	Sousa, 2003 (72)
Cabra	CNK	3mg/kg (VO)	1,28	0,54	Sousa, 2003 (72)
Caballo	CNNa	1mg/kg/hs (Inf.I por 1 hora)	α 0,74 β 16	α 0,9436 β 0,0461	Dirikolu, 2003 (73)

Nota: VO: vía oral; VInh: vía inhalatoria; VI: vía intravenosa; Inf.I: infusión intravenosa; *fase terminal; **en aire exhalado.

El cianuro absorbido es excretado principalmente como tiocianato en orina. Trazas de cianuro de hidrógeno también pueden ser excretadas, sin cambio, a través de pulmón, saliva, sudor u orina, como dióxido de carbono en el aire expirado o como β tiocianoalanina en saliva y sudor (26). Algunos autores han comunicado la existencia de dos fases de eliminación para el cianuro, una fase rápida o α y una terminal o β en un modelo bicompartamental (68,73).

MECANISMO DE ACCIÓN

Se conoce que el cianuro se une e inactiva aproximadamente 40 enzimas (22), entre las cuales se pueden mencionar las siguientes: catalasa, ácido ascórbico oxidasa, peroxidasa, tirosinasa, fosfatasa, xantino oxidasa, succínico deshidrogenasa, superóxido dismutasa, carboxilasa vitamina K dependiente y anhidrasa carbónica (7,22,33,74). Además, se une a la metahemoglobina y a la hidroxicoalamina (33). Pero, la acción más importante desde el punto de vista toxicológico es la unión a la citocromo c oxidasa (22,25,33).

La citocromo oxidasa es una superfamilia de proteínas las cuales actúan como enzimas ter-

minales en las cadenas respiratorias celulares. Como consecuencia de la unión del cianuro a la enzima, se impide la utilización del oxígeno a nivel celular y se manifiesta un estado de anoxia histotóxica.

La estructura de la enzima y el mecanismo de unión del cianuro han sido estudiados en numerosos trabajos (75-78) y aún continúan siendo investigados. La unión del cianuro a la citocromo c oxidasa es compleja y depende del estado redox de la enzima. Jones y colaboradores (75) propusieron la existencia de dos formas o estados de la enzima citocromo c oxidasa y las denominaron formas unibles y no unibles al cianuro. Consideraron forma unible a la enzima en su estado parcialmente reducido y formas no unibles a todos los otros estados redox de la enzima. Los mismos autores también demostraron que el cianuro se une a la forma parcialmente reducida de la enzima (75).

Varios estudios indican que el cianuro se une al centro binuclear hemo a_3 -Cu_B (77,79-81). El centro binuclear puede existir en tres estados: reducido, oxidado o parcialmente reducido (82). El oxígeno sólo puede unirse en el estado totalmente reducido (Fe²⁺a₃-Cu⁺_B). El

cianuro puede unirse al centro binuclear en los tres estados, pero tendría una mayor afinidad de unión por el estado parcialmente reducido ($\text{Fe}^{3+}_2\text{-Cu}^+$) (77).

Al ser un nucleófilo fuerte, el ácido cianhídrico tiene múltiples efectos en varios sistemas del organismo. En el sistema nervioso central, puede llevar a la acumulación de calcio intracelular en las neuronas (83). Puede provocar la liberación de neurotransmisores excitatorios en cerebro y la liberación de catecolaminas desde las glándulas adrenales y terminales nerviosas adrenérgicas (83).

A dosis subletales, se han descrito secuelas como síndrome similar Parkinson (19), relacionados con la muerte de células nerviosas dopaminérgicas inducida por cianuro (84,85).

También se ha descrito que el cianuro induce peroxidación lipídica, principalmente en el cerebro (7) debido, probablemente, a la inhibición de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (33,83).

Adicionalmente, el cianuro estimula directamente los quimiorreceptores del cuerpo carotídeo y de los cuerpos aórticos, produciendo hiperpnea (86). Esta estimulación sería consecuencia de la hipoxia provocada por el cianuro a nivel de las células tipo I (células glomus) del cuerpo carotídeo (87). Así, el cianuro afecta la respiración en dos niveles, el nivel celular en la cadena respiratoria y el nivel fisiológico a través de los quimiorreceptores.

Todos estos mecanismos explicarían la predominancia de afecciones neurológicas en los intoxicados con dosis subletales de cianuro (88-90) ya que el sistema nervioso central es más vulnerable debido a su alta demanda metabólica de oxígeno (33).

El cianuro también tiene una acción sobre la tiroides atribuida a su principal metabolito, el tiocianato. El ión tiocianato es un compuesto bociógeno que compete con el ión yoduro por el ingreso a la tiroides y, como consecuencia, altera la síntesis de las hormonas tiroideas: triiodo tironina y tiroxina (T3 y T4) (22,26,33).

TRATAMIENTO

El paradigma de tratamiento clásico en toxicología clínica incluye: 1) tratamiento de soporte; 2) prevención de la absorción de los compuestos tóxicos; 3) fortalecimiento de su eliminación; 4) tratamientos específicos, incluidos los antidotos (7,30,86,91). El tratamiento con antidoto, sobre una base toxicocinética, implica una disminución de la concentración del tóxico

a nivel del blanco celular y, sobre una base toxicodinámica, conduce a una modificación de la sintomatología clínica sin afectar la concentración del compuesto en el blanco celular (92).

En la intoxicación por cianuro cuyas acciones son complejas y no pueden atribuirse exclusivamente a la inhibición de la utilización del oxígeno, se produce un rápido inicio de la toxicidad que debe tener un tratamiento eficaz e inmediato para evitar el síndrome tóxico (89,93-95).

Los compuestos utilizados como antidotos en la intoxicación con cianuro pueden ser clasificados en cuatro grupos basados en su mecanismo de acción (96,97).

- Secuestrante. Son compuestos que inactivan al cianuro por unión a él, por ejemplo: hidroxocobalamina o hidroxocobalamina (93,98,99), EDTA di Co (100,101), otras sales de cobalto (102,103), compuestos formadores de cianhidrinas como el α cetoglutarato cuyo efecto protector continua siendo estudiado a nivel experimental (104-108); o compuestos que generan la formación de metahemoglobina, a la que a su vez, se une el cianuro, por ejemplo: nitritos (68,93,109), 4- dimetilaminofenol (97).
- Detoxicante. Son compuestos donantes de azufre como el tiosulfato, que favorecen la metabolización enzimática del cianuro y su conversión a tiocianato, relativamente no tóxico, que se elimina rápidamente del organismo (68,71,110).
- Fisiológico. El oxígeno parece ser un antagonista fisiológico que puede facilitar la disociación del cianuro de la citocromo oxidasa (96).
- Bioquímico. Son compuestos que disponen de mecanismos en gran medida sin explicación y sus acciones pueden estar relacionadas con dianas intracelulares de cianuro que no sean la citocromo oxidasa (96).

En el tratamiento específico de la intoxicación con cianuro se hace uso de diferentes clases de antidotos que se presentan en la *tabla 2*.

Todos los antidotos actualmente disponibles para tratar la intoxicación por cianuro, excepto el oxígeno, ejercen su acción sobre una base toxicocinética, específicamente por reducción del cianuro libre a nivel de los tejidos (92,109).

Tabla 2. Antídotos usados en la intoxicación con cianuro

Clase	Prototipo	Ejemplo	Acción
Secuestrante	Metahemoglobinizantes	Nitrito de amilo	Formación de cianmetaHb
		Nitrito de sodio	
4-dimetilaminofenol			
	Compuestos con cobalto	Hidroxicobalamina	Formación de cianocobalamina
		EDTA di Co	Quelación del CN
Detoxificante	Donante de azufre	Tiosulfato	Formación de tiocianato

CONCLUSIONES

Aunque pareciera ser que el cianuro no es un tóxico “moderno”, tanto su toxicodinamia como su toxicocinética y sus vías de detoxificación continúan siendo motivo de estudio e investigación. Cada vez que se propone un

mecanismo de unión del cianuro a un sitio de acción tóxica, cada vez que se esclarece una vía de detoxificación (enzimática o no enzimática) del cianuro, se está abriendo un camino a un potencial antídoto.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Concon, J.M. (1988). Endogenous toxicants in foods derived from higher plants. En: Food Toxicology. Principles and Concepts. Marcel Dekker Inc. New York, USA. p 281.
- Speijers, G. (1993). Cyanogenic glycosides. En: Toxicological evaluation of certain food additives and naturally occurring toxicants. WHO Food Additives Series. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization. Geneva. 30, p 299.
- Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR). (2006). Department of Health and Human Services. Public Health Statement for Cyanide [en línea]. Disponible en <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phs8.html> (consulta: noviembre 2008).
- Kuti, J.O.; Konoru, H.B. (2006). Cyanogenic glycosides content in two edible leaves of tree spinach (*Cnidocolus* spp.). Journal of Food Composition and Analysis. 19, 556-61.

- van Heijst, A.N.P. (1988). Cyanides. International Programme of Chemical Safety (IPCS). Poison Information Monographs. World Health Organization [en línea]. Disponible en <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pimg003.htm> (consulta: noviembre 2008).
- Aitken, D.; West, D.; Smith, F.; Poznanski, W.; Cowan, J.; Hurtig, J.; Peterson, E.; Benoit, B. (1977). Cyanide toxicity following nitroprusside induced hypotension. Canadian Anaesthetists' Society Journal. 24 (6), 651-660.
- Kerns, W.P.; Kirk, M.A. (1998). Cyanide and Hydrogen Sulfide. En: Goldfrank's Toxicologic Emergencies 6th ed. Goldfrank, Flomenbaun, Lewin, Weisman, Howland, Hoffman Eds. Appleton and Lange, Stanford, Connecticut. p1569.
- Migneco, A.; Ojetti, V.; de Lorenzo, A.; Gentiloni Silveri, N.; Savi, L. (2004). Hypertensive crises: diagnosis and management in the emergency room. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 8, 143-152.

- 9.** Nicoletta, G.; Cascelli, M.; Marchesini, L.; Tesoro, M. (2007). A probable case of nitroprusside intoxication. *Minerva Anestesiologica*. 73 (9), 471-73.
- 10.** Varon, J.; Marik P.E. (2008). Perioperative hypertension management. *Vascular Health and Risk Management*. 4 (3), 615-627.
- 11.** Baud, F.J.; Borron, S.W.; Bavoux, E.; Astier, A.; Hoffnan, J.R. (1996). Relation between plasma lactate and blood cyanide concentrations in acute cyanide poisoning. *British Medical Journal*. 312, 26-7.
- 12.** Hantson, P.; N'Geye, P.; Laforge, M.; Clemessy, J.L.; Baud, F. (1996). Suicide attempt by ingestion of potassium ferricyanide. *Clinical Toxicology*. 34 (4), 471-473.
- 13.** Chin, R.G.; Calderon, Y. (2000). Acute cyanide poisoning: a case report. *Journal of Emergency Medicine*. 18 (4), 441-5.
- 14.** Prieto, I.; Pujol, I.; Santiuste, C.; Poyo-Guerrero, R.; Diego, A. (2005). Acute cyanide poisoning by subcutaneous injection. *Emergency Medicine Journal*. 22, 389-90.
- 15.** Geller, R.J.; Barthold, C.; Saiers, J.A.; Hall, A.H. (2006). Pediatric cyanide poisoning: causes, manifestations, management, and unmet needs. *Pediatrics*. 118 (5), 2146- 58.
- 16.** El Ghawabi, S.H.; Gaafar, M.A.; El-Saharti, A.A.; Ahmed, S.H.; Malash, K.K.; Fares, R. (1975). Chronic cyanide exposure: a clinical, radioisotope, and laboratory study. *British Journal of Industrial Medicine*. 32, 215-219.
- 17.** Chandra, H.; Gupta, B.N.; Bhargava, S.K.; Clerk, S.H.; Mahendra, P.N. (1980). Chronic cyanide exposure. A biochemical and industrial hygiene study. *J Anal Toxicol*. 4 (4), 161-5.
- 18.** Okafor, P.N.; Okorowkwo, C.O.; Maduagwu, E.N. (2002). Occupational and dietary exposures of humans to cyanide poisoning from large-scale cassava processing and ingestion of cassava foods. *Food Chem Toxicol*. 40 (7), 1001-5.
- 19.** Di Filippo, M.; Tambasco, N.; Muzi, G.; Balucani, C.; Saggese, E.; Parnetti, L.; Calabresi, P.; Rossi, A. (2008). Parkinsonism and cognitive impairment following chronic exposure to potassium cyanide. *Mov Disord*. 23 (3), 468-70.
- 20.** Cumming Smith British Petroleum (CSBP) (2003). Material Safety Data Sheet. Sodium cyanide [en línea]. Disponible en [http://www.csbp.com.au/downloads/chemicals/1060582250_Sodium_Cyanide_\(Solid\).pdf](http://www.csbp.com.au/downloads/chemicals/1060582250_Sodium_Cyanide_(Solid).pdf) (consulta: noviembre 2008).
- 21.** Serjeant, E.P.; Dempsey, B. (1979). Ionization Constants of Organic Acids in Solution, IUPAC Chemical Data Series No. 23, Serjeant, E. P. and Dempsey, B. (eds.). Pergamon Press, Oxford, UK. [en línea]. Disponible en http://chemweb.unp.ac.za/chemistry/Physical_Data/pKa_compilation.pdf (consulta: noviembre 2008).
- 22.** World Health Organization (WHO). (2004). Hydrogen Cyanide and Cyanides: Human Health Aspects. Concise International Chemical Assessment Document; 61.
- 23.** Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR). (2006). Medical Management Guidelines for Hydrogen Cyanide [en línea]. Disponible en <http://www.atsdr.cdc.gov/MHMI/mmg8.html#top> (consulta: noviembre 2008).
- 24.** Díaz-Veliz, G. (2007). Absorción y vías de administración de fármacos. Programa Farmacología Molecular y Clínica. [en línea]. Disponible en https://www.u-cursos.cl/medicina/2007/2/TMPCFARM2/1/material_docente/objeto/137770 (consulta: noviembre 2008).
- 25.** Baskin, S.T.; Brewer, T.G. (1997). Cyanide poisoning. En: *Textbook of Military Medicine, Medical aspects of chemical and biological warfare*. Zajtchuk and Bellamy Eds. Office of the Surgeon General Department of the Army, Washington DC, USA. p 271.
- 26.** World Health Organization (WHO). (2007). Cyanide in Drinking-water. WHO Guidelines for Drinking-water Quality [en línea]. Disponible en http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/second_addendum_cyanide_short_term%20_4_.pdf (consulta: diciembre 2008).
- 27.** Leybell, I.; Hoffman, R.S. (2006). Toxicity, cyanide. *The Medscape Journal of Medicine* [en línea]. Disponible en <http://www.emedicine.com>

com/EMERG/topic118.htm (consulta: noviembre 2008).

28. Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA). (1997). California Environmental Protection Agency. Pesticide and Environmental Toxicology Section. Public Health Goal for Cyanide in Drinking Water. [en línea]. Disponible en http://oehha.ca.gov/water/phg/pdf/cyan_c.pdf (consulta: diciembre 2008).

29. Lauwerys, R. (1994). Ácido cianhídrico, cianuros, nitrilos y sustancias similares. En: *Toxicología Industrial e Intoxicaciones Profesionales*. Mason S.A. Barcelona, España. p 379.

30. Ellenhorn, M.J. (1997). Cyanide poisoning. En: *Ellenhorn's Medical Toxicology. Diagnosis and Treatment of Human Poisonings*. Second edition. Williams and Wilkins Eds. Baltimore Maryland, USA. p 1476.

31. McMillan, D.E.; Svobova, A.C. (1981). The role of erythrocytes in cyanide detoxification. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 221 (1), 37-42.

32. Risk Assessment Information System (RAIS). (1994). Toxicity Profiles. Toxicity Summary for Cyanide. [en línea]. Disponible en http://rais.ornl.gov/tox/profiles/cyanide_f_V1.html (consulta: noviembre 2008).

33. Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR). (2006). Toxicological Profile for cyanide. Department of Health and Human Services. Public Health Statement for Cyanide [en línea]. Disponible en <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp8.pdf> (consulta: noviembre 2008).

34. Repetto Jiménez, M.; Repetto Kuhn, G. (2009). Procesos fisiopatológicos de origen tóxico. En: *Toxicología Fundamental*, 4ta edición. Díaz De Santos, España. p 230.

35. Burton, C.P; Akagi, J.M. (1971). Observations on the rhodanese activity of *desulfotomaculum nigrificans*. *J Bacteriol.* 107 (1), 375-6.

36. Koj, A.; Frendo, J.; Wojtczak, L. (1975). Subcellular distribution and intramitochondrial localization of three sulfurtransferases in rat liver. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters*. 57 (1), 42- 46.

37. Aminlari, M.; Vaseghi, T.; Kargar, M.A. (1994). The cyanide metabolizing enzyme rhodanese in different parts of the respiratory systems of sheep and dog. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 124, 67-71.

38. Vázquez, E.; Polo, C.; Stedile, G.; Schebor, C.; Karahanian, E.; Batlle, A. (1995). Isolation and partial purification of mitochondrial and cytosolic rhodanese from liver of normal and p-dimthylaminoazobenzene treated mice. *Int J Biochem Cell Biol.* 27 (5), 523- 529.

39. Hatzfeld, Y.; Saito, K. (2000). Evidence for the existence of rhodanese (thiosulfate:cyanide sulfurtransferase) in plants: preliminary characterization of two rhodanese cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters*. 470, 147-150.

40. Aminlari, M.; Malekhusseini, A.; Akrami, F.; Ebrahimnejad, H. (2007). Cyanide-metabolizing enzyme rhodanese in human tissues: comparison with domestic animals. *Comparative Clinical Pathology*. 16, 47-51.

41. Cipollone, R.; Ascenzi, P.; Tomao, P.; Imperi, F.; Visca, P. (2008). Enzymatic detoxification of cyanide: clues from *Pseudomonas aeruginosa* rhodanese. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 15, 199-211.

42. Baghshani, H; Aminlari M. (2009). Comparison of rhodanese distribution in different tissues of Japanese quail, partridge, and pigeon. *Comp Clin Pathol.* 18, 217-20.

43. Baselt, R. (2000). Cyanide. En: *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*. Fifth edition. Chemical Toxicology Institute. Forester City, California, USA. p 221.

44. Parkinson, A. (2001). Biotransformation of xenobiotics. En: *Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons*, 6th edition. Curtis D. Klaassen Ed. Mc Graw Hill, New York, USA. p 133.

45. Whitehouse, D.B.; Pilz, A.J.; Porta, G.; Hopkinson, D.A. (1988). Rhodanese isozymes in human tissues. *Annals of Human Genetics*. 52, 1-10.

46. Porter, D.W.; Baskin, S.I. (1996). Specificity

studies of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. *J of Biochem Toxicol.* 10 (6), 287- 292.

47. Nagahara, N.; Ito, T.; Kitamura, H.; Nishino, T. (1998). Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochemistry and Cell Biology.* 110, 243-250.

48. Agboola, F.K; Fagbohunka, B.S; Adenuga, G.A. (2006). Activities of thiosulphate and 3-mercaptopyruvate-cyanide-sulphurtransferases in poultry birds and fruit bat. *J. Biol. Sci.* 6 (5), 833- 9.

49. Nagahara, N.; Ito, T.; Minami, M. (1999). Mercaptopyruvate sulfurtransferase as a defense against cyanide toxication: molecular properties and mode of detoxification. *Histology and Histopathology.* 14 (4), 1277-86. Resumen.

50. Nagahara, N.; Okazaki, T.; Nishino, T. (1995). Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionarily related to mitochondrial rhodanese. *The Journal of Biological Chemistry.* 270 (27), 16230-16235.

51. Laden Billaut, I.; Rat, E.; Allorge, D.; Crunelle-Thibaut, A.; Cauffiez, C.; Chevalier, D.; Lo-Guidice, J.M.; Broly, F. (2006). Evidence for a functional genetic polymorphism of the human mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST), a cyanide detoxification enzyme. *Toxicology Letters.* 165, 101-111.

52. Chauncey, T.R; Westley, J. (1983). The catalytic mechanism of yeast thiosulfate reductase. *J Biol Chem.* 258 (24), 15037- 45.

53. Baskin, S.I; Kelly, J.B; Maliner, B.I; Rockwood, G.A; Zoltani, C.K. (2008). Cyanide poisoning. [en línea]. Disponible en http://www.bordeninstitute.army.mil/published_volumes/chemwarfare/Ch11_Pg_371-410.pdf (consulta: agosto 2009).

54. Porter, D.W.; Nealley, E.W.; Baskin, S.I. (1996). In vivo detoxification of cyanide by cystathionase γ -Lyase. *Biochemical Pharmacology.* 52, 941-944.

55. Szczepkowski, T.W.; Wood, J.L. (1967). The

cystathionase-rhodanese system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Enzymology.* 139 (2), 469-478. Resumen.

56. Wood, J.L.; Cooley S.L. (1956). Detoxication of cyanide by cystine. *J. Biol. Chem.* 218 (1), 449-457.

57. Logue, B.A.; Maserek, W.K.; Rockwood, G.A.; Keebaugh, M.W.; Baskin, S.I. (2009). The analysis of 2-amino-2- thiazolidine - 4- carboxylic acid in the plasma of smokers and non - smokers. *Toxicology Mechanisms and Methods.* 19 (3), 202-208.

58. Boxer, G.E.; Rickards, J.C. (1952). Studies on the metabolism of the carbon of cyanide and thiocyanate. *Arch Biochem Biophys.* 39 (1), 7-26. Resumen.

59. Houeto, P.; Hoffman, J.R.; Imbert, M.; Levillain, P.; Baud, F.J. (1995). Relation of blood cyanide to plasma cyanocobalamin concentration after a fixed dose of hydroxycobalamin in cyanide poisoning. *The Lancet.* 346, 605- 608.

60. Catsimpoolas, N.; Wood, J.L. (1964). The reaction of cyanide with bovine serum albumin. *J.Biol. Chem.* 239 (12), 4132- 7.

61. Schneider, J.F.; Westley, J. (1969). Metabolic interrelations of sulfur in proteins, thio-sulfate, and cystine. *J. Biol.Chem.* 244 (20), 5735-5744.

62. Rutkowski, J.V; Roebuck, B.D.; Smith, R.P. (1985). Effects of protein-free diet and food deprivation on hepatic rhodanese activity, serum proteins and acute cyanide lethality in mice. *J. Nutr.* 115, 132-7.

63. Jarabak, R; Westley; J. (1986). Serum albumin and cyanide detoxication. Kinetic characterization of a reactive albumin-sulfur complex. *J. Biol. Chem.* 261 (23), 10793-6.

64. Lieske, C.N.; Clark, C.R.; Zoefel, L.D.; von Tersch, R.L.; Lowe, J.R.; Smith, C.D.; Broomfield, C.A.; Baskin, S.I.; Maxwell, D.M. (1996). Temperature effects in cyanolysis using elemental sulfur. *J Appl Toxicol.* 16 (2), 171-5. Resumen.

65. Fasco, M.J.; Hauer III, C.R.; Stack, R.F.; O'Hehir, C.; Barr, J.R.; Eadon, G.A. (2007). Cyanide Adducts with Human Plasma Pro-

teins: Albumin as a Potential Exposure Surrogate. *Chem. Res. Toxicol.*, 20 (4), 677– 84. Resúmen.

66. International Programme of Chemical Safety (IPCS), Commission of the European Communities (CEC). (1993). Evaluation of antidotes series. Antidotes for poisoning by cyanide [en línea]. Disponible en <http://www.inchem.org/documents/antidote/antidote/ant02.htm#SubSectionNumber:1.9.2> (consulta: abril 2009).

67. Schulz, V.; Gross, R.; Pasch, T.; Busse, J.; Loeschcke, G. (1982). Cyanide toxicity of sodium nitroprusside in therapeutic use with and without sodium thiosulphate. *Klin Wochenschr* (1982) 60, 1393-1400.

68. Hall, A.H.; Doutre, W.H.; Ludden, T.; Kulig, K.W.; Rumack, B.H. (1987). Nitrite/Thiosulfate treated acute cyanide poisoning: estimated kinetics after antidote. *Clinical Toxicology*. 25 (1&2), 121- 133.

69. Leiken, J.B.; Paulocek, F.P. (1996-97). Poisoning & Toxicology Handbook. 2nd Edition. Lexi-Comp INC, USA. p 900.

70. Stamy, K.; Nord, P.; Johanson, G. (2008). Washout kinetics of inhaled hydrogen cyanide in breath. *Toxicology Letters*. 179, 59 – 62.

71. Sylvester, D.M.; Hayton, W.L.; Morgan, R.L.; Way, J.L. (1983). Effects of thiosulfate on cyanide pharmacokinetics in dogs. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 69, 265 –271.

72. Sousa, A.B.; Manzano, H.; Soto-Blanco, B.; Górnica, S.L. (2003). Toxicokinetics of cyanide in rats, pigs and goats after oral dosing with potassium cyanide. *Archives of Toxicology*. 77, 330-334.

73. Dirikolu, L.; Hughes, C.; Harkins, D.; Byles, J.; Bosken, J.; Lehner, F.; Troppmann, A.; McDowell, K.; Tobin, T.; Sebastian, M.M.; Harrison, L.; Crutchfield, J.; Baskin, S.I.; Fitzgerald, T.D. (2003). The toxicokinetics of cyanide and mandelonitrile in the horse and their relevance to the mare reproductive loss syndrome. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 13, 199 – 211.

74. Doud, P.; Ham, S.W. (1991). Mechanism of cyanide inhibition of the blood clotting, vitamin K-dependent carboxylase. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences. 88, 10583-85.

75. Jones, M.G.; Bickar, D.; Wilson, M.T.; Brunori, M.; Colosimo, A.; Sarti, P. (1984). A re-examination of the reactions of cyanide with cytochrome c oxidase. *Biochemical Journal*. 220, 57-66.

76. Yoshikawa, S.; Shinzawa-Itoh, K.; Tsukihara, T. (1998). Crystal structure of bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 30 (1), 7-14.

77. Leavesley, H.B.; Li, L.; Prabhakaran, K.; Borowitz, J.L.; Isom, G.I. (2008). Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome c oxidase: implications for acute cyanide toxicity. *Toxicological Sciences*. 101 (1), 101–111.

78. Sharpe, M.A.; Krzyaniak, M.D.; Xu, S.; McCracken J.; Ferguson-Miller, S. (2009). EPR Evidence of cyanide binding to the Mn(Mg) center of cytochrome c oxidase: support for CuA–Mg involvement in proton pumping. *Biochemistry*. 48 (2), 328-335.

79. Jensen, P.; Wilson, M.T.; Aasa, R.; Malmstrom, B.G. (1984). Cyanide inhibition of cytochrome c oxidase. A rapid-freeze e.p.r. investigation. *Biochemical Journal*. 224, 829-837.

80. Hill, B.C.; Marmor, S. (1991). Photochemical and ligand-exchange properties of the cyanide complex of fully reduced cytochrome c oxidase. *Biochemical Journal*. 279, 355-360.

81. Wilson, M.T.; Antonini, G.; Malatesta, F.; Sartin, P.; Brunori, M. (1994). Probing the oxygen binding site of cytochrome c oxidase by cyanide. *The Journal of Biological Chemistry*. 269 (39), 24114-24119.

82. Nicholls, P.; Soulimane, T. (2004). The mixed valence state of the oxidase binuclear centre: how *Thermus thermophilus* cytochrome ba₃ differs from classical aa₃ in the aerobic steady state and when inhibited by cyanide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1655, 381-387.

83. Smith, R.P. (1996). Toxic responses of the blood. En: Casarett & Doull's *Toxicology. The basic science of poisons*, 5th edition. Curtis D. Klaassen Ed. Mc Graw Hill, New York, USA. p 335.

- 84.** Jones, D.C.; Gunasekar, P.G. Borowitz, J.L.; Isom, G.E. (2000). Dopamine-induced apoptosis is mediated by oxidative stress and is enhanced by cyanide in differentiated PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*. 74 (6), 2296-2304.
- 85.** Zhang, X.; Li, L.; Zhang, L.; Borowitz, J.L.; Isom, G.E. (2009). Cyanide-induced death of dopaminergic cells is mediated by uncoupling protein-2 up-regulation and reduced Bcl-2 expression. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 238, 11-19.
- 86.** Córdoba Palacio, D.; Ramos Jaramillo, J.I. (2006). Cianuro. En: *Toxicología 5º edición*. D. Córdoba P. Editor. El Manual Moderno, D.F. México. p 366.
- 87.** Wyatt, C.N.; Buckler, K.J. (2004). The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells. *J. Physiol*. 556 (1), 175-191.
- 88.** Pentore, R.; Venneri, A. Nichelli, P. (1996). Accidental choke-cherry poisoning: early symptoms and neurological sequelae of an unusual case of cyanide intoxication. *The Italian Journal of Neurological Sciences*. 17 (3), 233-235.
- 89.** Koschel, M.J. (2006). Management of the cyanide poisoned patient. *Journal of Emergency Nursing*. 32, S 19-26.
- 90.** Taylor, J.B.; Roney, N.; Harper, C.; Fransen, N. (2006). An overview of cyanide toxicity. [en línea]. Disponible en <http://www.syrres.com/Esc/presentations/sot2006/ingerman-Cyanide-SOT-2006.pdf> (consulta: noviembre 2008).
- 91.** Marruecos Sant, L. (1993). Tratamiento de las intoxicaciones. En: *Toxicología Clínica*. Springer-Verlag Ibérica, S.A. Barcelona, España. p 41- 54.
- 92.** Baud, F.J.; Borron, S.W.; Bismuth, C. (1995). Modifying toxicokinetics with antidotes. *Toxicology Letters*. 82/83, 785:793.
- 93.** Mannaioni, G.; Vannacci, A.; Marzocca, C.; Zorn, A.M.; Peruzzi, S.; Morini, F. (2002). Acute cyanide intoxication treated with a combination of hydroxycobalamin, sodium nitrite, and sodium thiosulfate. *Clinical Toxicology*. 40 (2), 181- 183.
- 94.** Fortín, J.L.; Varoux, S.; Ruttimann, M.; Astaud, C.; Kowalski, J.J. (2005). Hydroxocobalamin for poisoning caused by ingestion of potassium cyanide: a case study. Abstracts of the 2005 North American Congress of Clinical Toxicology annual meeting. *Clinical Toxicology*. 43 (6), 731.
- 95.** Borron, S.W. (2006). Recognition and treatment of acute cyanide poisoning. *Journal of Emergency Nursing*. 32, S 12- 18.
- 96.** Isom, G.E.; Borowitz, J.L. (1995). Modification of cyanide toxicodynamics: mecanistics based antidote development. *Toxicology Letters*. 82/83, 795- 799.
- 97.** Bhattacharya, R. (2000). Antidotes to cyanide poisoning: present status. *Indian Journal of Pharmacology*. 32, 94-101.
- 98.** Sauer, S.W.; Keim, M.E. (2001). Hydroxocobalamin: improved public health readiness for cyanide disasters. *Annals of Emergency Medicine*. 37 (6), 635- 641.
- 99.** Borron, S.W.; Baud, F.J.; Barriot, P.; Imbert, M.; Bismuth, C. (2007). Prospective study of hydroxocobalamin for acute cyanide poisoning in smoke inhalation. *Annals of Emergency Medicine*. 49 (6), 794- 801.
- 100.** Hillman, B.; Bardhan, K.D.; Bain, J.T.B. (1974). The use of dicobalt edetate (Kelocyanor) in cyanide poisoning. *Postgraduate Medical Journal*. 50, 171- 174.
- 101.** Pickering, W.G. (1985). Cyanide toxicity and the hazard of dicobalt edetate. *British Medical Journal*. 291, 1644.
- 102.** McGuinn, W.D.; Baxter, L.; Pei, L.; Petrikovics, I.; Cannon, E.P.; Way, J.L. (1994). Antagonism of lethal effect of cyanide by a synthetic water- soluble cobalt (III) porphyrin compound. *Fundamental and Applied Toxicology*. 23, 76- 80.
- 103.** Broderick, K.E.; Potluri, P.; Zhuang, S.; Scheffler, I.E.; Sharma, V.S.; Pilz, R.B.; Boss, G.R. (2006). Cyanide detoxification by the cobalamin precursor cobinamide. *Experimental Biology and Medicine*. 231 (5), 641- 649.

104. Delhumeau, G.; Cruz- Mendoza, A.M.; Gomez Lojero, C. (1994). Protection of cytochrome c oxidase against cyanide inhibition by pyruvate and α -ketoglutarate: effect of aeration in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 126, 345- 351.

105. Hume, A.S.; Mozingo, J.R.; McIntyre, B.; Ho, I.K. (1995). Antidotal efficacy of alpha- ketoglutaric acid and sodium thiosulfate in cyanide poisoning. *Clinical Toxicology*. 33 (6), 721- 724.

106. Bhattacharya, R.; Vijayaraghavan, R. (2002). Promising role of α - ketoglutarate in protecting against the lethal effects of cyanide. *Human & Experimental Toxicology*. 21 (6), 297-303. Resumen.

107. Bhattacharya, R.; Lakshmana Rao, P.V.; Vijayaraghavan, R. (2002). In vitro and in vivo

attenuation of experimental cyanide poisoning by α - Ketoglutarate. *Toxicology Letters*. 128, 185-195.

108. Bhattacharya, R.; Satpute, R.M.; Hariharakrishnan, J.; Tripathi, H.; Saxena, P.B. (2009). Acute toxicity of some synthetic cyanogens in rats and their response to oral treatment with alpha- ketoglutarate. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 2314- 2320.

109. Borron, S.W.; Baud, F.J.; Méric, P.; Seylaz, J.; Astier, A. (1996). Elevation of blood cyanide values after sodium nitrite administration: implications regarding the mechanism of detoxification. *Toxicology Letters*. 88, 52.

110. Hall, A.H.; Dart, R.; Bogdan, G. (2007). Sodium thiosulfate or hydroxocobalamin for the empiric treatment of cyanide poisoning? *Annals of Emergency Medicine*. 49 (6), 806- 813.

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 del 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 vestirán 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 acápito “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. Hidrobio. 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 ver-

sions 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 readership that, however, can be unfamiliar with topics involved. Review papers, updating, and reports on research in progress previously requested 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.

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. Bashamohideen (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 there of are akin to the scope and purpose of "Acta Toxicológica Argentina".

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, atualizações ou revisões, tema de divulgação, comentários bibliográficos, notas técnicas e cartas ao editor. Igualmente serão 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 con 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, atualizações 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. É aconselhável que este material tenha as dimensões de Acta; os autores devem ter em conta que, nos casos 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.