

ISSN 0327-9286

# *Acta Toxicológica Argentina*

---

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina  
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 17  
N° 2  
Diciembre 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**

Gerardo D. Castro

##### **Vicepresidente**

Marta A. Carballo

##### **Tesorero**

María L. Oneto

##### **Secretaria**

Adriana S. Ridolfi

##### **Vocales**

Fabiana L. Lo Nostro  
Patricia N. Quiroga  
María T. Yanicelli

##### **Vocales Suplentes**

Mónica C. Napoli  
Marcela M. López Nigro  
Carlos R. Mastandrea

##### **Comité Científico**

Nelson Albiano  
José A. Castro  
Lucrecia Ferrari  
Mirtha Nassetta  
Marta M. Salseduc

##### **Organo de Fizcalización**

Viviana V. Crapanzano  
Mirta E. Ryczel  
Claudia V. Vassena

##### **Tribunal de Honor**

Susana I. García  
Irma Giolito  
Augusto Piazza

#### **Acta Toxicológica Argentina**

##### **Director**

Adolfo R. de Roodt *INPB, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"; FMed - UBA*

##### **Comité de Redacción**

Ofelia C. Acosta de Pérez *Fac. Ciencias Vet.-UNNE, CONICET*  
Valentina Olmos *FFyB - UBA*  
Adriana S. Ridolfi *FFyB - UBA*

##### **Comité Editorial**

José A. Castro *CEITOX-CITEFA / CONICET - Argentina*  
Antonio Colombi *Universidad de Milán - Italia*  
Franz Delbeke *Universidad de Gante - Belgica*  
Heraldo Donnewald *Poder Judicial de la Nación - Argentina*  
Ana S. Fulginiti *Universidad de Córdoba - Argentina*  
Nilda G. G. de Fernícola *CETESB - Brasil*  
Veniero E. Gambaro *Universidad de Milán - Italia*  
Carlos A. García *Instituto de Estudios Bioquímicos - Argentina*  
Estela Gimenez *ANMAT - Argentina*  
Hector Godoy *INTA / CIC - Pcia. de Bs. As. - Argentina*  
Amalia Laborde *Universidad de la República - Uruguay*  
Nelly Mañay *Universidad de la República - Uruguay*  
Carlos Reale *Univ. Nacional del Sur - Argentina*  
Felix G. Reyes *Universidad de Campinas - Brasil*  
Irma Rosas Pérez *Univ. Autónoma de México - México*  
Marta Salseduc *Lab. Bagó. Univ. Austral - Argentina*  
Roberto Tapia Zuñiga *Chile*  
Enrique Tourón *Argentina*  
Norma Vallejo *Universidad de Bs. As. - Argentina*  
Eduardo Zerba *CIPEIN - CITEFA / CONICET - Argentina*

## **INDICE**

### **(CONTENTS)**

EDITORIAL .....	<b>39</b>
INVESTIGACIÓN DE COCAÍNA Y MARIHUANA EN MECONIO DE NEONATOS ATENDIDOS EN UN HOSPITAL PÚBLICO. PRIMERA EXPERIENCIA REALIZADA EN LA CIUDAD DE CÓRDOBA, ARGENTINA <i>Suárez, Andrés; Peirano, Alberto; González, Inés; Odierna, Edgar; Gait, Nilda; Llebeilli, Ruth; Hansen, Cristian.....</i>	<b>41</b>
OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN METODOLÓGICA DE LA CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO POR INYECCIÓN EN FLUJO- GENERACIÓN DE HIDRUROSESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (IF-GH-EAA) PREVIA DERIVATIZACIÓN CON L-CISTEÍNA <i>Navoni, Julio A.; Olivera, Nancy M.; Villaamil Lepori, Edda C.....</i>	<b>48</b>
DAÑO AL ADN EN MUJERES EXPUESTAS AL HUMO DE LA LEÑA EN CHIAPAS, MÉXICO <i>Herrera-Portugal, Crispín; Franco-Sánchez, Guadalupe; Pelayes Cruz, Marina; Schlottfeldt Trujillo, Yolanda; Pérez Solís, Blanca Lilia .....</i>	<b>56</b>
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES .....	<b>62</b>

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](http://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

## EDITORIAL

### Estimados colegas:

En noviembre pasado en la Asamblea de la ATA se renovó la dirección de Acta Toxicológica Argentina, cargo para el cual fui electo. Agradezco la confianza depositada en mi persona para asumir esta responsabilidad, que no es poca.

Acta Toxicológica Argentina se encuentra en su actual posicionamiento entre las revistas científicas gracias al esfuerzo realizado por los anteriores Directores, Comités de Redacción, Comités Editoriales y Evaluadores. Los desafíos que se presentan ante este nuevo Comité de Redacción son mantener esa línea de crecimiento que comenzó en 1983 y alcanzar metas puntuales que nos permitan aumentar el prestigio de la revista y el servicio que ésta brinda.

Como parte de esos objetivos, estamos realizando varias tareas, a fin cumplir con los pasos necesarios para la incorporación de la revista en más sistemas de indexación internacionales para publicaciones científicas.

El Comité Editorial está siendo renovado y hemos aumentado la cantidad de integrantes del Comité de Redacción. Esto permitirá tener un mayor dinamismo en el proceso de recepción y revisión de trabajos. De esta forma también contaremos con mayor fuerza para profundizar en los aspectos referidos a la promoción, revisión de trabajos y edición de la revista. Más aún, hemos agregado nuevas secciones a fin de enriquecer la oferta de material para los lectores.

Además, se comenzó a trabajar en la difusión de los artículos de la revista en REDARTOX, RETOXLAC, y se espera ampliar la difusión a otras redes.

Tenemos presente que para el crecimiento de la revista, un punto fundamental es aumentar la cantidad y calidad de los trabajos recibidos. Para facilitar y mejorar la presentación de los trabajos en Acta, hemos modificado los requisitos para los autores de acuerdo a parámetros internacionales sugeridos por los editores de revistas científicas, los cuales llegan a ustedes en este número.

Esperamos poder ofrecer mayor cantidad de información a los interesados en los temas inherentes a la revista. Por este motivo, estamos trabajando para que Acta Toxicológica Argentina llegue a diferentes ambientes académicos, gubernamentales, empresariales y profesionales de todo el país y del extranjero, a fin de que pueda ser considerada para la publicación de resultados de investigaciones y observaciones en los diferentes campos de la Toxicología.

Todos los investigadores estamos presionados para publicar en revistas de alto impacto o en aquellas indexadas en bases de datos de alto prestigio. Esto es una realidad sobre la cual se pueden realizar muchas disquisiciones éticas y prácticas. Sin embargo, voluntaria o involuntariamente todos nos vemos sumergidos en esta tendencia, que en muchos casos debemos respetar, requisito sine qua non, para nuestro mismo mantenimiento institucional. Pero, en este sentido, debemos considerar que la difusión del conocimiento en los campos específicos no siempre está asociada al impacto de la revista. La accesibilidad a los trabajos en estos últimos años se ha tornado fundamental para todos los investigadores, en especial para los de aquellos países de escasos recursos. En este aspecto, Acta Toxicológica Argentina es un gran aporte para los investigadores dado que es de fácil accesibilidad. Además de distribuirse en papel, los trabajos publicados pueden consultarse libre y gratuitamente, mediante Internet en bases de datos como SciELO o directamente en la página de la Asociación Toxicológica Argentina ([www.ataonline.org.ar](http://www.ataonline.org.ar)).

A los investigadores que podrían estar presionados por el impacto o el tipo de bases de datos que registren sus trabajos, les pedimos que "apuesten" por la revista Acta Toxicológica Argentina. Así podremos lograr tener una revista nacional de toxicología, en la que se

pueda publicar en español y que sea reconocida por las bases de datos más solicitadas. Esto nos beneficiará a futuro a nosotros y a los estudiantes que nos sucederán.

Respecto de la recepción de trabajos, hemos habilitado una casilla de correo electrónico mediante la cual nos comunicaremos en forma directa con los autores a fin de agilizar y abaratar los procesos de recepción y revisión de los trabajos. Mantendremos el nivel de exigencia para la aceptación de trabajos pero sin descuidar la labor docente para los contribuidores jóvenes o inexpertos. Pretendemos solamente (ni más ni menos) que los toxicólogos confíen en nuestra revista para hacer conocer sus datos, y que “apuesten” de esa forma a su crecimiento, para elevar el prestigio nacional e internacional de Acta Toxicológica Argentina.

Esperando no defraudar a quienes confiaron en mí para este cometido, e invitando a todos a considerarnos como una de las elecciones posibles mediante las cuales su actividad profesional o sus investigaciones científicas puedan ser difundidas a la comunidad, el Comité de Redacción en pleno queda entonces en contacto permanente con todos ustedes, a la espera no sólo de sus aportes, sino de sugerencias o críticas para seguir el camino que conduzca a que la revista Acta Toxicológica Argentina llegue a ser una de las revistas de mayor prestigio en nuestro país y en el ambiente Toxicológico.

Atentamente,

Dr. Adolfo Rafael de Roodt  
Director

## INVESTIGACIÓN DE COCAÍNA Y MARIHUANA EN MECONIO DE NEONATOS ATENDIDOS EN UN HOSPITAL PÚBLICO. PRIMERA EXPERIENCIA REALIZADA EN LA CIUDAD DE CÓRDOBA, ARGENTINA

Suárez, Andrés; Peirano, Alberto; González, Inés; Odierna, Edgar; Gait, Nilda; Llebeilli, Ruth; Hansen, Cristian\*

Laboratorio LACE SA. Vélez Sarsfield 562, Ciudad de Córdoba, Córdoba, Argentina (5000).

Teléfono: 0351-4246666. Fax: 0351-4218013.

\* Correspondencia: [cristian\\_hansen@hotmail.com](mailto:cristian_hansen@hotmail.com)

**Resumen:** INVESTIGACIÓN DE COCAÍNA Y MARIHUANA EN MECONIO DE NEONATOS ATENDIDOS EN UN HOSPITAL PÚBLICO. PRIMERA EXPERIENCIA REALIZADA EN LA CIUDAD DE CÓRDOBA, ARGENTINA. Andrés Suárez; Alberto Peirano; Inés González; Edgar Odierna; Nilda Gait; Ruth Llebeilli; Cristian Hansen. *Acta Toxicol. Argent. (2009) 17 (2): 41-47*. Se investigaron cocaína y marihuana en meconio de neonatos nacidos en la Maternidad Provincial de la Ciudad de Córdoba y se relacionaron los resultados con las semanas de gestación y los pesos al nacer. Las determinaciones se realizaron utilizando inmunoensayo y cromatografía gaseosa-espectrometría de masas. Se analizaron 48 muestras de meconio recolectadas durante un año (2007-2008). De los 48 meconios analizados, 17 correspondieron a neonatos masculinos y 31 a neonatos femeninos. Se procesaron en paralelo 15 muestras de meconio como controles normales (niños no expuestos a drogas) seleccionados por historia clínica y controles prenatales. De las 48 muestras de meconio 13 fueron positivas para cocaína y/o marihuana. El peso y las semanas de gestación de los neonatos cuyas muestras fueron positivas se compararon frente a un grupo control normal, hallándose mayores diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0,05$  -  $p<0,0001$ ) en relación a los pesos al nacer. Estos resultados, a pesar del reducido número de casos analizados, resaltan la importancia de la investigación de drogas de abuso en meconio, lo que permite confirmar el uso de drogas por parte de la madre durante el período gestacional temprano, y de ese modo interpretar las alteraciones (déficit de peso) observadas en el neonato al nacer, atribuibles al consumo de drogas durante la gestación.

**Palabras clave:** Cocaína; Marihuana; Meconio; Exposición prenatal; Córdoba; Argentina.

**Abstract:** SCREENING OF COCAINE AND MARIJUANA IN MECONIUM OF NEWBORNS FROM A PUBLIC HOSPITAL OF CITY OF CÓRDOBA, ARGENTINA. Andrés Suárez; Alberto Peirano; Inés González; Edgar Odierna; Nilda Gait; Ruth Llebeilli; Cristian Hansen. *Acta Toxicol. Argent. (2009) 17 (2): 41-47*. We investigated cocaine and marijuana in meconium of newborns attended at the Hospital Materno Provincial of Córdoba City and the results were correlated with birthweight and weeks of pregnancy. The samples were analyzed using immunoassay (FPIA) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for confirmation. Forty eight samples of meconium were collected during one year period (2007-2008). Of the 48 samples screened, 17 correspond to masculine sex and 31 to feminine. Fifteen samples of meconium from normal newborns (newborns not exposed to drugs) selected by maternal self report, pregnancy controls were processed as control group. The results obtained in 48 samples of meconium showed 13 cases tested positive for cocaine and/or marijuana. Birth weight and weeks of gestation of newborn with positive sample results were compared with a control group. A statistically significant difference ( $\alpha= 0.05$  -  $p<0.0001$ ) was found in relation to birth weight. Although these results arise from a small number of samples, these data have relevance in public health and show the importance of the screening of drugs of abuse in meconium to confirm use in mothers during pregnancy and to interpret the alterations observed in the newborn after delivery as consequence of drug use in prenatal period.

**Keywords:** Cocaine; Marijuana; Meconium; Gestational exposure; Córdoba, Argentina.

### INTRODUCCIÓN

El problema del abuso de drogas en mujeres embarazadas y sus complicaciones en el feto y neonatos han recibido amplia atención en los últimos 30 años, debido principalmente a que el uso de drogas de abuso, legales y no legales, ha ido en aumento, en especial, en el grupo de mujeres en edad fértil y gestantes. En este segmento poblacional el problema se agrava porque por lo general la gestante consumidora de drogas no utiliza una única sustancia, sino

que con frecuencia asocia varias drogas simultáneamente, consume tabaco/alcohol, está mal nutrida, padece de infecciones y no recibe adecuado control durante el embarazo (1).

Es sabido que la utilización de drogas por la mujer durante el período gestacional conlleva a una situación de riesgo para sí misma y para el organismo en formación. Así, la exposición prenatal a drogas se asocia a un amplio rango de complicaciones obstétricas y alteraciones físicas y neuroconductuales que se tornan eviden-

tes en la primera infancia (1-9). A este respecto, se ha reportado que más del 75% de los niños expuestos gestacionalmente a drogas han tenido problemas de salud en comparación al 27% de los niños nacidos no expuestos (10). Asimismo, las complicaciones obstétricas fueron mayores en madres consumidoras de drogas, por lo que la detección temprana de este problema ayudaría a disminuir o incluso evitar tanto los efectos nocivos sobre la salud de la madre, del feto o del recién nacido, los problemas sociales que esto trae aparejado así como los costos que generan para la salud pública (10). Numerosas evidencias indican que las drogas consumidas por la madre pueden atravesar la barrera placentaria y exponer al feto de forma pasiva a la acción de la droga y/o sus metabolitos, lo cual lo condiciona a padecer síndrome de abstinencia in útero o en el momento del parto, así como a sufrir numerosas complicaciones asociadas (2,4,11-13). Entre los problemas documentados en los recién nacidos se ha observado aborto, muerte intrauterina, malformaciones, bajo peso, prematuridad, sufrimiento fetal, síndrome de abstinencia agudo, subagudo o crónico, infecciones verticales, ruptura prematura de membranas, asfixia, infarto cerebral, patrones de respiración y cardíacos anormales, etc. (5). Los métodos utilizados para conocer la prevalencia del consumo de drogas de la mujer gestante comenzaron con auto reportes maternos o encuestas, que luego eran utilizados como instrumentos de pesquisa para valorar la exposición prenatal a drogas. En la actualidad el laboratorio de toxicología ha tomado un rol protagónico identificando la presencia de drogas y/o metabolitos de drogas de abuso en matrices biológicas alternativas (faneras o meconio). El meconio es la matriz a elegir en la búsqueda de exposición prenatal a drogas. El meconio es la primera deposición del neonato y constituye la matriz donde se acumulan las drogas a las que el recién nacido ha estado expuesto ya sea por deposición directa a través de la bilis o mediante la ingestión de líquido amniótico. Se sabe que el meconio comienza a formarse en el segundo trimestre del embarazo y, además, las drogas acumuladas en esta matriz no sufren procesos importantes de degradación. Por lo tanto, la presencia de drogas en meconio ha sido propuesta como indicador de exposición de los últimos seis meses de gestación, brindando una ventana diagnóstica más amplia que la orina. Además sus ventajas consisten en que es más fácil de

recolectar, las cantidades obtenidas son generalmente suficientes para un análisis completo de identificación y confirmación de drogas y su obtención constituye un muestreo no invasivo (10,14-17). En base a estos antecedentes el propósito del presente trabajo fue identificar cocaína y marihuana en meconio de neonatos cuyas madres habían sido consideradas clínicamente sospechosas de haber consumido algún tipo de drogas, para destacar la importancia del análisis toxicológico como elemento confirmatorio del diagnóstico presuntivo realizado por el médico y para contar con datos epidemiológicos locales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Reactivos y equipamiento**

El agua destilada grado HPLC, el metanol grado HPLC y el cloroformo p.a. fueron marca Sintorgán. Las columnas de extracción de drogas fueron marca Extrelut de Merck. El buffer fosfato pH=7,2 fue provisto por Abbott para los kits de inmunodiagnóstico. Los reactivos de diagnóstico para inmunofluorescencia polarizada -cocaína y marihuana (THC)- fueron provistos por Abbott de Argentina. Se utilizó un autoanalizador AXSYM para el análisis. Los reactivos derivatizantes fueron BSTFA (N,O-bis(trimetil silyl)trifluoroacetamida con 1% de trimetilclorosilano (TMCS) provisto por Sigma-Aldrich de Argentina. Para la confirmación de las drogas derivatizadas (cocaína, benzoilecgonina y delta-9-tetrahidrocannabinol) se utilizaron las bibliotecas espectrales NIST y SATURN incluidas en el software del cromatógrafo gaseoso Varian CP-3800 con detector por espectrometría de masas Ion Trap Varian Saturn 2000. Las columnas capilares Varian FactorFour VF-5ms 30 m x 0,25 mm ID DF=0,25 fueron provistas por Varian Argentina.

### **Procedencia de las muestras**

Se analizaron 48 muestras de meconio remitidas al laboratorio en cadena de frío por el Hospital Materno Provincial de la Ciudad de Córdoba, recolectadas en el período de un año (2007-2008). De los 48 meconios analizados, 17 correspondieron a neonatos de sexo masculino y 31 a neonatos de sexo femenino. En todos los casos las muestras fueron obtenidas por pedido médico en base a la sospecha clínica de exposición a drogas de abuso en la madre y/o el niño por lo cual no fue necesario el consentimiento escrito de la madre además de ser esta matriz un material de des-

carte (\*). Las muestras de meconio obtenidas fueron almacenadas a  $-20^{\circ}$  C hasta su análisis para la búsqueda de cocaína y marihuana. Junto a estas muestras fueron procesadas en paralelo 15 muestras de meconio como controles normales (niños no expuestos a drogas, con resultados negativos para las drogas investigadas) seleccionados por historia clínica y controles prenatales. La prueba estadística de T de Student fue realizada con el Software Infostat/Estudiantil Versión 2.0.

### Análisis de meconio

Las muestras de meconio fueron analizadas por duplicado usando una fracción de ensayo de 0,5 gramos para cada prueba. Las extracciones se realizaron en 5 ml de metanol y posteriormente fueron agitadas en agitador mecánico por 30 segundos y centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se filtró en papel Whatman N° 40 y se evaporó con nitrógeno para su posterior reconstitución en 1,0 ml de buffer fosfato 0,1 M (pH 7,2). Una alícuota de 0,5 ml se separó para ser procesada por inmunoensayo de fluorescencia polarizada siguiendo el protocolo provisto por el fabricante (FPIA, Abbott AxSYM). Con la otra fracción se procedió a la extracción líquido-líquido en columnas Extrelut (Merck) y se eluyó con 10 ml de cloroformo. El eluato fue evaporado bajo corriente de nitrógeno y derivatizado con 50  $\mu$ l de BSTFA (conteniendo 1% TMCS) a  $70^{\circ}$ C por 20 minutos. Un microlitro (1  $\mu$ l) se inyectó en el cromatógrafo gaseoso con detección por es-

pectrometría de masas (GC-MS, Varian Saturn 2000) bajo el modo SIS (single ion scanning). Los resultados obtenidos por inmunoensayo fueron confirmados por cromatografía gaseosa con espectrometría de masas.

### RESULTADOS

En la *Tabla 1* se presentan los datos de las 48 muestras analizadas estratificadas por los pesos (18) del neonato y el número de muestras positivas encontradas.

De las 13 muestras positivas (27% del total de muestras analizadas), el 46% correspondió a cocaína (6 casos), el 46% a marihuana (6 casos) y 1 caso (8%) a la combinación de cocaína y marihuana. Al analizar los porcentajes de casos positivos en relación a los pesos, se observó que los neonatos con pesos menores a 2.500 gramos, presentan una positividad del 57,14% respecto de los neonatos con pesos mayores a 2.500 gramos, lo que sugiere una fuerte correlación entre consumo materno y bajo percentil de peso.

El *Gráfico 1* presenta los resultados positivos y negativos de los 48 meconios analizados distribuidos en función del peso del neonato. Este gráfico ayuda a visualizar la proporción de casos positivos en neonatos cuyos pesos son menores a 2501 gramos lo que podría sugerir una vulnerabilidad para el normal desarrollo del neonato ante la exposición a estas drogas durante el período gestacional y a su vez complementa la interpretación de resultados mostrados en la *Tabla 1*.

**Tabla 1.** Clasificación de muestras en función del peso del neonato y resultados de drogas de abuso (cocaína y marihuana).

Peso en gramos (**)	DAM (-) / DAM (+)		N° de muestras	COC-THC			Peso en gramos (**)	Porcentaje de DAM (+)
	DAM (-)	DAM (+)		COC (+)	THC (+)	COC-THC (+)		
1500 - 2000	2	2	4	0	2	0	< a 2500	57,14%
2001 - 2500	4	6	10	5	1	0		
2501 - 3000	24	3	27	1	2	0	> a 2500	14,71%
> a 3000	5	2	7	0	1	1		
Totales	35	13	48	6	6	1		

DAM: drogas de abuso en meconio; COC: cocaína; THC: marihuana.  
(\*\*) En base a Barry M. Lester, 2001 (18).

(\*) Es una obligación ético-legal del médico solicitar una prueba diagnóstica para ayudar al estudio de la afección del paciente. En este caso se solicitó como prueba diagnóstica la detección de drogas de abuso en una matriz no invasiva (meconio), y a los efectos de cumplir con los requisitos de formalidad y registro de los pedidos diagnósticos en el Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de la Ciudad de Córdoba adonde fueron derivadas las muestras para su screening inicial. Además, este tipo de muestreo corresponde a un estudio epidemiológico no vinculante, por lo que no hubiera sido necesario que sea evaluado por un comité de ética institucional. No obstante se consultó con los Comités de ética de las Instituciones intervinientes para proceder correctamente en la realización de este estudio.

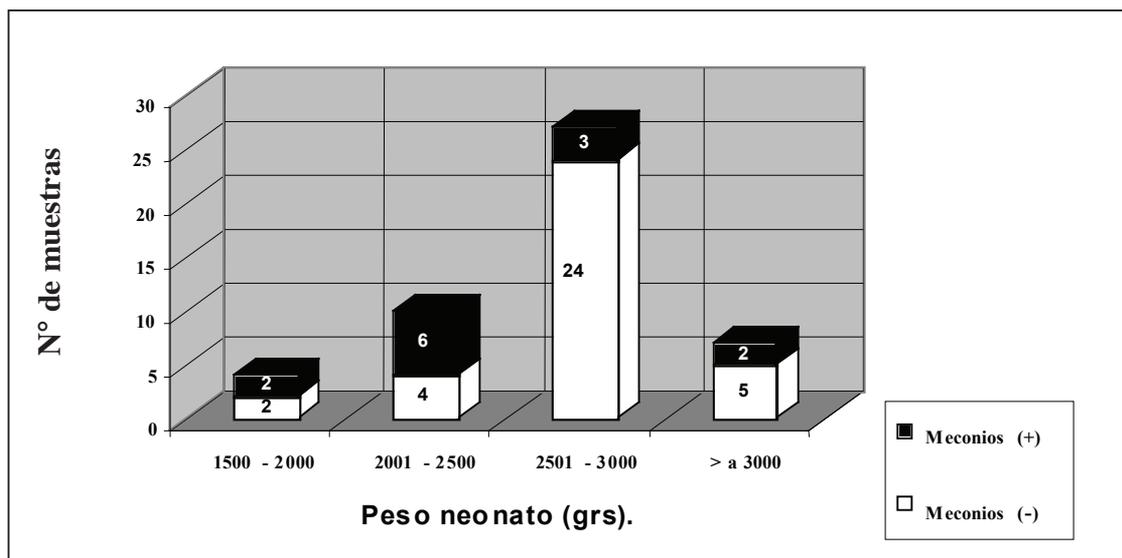


Gráfico 1. Proporción de casos positivos y negativos en función del peso del recién nacido

En la *Tabla 2* se presenta la estadística descriptiva (medias y errores) de los pesos de los recién nacidos y semanas de gestación de las 48 muestras analizadas, a los efectos de discriminar entre grupos de meconios positivos y meconios negativos, puesto que el grupo de

meconios negativos no es válido como grupo control ya que solo se investigaron dos sustancias (cocaína y marihuana) no pudiendo comprobarse el consumo de otras sustancias y/u otros factores de vulnerabilidad que puedan afectar las variables estudiadas.

Tabla 2. Parámetros estadísticos de las variables tiempo gestacional y peso neonato en función de resultados positivos (P) y negativos (N) en meconio.

<u>Resultado de Drogas</u>	<u>Resumen</u>	<u>Tiempo Gestacional (semanas)</u>	<u>Peso neonato (gr)</u>
N	n = 35		
N	<b>Media</b>	<b>38,51</b>	<b>2814,57</b>
N	D.E.	1,38	390,18
N	Mín	34,00	1880,00
N	Máx	40,00	4200,00
N	<b>Mediana</b>	<b>39,00</b>	<b>2870,00</b>
P	n = 13		
P	<b>Media</b>	<b>36,92</b>	<b>2397,69</b>
P	D.E.	1,75	451,74
P	Mín	33,00	1850,00
P	Máx	40,00	3200,00
P	<b>Mediana</b>	<b>37,00</b>	<b>2300,00</b>

En la *Tabla 3* se presentan los parámetros estadísticos de la población con meconios po-

sitivos (13 casos) y las muestras controles (15 casos).

**Tabla 3.** Estadística descriptiva de las variables peso del neonato y semanas de gestación del grupo cuyas muestras de meconio mostraron resultado positivo a drogas (DAM) y del grupo control (no expuestos a drogas).

<i>n</i>	Grupo control		Grupo DAM positivo	
	<i>15</i>	<i>15</i>	<i>13</i>	<i>13</i>
<b>Resumen</b>	<b>PesosCtrl</b>	<b>SemCtrl</b>	<b>PesosMtra</b>	<b>SemMtra</b>
<b>Media</b>	<b>3201,33</b>	<b>38,73</b>	<b>2397,69</b>	<b>36,92</b>
<b>D.E.</b>	258,84	0,96	451,74	1,75
<b>Mín</b>	2890,00	37,00	1850,00	33,00
<b>Máx</b>	3700,00	40,00	3200,00	40,00
<b>Mediana</b>	<b>3100,00</b>	<b>39,00</b>	<b>2300,00</b>	<b>37,00</b>

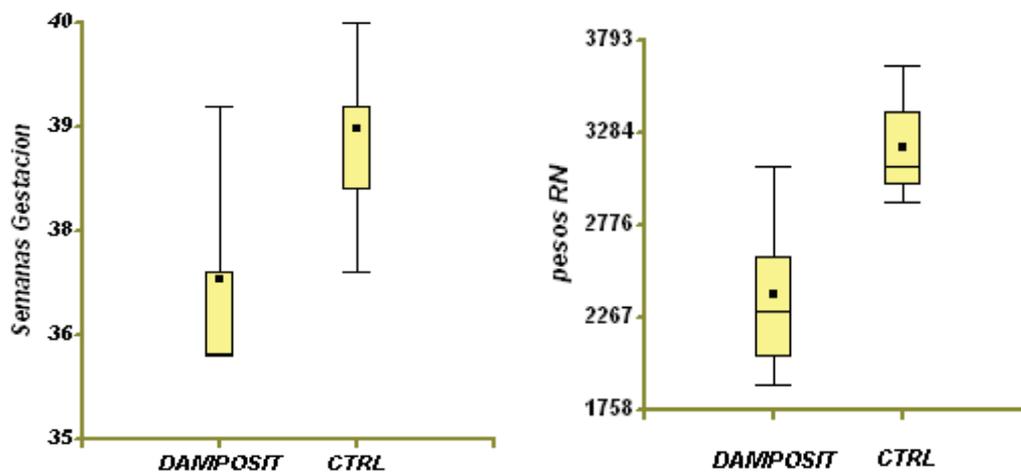
PesosCtrl: Pesos de neonatos del grupo control; SemCtrl: semanas de gestación de neonatos del grupo control; PesosMtra: pesos de neonatos con meconio positivo a drogas; SemMtra: semanas de gestación de neonatos con meconio positivo a drogas.

Al comparar estadísticamente estos dos grupos (expuestos y no expuestos a las drogas investigadas) en función de los pesos al nacer, se observaron diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ;  $p<0,0001$ ).

Al comparar las semanas de gestación del grupo de neonatos con meconios positivos a dro-

gas con el grupo control también se observaron diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ;  $p=0,0039$ ).

En el *Gráfico 2* se muestra la distribución de las semanas de gestación y los pesos para los dos grupos analizados (expuestos y no expuestos).



**Gráfico 2.** Análisis comparativo del grupo de neonatos con resultados positivos para drogas en meconio y un grupo control (no expuesto). Variables analizadas: semanas de gestación y pesos del neonato en gramos (RN: recién nacido).

## DISCUSIÓN

Los datos obtenidos muestran la alta prevalencia (27%) de consumo de drogas (cocaína y marihuana) en mujeres en período de gestación que concurren a ese centro asistencial y que podrían ser consideradas clínicamente adictas. Este aspecto debe ser considerado, puesto que las muestras fueron elegidas sesgadamente en base a sospechas de consumo en madres a partir de una evaluación médica

al momento del parto. Dado el pequeño tamaño de la población en estudio y la carencia de datos clínicos obtenidos a partir de controles prenatales periódicos, no se pudieron sacar conclusiones acerca de los posibles efectos prenatales de las drogas estudiadas en este trabajo. No obstante, se encontraron diferencias en aquellos neonatos con meconios positivos a drogas, con respecto al grupo control no expuesto, observando diferencias estadísti-

camente significativas en relación a los pesos y al tiempo de gestación, tal como lo describe la bibliografía (5). En este trabajo, la diferencia fue más significativa en la comparación de los pesos de los neonatos de ambos grupos.

Estos datos constituyen el primer reporte de análisis de drogas de abuso en meconio en Latinoamérica, y por ello poseen relevancia para la Salud Pública constituyendo un aporte importante y original para la toma de conciencia de las agencias gubernamentales encargadas del control y la prevención del consumo de drogas en mujeres en edad de procrear. Es de destacar que este tipo de análisis toxicológico, intenta obtener una evaluación real de la exposición fetal a drogas de abuso para la identificación de niños en riesgo y para proveer tratamiento temprano y seguimiento. Además, con los datos obtenidos por la metodología utilizada en este trabajo, se podrían confeccionar estadísticas más ajustadas a la realidad, que permitan optimizar la tarea de la Salud Pública y alertar sobre la incidencia de la exposición a drogas de abuso en la población, logrando así la detección temprana de los efectos nocivos en esta población vulnerable y su impacto en la salud.

#### Agradecimiento

Este trabajo fue realizado con aportes provenientes de los autores. Agradecemos al laboratorio LACE por su apoyo permanente a la formación de bioquímicos toxicólogos y a la desinteresada colaboración del Prof. Dr. Otto Orshinger y a la Dra. Miriam Virgolini por su aporte en la discusión y traducción del trabajo.

#### BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Hutson, J. (2006). A prenatal perspective on the cost of substance abuse in Canada. *J FAS Int.* 4(9). [en línea]. Disponible en [http://www.motherisk.org/JFAS\\_documents/jfas\\_6006\\_e9.pdf](http://www.motherisk.org/JFAS_documents/jfas_6006_e9.pdf). (consulta: noviembre de 2008).
2. Echeverría Lecuona, J. (2003). Drogas en el embarazo y morbilidad neonatal. *An Pediatr.* 58(6), 519-522.
3. Botella Calvo, H. (2004). Maternidad, infancia y drogas: implicaciones clínicas. *Adicciones* 16 (4), 295-314.
4. Chiriboga, C.; Brust, J.; Bateman, D.; Allen Hauser, W. (1999). Dose-response effect of fetal cocaine exposure on newborn neurologic function. *Pediatrics.* 103, 79-85.
5. Solís Sanchez, G.; Solís Sanchez J.; Díaz González, T. (2001). Exposición prenatal a drogas y efectos en el neonato. *Trastornos Adictivos* 3(4); 256-262.
6. Black-Delaney, V.; Covington, Ch.; Templin, T.; Ager, J.; Martier, S.; Sokol, R. (1998). Prenatal cocaine exposure and child behaviour. *Pediatrics.* 102(4), 945-950.
7. Scher, M.; Richardson, G.; Day, N. (2000). Effects of prenatal cocaine/crack and other drug exposure on electroencephalographic sleep studies at birth and one year. *Pediatrics.* 105, 39-48.
8. Law, K.; Stroud, L.; LaGasse, L.; Niaura, R.; Liu, J.; Lester, B. (2003). Smoking during pregnancy and newborn neurobehavior. *Pediatrics.* 111(6), 1318-1324.
9. Ostrea, E.M.; Mantaring, J.; Silvestre, M. (2004). Drugs that affect the fetus and newborn infant via the placenta or breast milk. *Pediatr Clin N Am.* 51, 539- 579.
10. Lozano, J.; García-Algar, O.; Vall, O.; de la Torre, R.; Scaravelli, G.; Pichini, S. (2007). Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. *Ther Drug Monitoring.* 29(6), 711- 733.
11. Committee on Drugs. (1998). Neonatal Drug Withdrawal. *Pediatrics.* 101(6), 1079-1088.
12. Díez-Delgado Rubio, J.; Belmonte Martín, B.M.; Chamizo Moreno, B.; Ortega, M.A.; Espín Gálvez, J.; Martínez, A. (2001). Análisis descriptivo del síndrome de abstinencia neonatal en nuestro medio. *Rev. Esp. Pediatr.* 57(6), 491-496.
13. Feng, T. (1993). Substance Abuse in Pregnancy. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 5(1), 16-23.
14. Kwong, T.C.; Ryan, R.M. (1997). Detection of intrauterine illicit drug exposure by newborn drug testing. *Clin Chem.* 43(1), 225-242.
15. Huestis, M.A.; Choo, R.E. (2002). Drugs abuse's smallest victims: in utero drug exposure. *Forensic Science International* 128, 20-30.

**16.** Bar-Oz, B.; Klein, J.; Karaskov, T.; Koren, G. (2003). Comparison of meconium and neonatal hair analysis for detection of gestational exposure to drugs of abuse. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* 88, F98-F100.

**17.** Alano, M.A.; Ngougma, E.; Ostrea Jr, E.M.; Ganesh Konduri, G. (2001). Analysis of nonsteroidal antiinflammatory drugs in meconium and its

relation to persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* 107, 507-523.

**18.** Lester, B.M.; ElSohly, M.; Wright, L.L.; Smeriglio, V.L.; Verter, J.; Bauer, Ch.R.; Shankaran, S.; Bada, H.S.; Chip Walls, H.; Huestis, M.A.; Finnegan, L.P.; Maza, P.L. (2001). The Maternal Lifestyle Study: Drug Use by Meconium Toxicology and Maternal Self-Report. *Pediatrics*. 107, 309-317.

## OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN METODOLÓGICA DE LA CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO POR INYECCIÓN EN FLUJO-GENERACIÓN DE HIDRUROS- ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (IF-GH-EAA) PREVIA DERIVATIZACIÓN CON L-CISTEÍNA

Navoni, Julio A.; Olivera, Nancy M.; Villaamil Lepori, Edda C.

Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Laboratorio de Aseoramiento Toxicológico Analítico (CENATOXA) Junín 956 7o piso, (1113) Buenos Aires, Argentina. Tel/fax: 54-11-4964-8283, 54-11-4964-8284.

jnavoni@ffyb.uba.ar

**Resumen:** OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN METODOLÓGICA DE LA CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO POR INYECCIÓN EN FLUJO-GENERACIÓN DE HIDRUROS- ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (IF-GH-EAA) PREVIA DERIVATIZACIÓN CON L-CISTEÍNA. Julio A. Navoni; Nancy M. Olivera; Edda C. Villaamil Lepori. *Acta Toxicol. Argent. (2009) 17 (2): 48-54*. El arsénico (As) es un contaminante natural que afecta una amplia zona de Argentina. El nivel de As en agua de consumo es utilizado para evaluar la fuente de exposición y en orina para evaluar exposición a este tóxico.

El presente trabajo tuvo como objetivo la optimización y validación metodológica de una técnica para la cuantificación de As [As suma = As inorgánico (AsI) + especies metiladas: ácido monometilarsónico (MMA) y ácido dimetilarsínico (DMA)], producto del metabolismo del AsI, por inyección en flujo- generación de hidruros- espectrometría de absorción atómica (IF-GH-EAA), previa derivatización con L-cisteína. La recuperación de las especies estudiadas: AsI (As<sup>III</sup> y As<sup>V</sup>), MMA y DMA fue cercana al 100% en todos los casos. Los límites de detección y cuantificación encontrados fueron para agua y orina: 2 y 3 µg/L; 5 y 8 µg/L respectivamente y el rango dinámico de trabajo establecido fue desde 5 a 75 µg/L, permitiendo cuantificar As en muestras de agua cercanos a los estándares internacionales vigentes para valores máximos de As en agua de consumo y en orina en niveles comparables con los establecidos en población laboralmente no expuesta. Esta propuesta metodológica es una alternativa para evaluar la exposición al As en muestras de agua y orina, sin necesidad de utilizar prolongados pre-tratamientos de muestra, de forma más rápida y económica.

**Palabras claves:** Arsénico; Validación metodológica; Generación de hidruros, Monitoreo biológico.

**Abstract:** OPTIMIZACIÓN AND VALIDATION METHOD FOR ARSENIC QUANTIFICATION BY FLOW INJECTION-HYDRIDE GENERATION - ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY (FI-HG-AAS) AFTER L-CYSTEINE DERIVATIZATION. Julio A. Navoni; Nancy M. Olivera; Edda C. Villaamil Lepori. *Acta Toxicol. Argent. (2009) 17 (2): 48-54*. Arsenic (As) is a natural contaminant that affects a large area of Argentina. Quantification of As in drinking water has been used to evaluate the source of exposure and As in urine to assess exposure to this toxic.

This study aimed to optimize and validate a methodological technique for the quantification of As [As sum = inorganic As (AsI) + methylated species: monometilarsonic acid (MMA) and dimetilarsinic acid (DMA)], product of AsI metabolism by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry (FI-HG-AAS), after derivatization with L-cysteine. The recovery of the studied species: AsI (As<sup>III</sup> and As<sup>V</sup>), MMA and DMA was close to 100% in all cases. The limits of detection and quantitation were found for water and urine: 2 and 3 µg/L; 5 and 8 µg/L respectively and a linear working range from 5 to 75 µg/L, allowing quantify As in water close to international standards of maximum As values for drinking water and urine samples with levels comparables with those found in people non exposed occupationally. This methodology is a valid alternative for assessing exposure to As in water and urine samples without the need of prolonged pre-treatment sample, more quickly and inexpensively.

**Keywords:** Arsenic; Method validation; Hydride generation; Biological monitoring

### INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es un elemento ampliamente distribuido en el ambiente. Las especies inorgánicas de este elemento son las principales formas químicas presentes en el agua subterránea, de superficie, suelo y también en la mayoría de los alimentos (1).

La exposición a As inorgánico a través de la dieta puede provocar efectos adversos sobre la salud que incluyen cáncer de piel, vejiga y pulmón. Varios países como India, China, Taiwán, México, Chile y la Argentina, presentan zonas endémicas de hidroarsenicismo,

existiendo en la actualidad millones de personas expuestas a concentraciones elevadas de As a través del agua, consideradas perjudiciales para la salud (2-4).

En la Argentina, al menos 2 millones de personas consumen agua con contenidos de As superiores a los valores máximos permisibles (4,5). La cuantificación de As en muestras de agua de consumo ha sido útil para evaluar las fuentes de exposición a este elemento (5,6). Entre los marcadores de dosis efectiva de exposición, la cuantificación de As urinario (AsU) es considerada la mejor herramienta disponible para establecer exposición reciente a este contaminante (7,8). La mayoría de las técnicas utilizadas en la actualidad para la determinación de AsU requieren una mineralización previa de la muestra (9-12). Mediante este tratamiento se produce la destrucción total de la materia orgánica presente llevando el As total a su máximo estado de oxidación en su forma inorgánica. La presencia, en alimentos producto de la pesca, de arsenobetaina (AsB) o de arsenocolina (AsC) (especies de nulo o muy bajo impacto toxicológico) puede llevar a sobreestimar el contenido de AsU proveniente del consumo de As inorgánico a través de la dieta (13). Por este motivo, cuando se aplica la metodología antes señalada la interpretación del resultado requiere información adicional acerca de los hábitos alimenticios del paciente.

En la bibliografía se describen metodologías capaces de cuantificar selectivamente el As total, producto del metabolismo del As inorgánico, a fin de evitar posibles sobreestimaciones (14-16). Sin embargo, este tipo de metodologías analíticas no prosperaron, debido al advenimiento de las técnicas de especiación, pudiendo ser alternativas para aquellos laboratorios que no cuentan con la infraestructura necesaria para implementar procedimientos de especiación. El objetivo de este trabajo fue optimizar y validar una metodología que permita cuantificar selectivamente el contenido de As inorgánico (AsI), (As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>) en muestras de agua y del producto del metabolismo del AsI en muestras de orina (As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, MMA y DMA).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Todos los reactivos sólidos y líquidos fueron de grado analítico. El ácido monometilarsónico fue provisto por Chem Service EEUU. El ácido dimetilarsínico fue provisto por Sigma, St Louis, MO, EEUU. Los estándares de As<sup>III</sup> y As<sup>V</sup> jun-

to con el ácido clorhídrico, el tetrahidrobórato de sodio, el hidróxido de sodio y la L-cisteína fueron provistos por Merck Química Argentina. El nitrógeno, aire y acetileno fueron de calidad ultrapura provistos por INDURA S.A. Para todos los procesos se empleó agua desionizada (18,2 MΩ cm).

### Equipamiento

La cuantificación de As fue realizada usando un espectrómetro de absorción atómica (EAA) (modelo AA 475, Varian®) equipado con un generador de hidruros (GH) (VGA77, Varian®) y una celda de cuarzo calentada con una llama de aire/acetileno. La inyección en flujo de muestras y estándares fue realizada utilizando un sistema de inyección manual (Reodyne 7125) provisto con un lazo de inyección de 200 µL, acoplado al generador de hidruros. Las señales espectrométricas obtenidas fueron recolectadas *on line* y analizadas utilizando un software para análisis de datos cromatográficos Chromquest™ Chromatography Workstation, Thermo Quest, USA.

### Determinación de AsI

As inorgánico (As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>) y sus formas metiladas, MMA y DMA. El análisis del contenido de As en orina así como en agua fue realizado por inyección en flujo -generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica (IF-GH-EAA), metodología desarrollada a partir de los trabajos descritos por Guo y col. (1997) (14), Le y col. (1994) (15) y Carrero y col. (2001) (16). Fundamento: el procedimiento se basa en que el arsénico inorgánico (As<sup>III</sup> + As<sup>V</sup>) y los metabolitos metilados (MMA + DMA) son especies arsenicales que generan arsinas cuando éstas son sometidas a un medio ácido y reductor, formando las respectivas arsinas con velocidades de reacción diferentes entre sí. El As al reaccionar previamente con la L-cisteína en medio ácido, origina compuestos tioderivados que generan arsinas a velocidades similares lo cual permite la cuantificación de la suma de ellos sin la sobreestimación o subestimación de otras especies. La AsB y AsC, especies arsenicales presentes en alimentos productos de la pesca y de nulo impacto toxicológico, no generan arsinas en las condiciones señaladas y por ende no son capaces de dar una señal espectral que pueda llevar a la sobreestimación del contenido de As de importancia toxicológica. Los tioderivados formados reaccionan con NaBH<sub>4</sub> y HCl para generar las correspondientes arsinas que son arrastradas por una corriente

de N<sub>2</sub> hacia una celda abierta de cuarzo que es calentada por una llama, produciéndose la descomposición de las mismas, liberándose el As que pasa a estado fundamental (As<sup>0</sup>) capaz de absorber a la longitud de onda característica del elemento.

#### **Condiciones espectrométricas**

Las condiciones instrumentales del espectrómetro de absorción atómica fueron: longitud de onda 193,7 nm; apertura de rendija de 0,5 nm; fuente de energía, lámpara de cátodo hueco de As a una intensidad de corriente de 6 mA.

#### **Soluciones estándar, muestras de orina y materiales de referencia certificados**

Se prepararon soluciones stock de cada especie del arsénico estudiada en una concentración final de 1000 µg/L en solución acuosa. Dichas soluciones fueron utilizadas para la preparación de las soluciones de trabajo y de las muestras de orina fortificadas con cada una de las especies por separado, logrando concentraciones finales de cada analito de 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 y 100,0 µg/L.

La muestra de orina, utilizada como matriz, estuvo constituida por un pool de orinas recolectadas de voluntarios clínicamente sanos no expuestos al As. Todas las soluciones, blancos de orina y muestras cargadas fueron conservadas a 4° C hasta el momento de su análisis.

La veracidad del proceso fue examinada con materiales certificados de referencia: EP-H-2 (EnviroMAT Drinking Water) lote SC181305 y Lyphochek® nivel 2 (Biorad) lote 69121 para agua y orina respectivamente.

#### **Derivatización de soluciones estándares/ muestras de agua y orina**

Alícuotas de estándares acuosos, muestras de agua y orina y materiales de referencia certificados (0,5 mL), fueron derivatizados por medio del agregado de 0,5 mL de una solución de L-cisteína al 4% p/v en HCl 0,03M manteniéndolas durante 30 min a temperatura ambiente. Blancos de agua y orina fueron preparados separadamente siguiendo el procedimiento antes descrito.

#### **Validación metodológica**

Se tuvieron en cuenta los requerimientos de validación siguientes: robustez, recuperación, precisión, linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) y veracidad (17-19).

#### *Optimización de generación de hidruros*

Se establecieron las condiciones óptimas de generación de hidruros para cada especie ensayada. Los parámetros evaluados fueron: concentración del reductor (NaBH<sub>4</sub>) en concentraciones de 0,5; 1,0 y 1,5 % p/v, concentración del NaOH (como medio de dilución del reductor) en concentraciones de 0,05; 0,1 y 0,5 % p/v y concentración del medio ácido (HCl) en concentraciones de 0,01; 0,05; 0,1 y 0,2 Molar, sobre muestras de orina blanco fortificadas con 100 µg/L de cada especie arsenical ensayada.

#### *Estabilidad de las soluciones estándares/ muestras*

La estabilidad a temperatura ambiente y a 4°C de las soluciones estándares/muestras y de estas luego de efectuada la derivatización fue estudiada.

#### *Recuperación*

Comparación interespecies de respuesta espectrométrica

Se investigó la respuesta espectral post derivatización de muestras de orina blanco fortificadas independientemente con cada especie a concentraciones de 10,0; 50,0 y 100,0 µg/L. La respuesta de detección hallada fue comparada con la lograda a partir de estándares acuosos de As<sup>V</sup> de similares concentraciones. La tasa de recuperación relativa a As<sup>V</sup> fue calculada.

#### *Precisión*

La precisión intra-ensayo (repetibilidad) incluyó la medición por quintuplicado del mismo estándar acuoso en concentraciones de 10,0; 50,0 y 75,0 µg/L de As<sup>V</sup> en el mismo día. La precisión inter-ensayo (reproducibilidad) incluyó la estimación de la variabilidad entre corridas de la misma muestra en las concentraciones arriba indicadas durante tres días consecutivos. El coeficiente de variación (CV%) fue calculado para cada caso.

#### *Linealidad de la curva de calibración*

Soluciones acuosas de As<sup>V</sup> en concentraciones finales de 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 y 100,0 µg/L fueron analizados por quintuplicado para evaluar la linealidad de la curva de calibración.

#### *Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)*

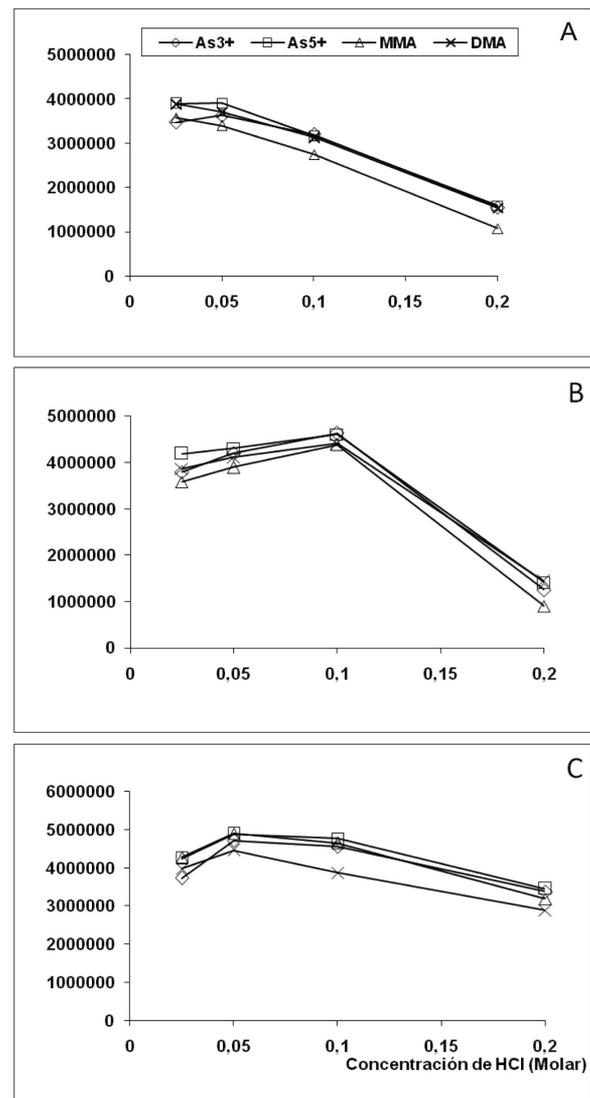
El LD definido como la menor concentración que un proceso analítico puede diferenciar

confiablemente del ruido instrumental, y el LC, definido como la menor concentración que puede ser medida con un nivel de confianza prefijado, se determinaron utilizando dos criterios. El primero define el LC como la menor concentración, ensayada por quintuplicado en una matriz determinada, que presenta menos del 20% de coeficiente de variación (CV%). El segundo criterio utilizado fue estimar estos parámetros por cálculo. El LD fue estimado a través de la inyección de blancos de agua destilada u orina, analizando el ruido de la línea de base del sistema y calculando el desvío estándar del blanco (SDB) para cada caso. El LD fue calculado como  $3\text{SDB}/m$  donde "m" es la pendiente de la curva de calibración. El LC fue calculado como  $10\text{SDB}/m$  (18-20).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El desarrollo analítico fue iniciado optimizando las condiciones de generación de hidruros para cada especie ensayada. Esta etapa es considerada el punto más crítico en la reproducibilidad impactando directamente en la robustez del método. El *Grafico 1* describe la respuesta de la generación de arsinas utilizando muestras de orina fortificadas con  $100\ \mu\text{g}/\text{L}$  de cada especie. Se pudo observar una amplia variabilidad de respuesta en las condiciones ensayadas. Para los tres niveles de reductor utilizados, se comprobó la mayor respuesta a concentraciones de ácido inferiores a  $0,1\ \text{M}$ . La concentración de ácido seleccionado fue la de  $0,05\ \text{M}$ . El nivel de reductor no incidió significativamente en la respuesta. Sin embargo, a la concentración de  $1,0\%$  p/v, se observó la menor variabilidad de respuesta interespecie (menor al 5%) indicando una cinética de reacción unificada. La concentración de hidróxido utilizado en la preparación del reductor no afectó significativamente la generación de hidruros (datos no presentados). Se seleccionó la menor concentración ensayada ya que ésta permitió, en el mismo tiempo de reacción, una formación de arsinas uniforme y menos violenta asegurando el correcto funcionamiento del separador gas líquido. Las condiciones óptimas de reacción (*Tabla 1*) estuvieron dentro del rango de condiciones descritas por otros autores (14-16).

En la bibliografía se indica la estabilidad de las especies estudiadas al ser conservadas a temperatura ambiente y  $4^\circ\text{C}$ , siendo mayor en ésta última condición (21). En esta experiencia



**Grafico 1.** Optimización de la generación de hidruros: efecto de la concentración de HCl y  $\text{NaBH}_4$  sobre la formación de arsinas.

Respuesta de detección utilizando orina blanco fortificada con  $100\ \mu\text{g}/\text{L}$  de cada especie. Resultados obtenidos con  $\text{NaBH}_4$  preparado en  $\text{NaOH}$   $0.05\%$  p/v. Concentración de  $\text{NaBH}_4$   $0,5\%$  (A),  $1,0\%$  (B) y  $1,5\%$  (C).

**Tabla 1.** Condiciones optimizadas de generación de hidruros.

Parámetro	
$\text{NaBH}_4$ (% p/v)	1,0
Solución de $\text{NaOH}$ (diluyente del $\text{NaBH}_4$ ) (% p/v)	0,05
Solución de HCl (Molar)	0,05
Volumen de inyección ( $\mu\text{L}$ )	200
Flujo ( $\text{mL min}^{-1}$ )	1,0

se evaluó la estabilidad a lo largo de un mes de preparadas las soluciones de trabajo y las muestras de orina fortificadas (datos no expuestos). No se observaron diferencias significativas dentro del período evaluado. Sin embargo, tanto las muestras como los estándares, luego de ser derivatizados presentaron una estabilidad de una semana en ambas condiciones, observándose posteriormente la aparición de un precipitado blanco, posiblemente como producto de oxidación de la L-cisteína. La derivatización con L-cisteína en medio ácido unifica la velocidad de reacción (15,16). Para ratificar esta observación, se analizó la recuperación relativa de las especies As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, MMA y DMA en muestras de orina fortificadas, respecto a soluciones acuosas de As<sup>V</sup>, la cual estuvo comprendida entre el 95 y el 105% para todo el rango de concentraciones ensayado (Tabla 2). De esta forma se ratificaron las observaciones realizadas por los autores antes citados (15,16). La paridad de los resultados obtenidos entre las distintas especies evidenció una cinética de reacción similar, además de ausencia de efecto matricial. Este hecho permitió la interpolación de muestras de agua y orina en curvas realizadas en medio acuoso. En la experiencia se ensayaron concentraciones desde 2,5 hasta 100 µg/L. En la Tabla 3 se

Tabla 2. Recuperación porcentual de especies arsenicales.

Concentración (µg/L)	As <sup>V</sup>	As <sup>III</sup>	MMA	DMA
10	100	105	101	98
50	100	97	95	98
100	100	102	95	99

La recuperación fue analizada comparando la respuesta de detección de las distintas especies en muestras de orina fortificadas con As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup>, MMA y DMA, con la obtenida con soluciones acuosas de As<sup>V</sup> de igual concentración.

Tabla 3. Parámetros de la curva de calibración.

Parámetro	AsI
Rango de concentración (µg/L)	5 - 75
Coefficiente de correlación	0,999±0,002*
Pendiente	47377±1035*
Intersección eje Y	19434±1236*

Datos obtenidos a partir de 5 curvas de calibración preparadas y procesadas independientemente

\*Resultados obtenidos expresados como promedio ± desvío estándar (DE).

describen los parámetros de curva de calibración. Los puntos de 10 y 5,0 µg/L estuvieron dentro de los criterios de una imprecisión menor del 15% y 20% para la aceptación como punto mínimo de la curva y como límite de cuantificación, respectivamente (17-19). El LD y LC fueron calculados como se describió previamente (Tabla 4). Los datos obtenidos por cálculo a partir de la dispersión encontrada en los

Tabla 4. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) calculado para cada matriz estudiada.

Matriz LD	AsI	
	LC	LC
Agua (µg/L)	2	5
Orina (µg/L)	3	8

blancos ensayados, fueron similares a los definidos a través del criterio de imprecisión anteriormente señalado. A partir de estos resultados se definió como límite de decisión la concentración de 10 µg/L lo cual permite la cuantificación de As a niveles de interés, desde el punto de vista regulatorio con respecto a valores de As máximos permitidos en muestras de agua, (4, 6, 20). Se estableció como concentración máxima de la curva al punto de 75 µg/L. El Gráfico 2 describe el ajuste lineal obtenido. La

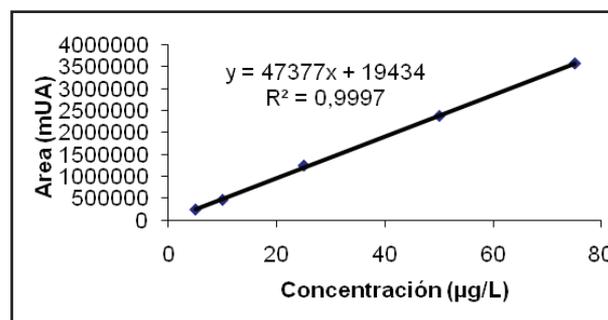


Gráfico 2. Curva de calibrado.

concentración de 100 µg/L fue eliminada debido a que se pudo establecer la saturación del sistema, lo que provocó una pérdida del ajuste lineal de la curva. La reproducibilidad del proceso se valoró analizando la precisión intra e inter-ensayo en el rango de trabajo seleccionado (Tabla 5). El sistema presentó una repetibilidad y una reproducibilidad dentro de los requerimientos analíticos de imprecisión.

**Tabla 5.** Coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo para cada nivel de concentración.

Conc (µg/L)	Intra-ensayo (repetibilidad) (CV%)	Inter-ensayo (reproducibilidad) (CV%)
10	4,7	5,5
50	5,0	5,2
75	2,2	3,8

La precisión intra-ensayo (repetibilidad) incluyó la medición por quintuplicado en el mismo día. La precisión inter-ensayo (reproducibilidad) incluyó la estimación de la variabilidad entre corridas de la misma muestra en las concentraciones arriba indicadas durante tres días consecutivos.

La veracidad del proceso se evaluó mediante el análisis de materiales de referencia certificados. Los resultados obtenidos no indicaron diferencias significativas con los valores declarados para las dos matrices estudiadas, (Tabla 6). Si bien los resultados son alentadores, solamente se dispuso de materiales de referencia certificados para niveles altos de As para dichas matrices por lo que será necesaria la evaluación de este parámetro a menores concentraciones cubriendo todo el rango dinámico de trabajo propuesto. El metabolismo en humanos del arsénico inorgánico lleva a la formación de metabolitos metilados (MMA y DMA) junto a una fracción que permanece en su forma inorgánica (22,23). Recientemente se ha establecido que la variabilidad en la capacidad metilante en las poblaciones estudiadas está asociada a distintos factores tales como edad, sexo, nivel de exposición y polimorfismo enzimático del sistema enzimático involucrado (22,23). La variabilidad en las proporciones relativas de estos intermediarios podría afectar el resultado del total de As si estos no presentasen la misma cinética de reacción. En esta experiencia, se constató *in vitro* la similitud en

**Tabla 6.** Valores de referencia y valores hallados en los materiales certificados.

Matriz	Nombre	Valor de referencia (µg/L)	Valor hallado (As I) (µg/L)
Agua	EP-H-2	159 (155-164)	158 (155-162)
Orina	Lyphochek® nivel 2	153 (123-184)	150 (144-156)

Los resultados experimentales descriptos fueron hallados a partir de 6 determinaciones en corridas independientes de los materiales de referencia indicados. Datos expresados como promedio y rango.

la respuesta de las distintas especies que hizo posible la cuantificación sin subestimar o sobreestimar el resultado por presentar una composición variable de especies.

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que la metodología propuesta presenta una performance analítica útil para la cuantificación de As inorgánico y sus metabolitos en muestras de agua y orina en forma rápida y confiable en niveles de concentración compatibles con los estándares internacionales vigentes para el monitoreo de la exposición al As inorgánico. Una futura comparación con metodologías de referencia junto a un bioensayo para evaluar el efecto de especies no vinculadas al metabolismo y de escasa o nula toxicidad, permitirá establecer los verdaderos alcances de esta potencial herramienta analítica.

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Meza, M.M.; Kopplin, M.J.; Burgués, J.L.; Gandolfi, A.J. (2004). Arsenic drinking water exposure and urinary excretion among adults in the Yaqui Valley, Sonora, Mexico. *Env Res.* 96, 119-126.
- Mukherjee, A.; Sengupta, M.K.; Hossain, M.A.; Ahamed, S.; Das, B.; Nayak, B.; Lodh, D.; Rahman, M.; Chakraborti, D. (2006). Arsenic contamination in groundwater: A global perspectives with emphasis on the Asian scenario. *J Health Popul Nut.* 24 (2), 143-163.
- Caussy, D. (2004). Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic. *Ecotoxicol Environ Safety.* 56, 164-173.
- World Health Organization (WHO). (2004). *Guidelines for Drinking-Water Quality, Vol. 1. Recommendations.* Third Edition, WHO, Geneva.
- Bundschuh, J.; Farias, B.; Martin, R.; Stornio, A.; Bhattacharya, P.; Cortes, J.; Bonorino, G.; Albouy, R. (2004). Groundwater arsenic in the Chaco-Pampean Plain, Argentina: case study from Robles county, Santiago del Estero Province. *App Geochem.* 19, 231-243.
- Código Alimentario Argentino (CAA). Capítulo XII. Bebidas hídricas, agua y agua gasificada [en línea]. Disponible en [http://www.anmat.gov.ar/codigoa/capitulo\\_XII.pdf](http://www.anmat.gov.ar/codigoa/capitulo_XII.pdf). (Consulta Marzo de 2009).

- 7.** Hinwood, A.; Sim, M.; Klerk, N.; Drummer, O.; Gerostamoluos, J.; Bastone, E. (2002). Are 24-Hour urine samples and creatinine adjustment required for analysis of inorganic arsenic in urine in population studies? *Environ Res Sect A*. 88, 219-224.
- 8.** International Programme on Chemical Safety (IPCS). (2004). Arsenic and Arsenic Compounds. 224. [en línea]. Disponible en <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc224.htm> (Consulta Junio de 2009).
- 9.** Gong, Z.; Lu, X.; Ma, M.; Watt, C.; Le, C. (2002). Arsenic speciation analysis. *Talanta*. 58, 77-96.
- 10.** Michalke, B. (2003). Element speciation definitions, analytical methodology and some examples. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56, 122-139.
- 11.** Dang, T.M.; Tran, Q.T.; Vu, K.V. (1999). Determination of arsenic in urine by atomic absorption spectrophotometry for biological monitoring of occupational exposure to arsenic. *Toxicology Letters*. 108,179-183.
- 12.** Caceres, D.; Pino, P.; Montesinos, N.; Atalah, E.; Amigo, H.; Loomis, D. (2005). Exposure to inorganic arsenic in drinking water and total urinary arsenic concentration in a Chilean population. *Environ Research*. 98, 151-159.
- 13.** Suzuki K.; Mandal B.; Ogra, Y. (2002). Speciation of arsenic in body fluids. *Talanta*. 58, 111-119.
- 14.** Guo, T.; Maasner, J.; Tsalev, D. (1997). Fast automated determination of toxicologically relevant arsenic in urine by flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 349, 313-318.
- 15.** Carrero, P.; Malavé, A.; Burguera, J.; Buerguera, M.; Rondón, C. (2001). Determination of various arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry: Investigation of the effects of the acid concentration of different reaction media on the generation of arsines. *Analytica Chimica Acta*. 438, 195-204.
- 16.** Le, X.C.; Cullen, W.; Reimer, K. (1994). Effect of cysteine on the speciation of arsenic by using hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 285, 277-285.
- 17.** International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Technical Report. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*. 74, 835-855.
- 18.** U.S. Department of Health and Human Services. (2001). Guidance of Industry Bioanalytical Method Validation. Food and Drug Administration (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). [en línea]. Disponible en <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>. (Consulta Junio 2009).
- 19.** Official Journal of the European Communities 17.8.2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. [en línea]. Disponible en <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>. (Consulta Junio 2009).
- 20.** American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). (2003). Arsenic and soluble inorganic compounds: BEI® 7th edition, Documentation. Publication # 7DOC-665, ACGIH®, Cincinnati.
- 21.** Palacios, M.; Gómez, M.; Cámara, C.; Lopez, M. (1997). Stability studies of arsenate, monomethylarsonate, dimethylarsenate, arsenobetaine and arsenocholine in deionized water, urine and clean-up dry residue from urine samples and determination by liquid chromatography with microwave-assisted oxidation-hydride generation atomic absorption spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*. 340, 209-220.
- 22.** Lindberg, A.L.; Ekstrom, E.C.; Nermell, B.; Rahman, M.; Lonnerdal, B.; Persson, L.; Vahter, M. (2008). Gender and age differences in the metabolism of inorganic arsenic in a highly exposed population in Bangladesh. *Environ Res*. 106, 110-120.
- 23.** Concha, G.; Nermell, B.; Vahter, M. (1998). Metabolism of inorganic arsenic in children with chronic high arsenic exposure in northern Argentina. *Environ Health Perspect*. 106, 355-359.

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

## DAÑO AL ADN EN MUJERES EXPUESTAS AL HUMO DE LA LEÑA EN CHIAPAS, MÉXICO

Herrera-Portugal, Crispín\*; Franco-Sánchez, Guadalupe; Pelayes Cruz, Marina; Schlottfeldt Trujillo, Yolanda; Pérez Solís, Blanca Lilia

Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Químicas. Laboratorio de Toxicología ambiental. Km. 2 Carretera a Puerto Madero. CP 30700. Tapachula, Chiapas. México. Fax: +52-962-62-5-15-55.

\*E-mail: [cportugal@prodigy.net.mx](mailto:cportugal@prodigy.net.mx)

**Resumen:** DAÑO AL ADN EN MUJERES EXPUESTAS AL HUMO DE LA LEÑA, EN CHIAPAS, MÉXICO. Crispín Herrera-Portugal; Guadalupe Franco-Sánchez; Marina Pelayes Cruz; Yolanda Schlottfeldt Trujillo; Blanca Lilia Pérez Solís. *Acta Toxicol. Argent. (2009) 17 (2): 56-61*. Actualmente alrededor de la cuarta parte de la población mexicana, entre 25 y 28 millones de habitantes, cocina con leña, Sin embargo, el humo de la leña contiene una amplia gama de sustancias tóxicas, entre ellas el monóxido de carbono (CO) cuyo impacto en la salud de la población rural debe ser estudiado. Por esto, el potencial daño al ADN asociado con la exposición a CO de 30 mujeres que cocinaban con leña en Chiapas, México, fue evaluado por el ensayo cometa. Los resultados se compararon con 30 controles comparables en edad y condiciones socioeconómicas, quienes cocinaban con gas licuado de petróleo (GLP). Se obtuvieron muestras de sangre total para medir carboxihemoglobina (COHb) y llevar a cabo el ensayo cometa. Se encontró diferencia significativa ( $P < 0,001$ ) en las concentraciones de COHb entre las mujeres que cocinaban con leña (media= 6,6%) y las que lo hacían con GLP (media= 1,8%), siendo 3,6 veces más elevadas en las primeras antes citadas que en las segundas. Se encontraron diferencias significativas en la longitud de cola (media  $\pm$  DE = 18,5 +/- 4,21 contra 5,97 +/- 1,0  $\mu$ m,  $P < 0,001$ ) y en el momento de cola (media  $\pm$  DE = 4,55 +/- 1,5 contra 1,5 +/- 0,40,  $P < 0,001$ ) del cometa entre los dos grupos examinados. Los resultados del presente estudio sugieren fuertemente que la exposición a CO y componentes presentes en el humo de la leña, puede causar daño genotóxico a las mujeres que hacen uso de este combustible, por lo que es necesario implementar medidas que disminuyan esta exposición.

**Palabras clave:** CO; Leña; Carboxihemoglobina; Ensayo cometa

**Abstract:** DNA DAMAGE IN WOMEN EXPOSED TO FIREWOOD FUEL SMOKE, IN CHIAPAS, MEXICO. Crispín Herrera-Portugal; Guadalupe Franco-Sánchez; Marina Pelayes Cruz; Yolanda Schlottfeldt Trujillo; Blanca Lilia Pérez Solís. *Acta Toxicol. Argent. (2009) 17 (2): 56-61*. Currently, about a quarter of the Mexican population, between 25 and 28 million people, cook with firewood. However, wood smoke contains a wide range of toxic substances, including carbon monoxide (CO) whose impact on health of the rural population should be studied. Therefore, the potential DNA damage associated with the exposition to CO of 30 women who cooked with wood in Chiapas, Mexico, was assessed using Comet Assay. Results were compared with 30 controls of similar age and socioeconomic status, who cooked with liquefied petroleum gas (LPG). We obtained whole blood samples to measure carboxyhemoglobin (% COHb) and perform the comet assay. There was a significant difference ( $P < 0.001$ ) in the percentages of COHb between women who cooked with wood (mean= 6.6%) and those who did it with LPG (mean=1.8%) being 3.6 times higher in the former compared with the latter. There was a significant difference in comet tail length between the two groups examined (mean 18.5 +/- 4.21 versus 5.97 +/- 1.0  $\mu$ m,  $P < 0.001$ ) and tail moment (mean 4.55 +/- 1.5 versus 1.5 +/- 0.40,  $P < 0.001$ ). The results of this study strongly suggest that exposure to carbon monoxide and compounds present in wood smoke can cause genotoxic damage to women who use this fuel, so it is necessary to implement measures to reduce this exposure.

**Keywords:** CO; Firewood; Carboxyhemoglobin; Comet assay

### INTRODUCCIÓN

La contaminación en ambientes cerrados puede ser un factor de riesgo importante para la salud humana, considerando que las personas pasan más del 60% de su tiempo en sus casas. Cincuenta por ciento de la población mundial y aproximadamente 90% de la población rural en países en desarrollo usan combustibles de biomasa tales como leña,

estiércol y restos de cosecha como fuente de energía (1-3). Algunos estudios consideran que América Latina representa el 12% del consumo global de biomasa (4). En México, 27 millones de personas usan leña; de éstos, 19 millones de habitantes usan este energético como combustible único para cocinar y alrededor de 8 millones lo usan en combinación con gas licuado de petróleo (GLP) (5). El ma-

yor uso de la leña se concentra en los hogares rurales y semi-urbanos. La leña es todavía el principal combustible residencial en México, ya que suministra aproximadamente el 40% de la energía total utilizada. Asimismo, aporta el 80% de la energía usada en los hogares rurales (6,7).

Globalmente, el uso de combustibles sólidos ha emergido como una de las diez amenazas más importantes para la salud pública, por el uso de combustible de biomasa. En el año 2000, la contaminación en ambientes cerrados fue responsable de más de 1,5 millones de muertes y 2,7% de la carga global de enfermedad. Además, en países en desarrollo fue responsable de una alta mortalidad y representó 3,7% del total de la carga de enfermedad (3).

Los problemas asociados a contaminación del aire en ambientes cerrados incluyen infecciones agudas en vías respiratorias bajas en niños, enfermedad respiratoria pulmonar obstructiva crónica (8), asma (9), bajo peso al nacer (10), incremento del riesgo de tuberculosis pulmonar (11-14), bronquitis (13), disminución de capacidad vital forzada y volumen espiratorio forzado (15,16). Otros estudios han descrito que el humo de leña es un factor de riesgo para varios tipos de cáncer, incluyendo: carcinoma nasofaríngeo, laríngeo y oral (17-19) y pulmonar (20-22).

Muchas de las sustancias que contiene el humo de biomasa pueden ser perjudiciales para la salud humana. Las más importantes son las partículas, el monóxido de carbono (CO), los óxidos nitrosos y sulfurosos (Nx y SOx), los hidrocarburos aromáticos policíclicos, algunos de los cuales como el benzo [a]pireno, son carcinogénicos (23).

El CO es, probablemente, el más importante contaminante liberado durante la combustión de leña. Uno de los biomarcadores usados para evaluar de manera indirecta la exposición a CO es la carboxihemoglobina (COHb) que refleja la unión del CO a una porción de la hemoglobina. Una concentración de COHb <2,5% es considerada aceptable desde el punto de vista clínico-toxicológico (24). Los más bajos niveles de COHb, a los cuales los efectos adversos son observables, van desde 2,9 a 3% (25). Sin embargo, concentraciones de COHb >5% están asociadas con efectos en la función neuroconductual, mala visión y mantenimiento del estado de alerta (26). Además, los productos de la combustión de leña

incluyendo al CO, se han asociado a efectos genotóxicos en humanos (27-30).

Tomando en cuenta el alto consumo de leña en la población rural, las personas expuestas al CO derivado de su combustión, son susceptibles de padecer efectos adversos. En este contexto, evaluar la exposición y el daño relacionado en estas poblaciones humanas expuestas a CO, es de vital importancia. Así, el objetivo del presente estudio, fue evaluar la exposición al CO mediante la determinación del porcentaje de COHb y su posible relación con el daño al ADN, medido por ensayo cometa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población

Se tomaron sendas muestras de sangre a 60 mujeres residentes de comunidades de la región del Soconusco, en el estado de Chiapas, México. Se estudiaron diferentes niveles de exposición a CO incluyendo dos diferentes áreas en la obtención de la muestra. Una comunidad de alta exposición (CAE, *Iturbide*), constituida por mujeres (n=30) que cocinaban con leña, y otra comunidad de baja exposición (CBE, *Tapachula*), formada por mujeres (n=30) que cocinaban con gas licuado de petróleo (GLP). Después de obtener el consentimiento informado, se tomó una muestra de sangre (3mL) y se realizó un cuestionario sobre datos sociodemográficos por personal entrenado. El trabajo de campo se llevó a cabo durante el año 2008.

### Determinación de carboxihemoglobina

La COHb se midió por método espectrofotométrico y se expresó como porcentaje de hemoglobina hemática como lo describen Beutler y West (31). Los valores de las extinciones obtenidas se aplicaron a la fórmula que consignan los autores de la técnica. Se adicionaron 25 µL de sangre completa a 3 mL de una solución hemolizante ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1mol/L, pH 6,85 en agua 1:10) en un tubo. Se mezcló por inversión de 2 a 3 veces. Después de 5 minutos, 0,1 mL de esta mezcla se introdujo en un tubo, el cual contenía 1,15 mL de una solución diluyente (20 mg de hidrosulfito de sodio en 20 mL de buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1mol/L, pH 6,85, preparado inmediatamente antes de su uso). Después de 10 minutos, se leyó la absorbancia a 420 y 432 nm contra un blanco que contenía solamente solución diluyente de COHb.

### Daño al ADN

El daño al ADN fue evaluado usando el ensayo cometa. La electroforesis de células individuales fue realizada como lo describen Singh y col. (32). Inmediatamente después de obtener la muestra de sangre, las células de la sangre completa fueron extendidas en una capa de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5%, sobre una base de agarosa estándar al 0,5%, y se lisaron por al menos 24 horas a 4°C en una solución compuesta de Tris-HCl 10 mM, pH 10, NaCl 2,5 M, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1M, DMSO 10% y 1% Triton X-100. Después, las laminillas fueron colocadas en buffer alcalino para realizar la electroforesis (NaOH 300 mM y Na<sub>2</sub>EDTA 1,0 mM, pH>13) por 20 minutos para el desenrollamiento del ADN y la expresión del daño álcali-lábil. La electroforesis se desarrolló en el mismo buffer (pH> 13) por 20 minutos, aplicando un campo eléctrico de 25 V y ajustando la intensidad de corriente a 300 mA. Después de la electroforesis, las laminillas fueron lavadas abundantemente con buffer Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5 para neutralizar el álcali. A continuación, se fijaron con alcohol etílico absoluto. Para la evaluación del daño al ADN, las laminillas fueron teñidas adicionando 20 µL de bromuro de etidio y se colocó un cubreobjetos sobre el gel. La extensión de migración del ADN fue analizada en 100 células elegidas al azar (50 células de cada una de dos réplicas

de laminillas) usando un microscopio de epifluorescencia. En las células dañadas (células con cometa) la migración del ADN fue medida por análisis de imagen empleando el software Kinetic Imaging Komet V 4.0.

### Análisis estadístico

La COHb fue reportada en porcentaje (%COHb en sangre total). El daño al ADN fue analizado por área de residencia, la cual fue clasificada en alta exposición (CAE) para las personas que cocinaban con leña, y baja exposición (CBE) para quienes lo hacían con GLP. Las medias de migración del ADN de las dos áreas fueron analizadas por análisis de varianza (ANOVA). Para todos los análisis estadísticos se usó el paquete estadístico STATA V 8 (Texas, USA).

## RESULTADOS

### Carboxihemoglobina

Se encontró diferencia significativa (P<0,001) en los niveles de COHb entre las mujeres que residían en la CAE y cocinaban con leña (media= 6,6%) y las que vivían en la CBE y lo hacían con estufa de GLP (media=1,8%), siendo 3,6 veces más elevado en las primeras comparado con las segundas. Además, el 100% de las mujeres de la CAE presentó niveles de COHb superiores a 2,5%, es decir, niveles por encima de la concentración de COHb considerada como segura (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de carboxihemoglobina en mujeres residentes de las comunidades de alta y baja exposición.

	Media (% COHb) <sup>a</sup>	DE (% COHb)	%<2,5 <sup>b</sup>	%>2,5 <sup>c</sup>	Rango (%COHb)
CAE	6,6*	0,4	0,00	100	6,0 – 8,0
CBE	1,8	0,7	100	0,00	0,80 -2,4

<sup>a</sup>El % de carboxihemoglobina fue medido como se describe en metodología.

<sup>b</sup>Porcentaje de personas con niveles de carboxihemoglobina abajo de 2,5%

<sup>c</sup>Porcentaje de personas con niveles de carboxihemoglobina arriba de 2,5%

\*P<0,001 cuando se comparó CAE vs CBE. CBE: comunidad de baja exposición.

CAE: comunidad de alta exposición

### Daño al ADN

Se encontraron diferencias significativas (P<0,001) en la migración del ADN (medido como la longitud y momento de la cola) en las células obtenidas de mujeres que vivían en la CAE,

comparadas con las células de las que vivían en la CBE (Tabla 2). Las medias de longitud y momento de cola fueron tres veces mayores en mujeres que vivían en la CAE comparadas con las medias de las que vivían en la CBE (Tabla 2).

**Tabla 2.** Daño al ADN en mujeres residentes de comunidades de alta y baja exposición.

Grupo	Longitud de cola ( $\mu\text{m}$ )	Momento de cola
	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
CBE n=30	5,97 $\pm$ 1,0	1,5 $\pm$ 0,4
CAE n=30	8,5* $\pm$ 4,21	4,55* $\pm$ 1,5

El daño al ADN fue medido por análisis de imagen en 100 células seleccionadas al azar (50 células de cada una de dos réplicas de laminilla). CBE: comunidad de baja exposición. CAE: comunidad de alta exposición. \* $P < 0,001$  (ANOVA)

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En México, ha sido considerada un problema de salud pública la contaminación en ambientes cerrados. En este sentido, algunos investigadores estudiaron el impacto de estufas de leña en la contaminación doméstica en las comunidades rurales de Chiapas y Michoacán, México (33,34); en ambos estudios el uso de estufas redujo los niveles medios de partículas de diámetro inferior a 10 micras (PM10) y partículas de menos de 2,5 micras de diámetro (PM2,5). En otro estudio, se implementó un programa de reducción de riesgo de exposición a humo de leña en comunidades indígenas de San Luis Potosí, México, que redujo los niveles de COHb e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). En ese estudio se midieron la concentración urinaria de 1-hidroxipireno (1-OHP), además del daño al ADN un mes después de la intervención (35).

Los niveles de COHb observados en nuestro estudio son muy altos, pues el 100% de las mujeres de la CAE tuvo niveles que se han asociado con efectos deletéreos/adversos (>2,5%) (26). Asimismo, la media de COHb encontrada en esta población (6,6%) fue 2,5 veces más elevada que la media considerada como segura (24) y mayor a la reportada (media= 4,9%) en una población rural indígena mexicana expuesta al humo de la leña (35).

Los resultados de este estudio muestran que el daño al ADN medido como migración, es alto en la CAE, comparado con los resultados obtenidos en la CBE. Tomando en cuenta que el porcentaje de COHb en la CAE es mayor, nosotros podemos sugerir que la alta exposición a CO juega un papel importante en el daño al

ADN en esta población; además de los otros componentes que se desprenden de la combustión de la leña. En este sentido hay que puntualizar, la conveniencia de haber realizado la cuantificación de otras sustancias genotóxicas presentes en el humo de la combustión de leña, que no se determinaron en este estudio, y que también explicarían buena parte del daño al ADN encontrado.

Los resultados obtenidos son consistentes con otros estudios que evidencian los efectos genotóxicos en humanos expuestos al humo de combustión de biomasa (29,30). Es importante puntualizar que la medida de migración del ADN (momento de cola) encontrada en la CAE (media=4,55) fue mayor que la encontrada en mujeres expuestas al humo de combustible de biomasa (media=3,83) en la India (30). Además, otros estudios han encontrado un incremento de la frecuencia de micronúcleos y aberraciones cromosómicas en mujeres expuestas al humo de combustible de biomasa (28).

El efecto de daño al ADN detectado en la población estudiada puede causar a largo plazo problemas tales como inmunosupresión y cáncer, tal y como se ha descrito en estudios previos que analizan la relación entre daño al ADN y problemas de salud (36,37).

En conclusión, los resultados del presente estudio sugieren fuertemente que la exposición a los productos de combustión de la leña, incluido el CO, puede causar daño genotóxico a las mujeres que hacen uso de este combustible de biomasa y representa un potencial peligro para su salud a largo plazo, por lo que es necesario implementar medidas que disminuyan esta exposición.

## **BIBLIOGRAFÍA CITADA**

- 1.** World Health Organization. (2002). World Health Report 2002. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Geneva: World Health Organization.
- 2.** World Health Organization. (2004). Inheriting the World: The Atlas of Children's and the Environmental. Geneva: World Health Organization.
- 3.** World Health Organization. (2007). Indoor Air Pollution: national Burden of Disease estimates. W/SDE/PHE/07.01.
- 4.** Food and Agriculture Organization. The Challenge of rural energy poverty in developing countries. World Energy Council and Food and Agriculture Organization. United Nations; 1999.
- 5.** INEGI. Estadísticas de producción de energía. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2004. México.
- 6.** Díaz-Jiménez, R. (2000). Consumo de leña en el sector residencial de México. Evolución histórica y emisiones de CO<sub>2</sub>. UNAM. Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. pp. 113.
- 7.** Díaz, R. y Masera, O. (2003). Uso de la leña en México: situación actual, retos y oportunidades. Balance Nacional de Energía. Secretaría de Energía, México D.F. pp. 99-109.
- 8.** World Health Organization. (2002). The health effects of indoor air pollution exposure in developing countries; WHO/SDE/OEH/02.05.
- 9.** Mishra, V. (2003). Effect of indoor air pollution from biomass combustion on prevalence of asthma in the elderly. *Environ Health Perspect.* 111, 71-78.
- 10.** Boy, E.; Bruce, N.; Delgado, H. (2002). Birth weight and exposure to kitchen wood smoke during pregnancy in rural Guatemala. *Environ. Health Perspect.* 110, 109-14.
- 11.** Diaz, J.V.; Koff, J.; Gotway, M.B.; Nishimura, S.; Balmes, J.R. (2006). Case report: A case of wood-smoke-related pulmonary disease. *Environ Health Perspect.* 16, 759-762.
- 12.** Mishra, V.K.; Retherford, R.D.; Smith, K.R. (1999). Biomass cooking fuels and prevalence of tuberculosis in India. *Int J Infect Dis.* 3, 19-129.
- 13.** Perez-Padilla, R.; Regalado, J.; Vedal, S.; Pare, P.; Chapela, R.; Sansores, R.; Selman, M. (1996). Exposure to biomass smoke and chronic airway disease in Mexican women. A case-control study. *Am J Respir Crit Care Med.* 154, 701-706.
- 14.** Pérez-Padilla, R.; Pérez-Guzmán, C.; Báez-Saldana, R.; Torres-Cruz, A. (2001). Cooking with biomass stoves and tuberculosis: a case control study. *Int J Tuberc Lung Dis.* 5, 441-7.
- 15.** Rinne, S.T.; Rodas, E.J.; Bender, B.S.; Rinne, M.L.; Simpson, J.M.; Galer-Unti, R.; Glickman, L.T. (2006). Relationship of pulmonary function among women and children to indoor air pollution from biomass use in rural Ecuador. *Respiratory Medicine.* 100, 1208-1215.
- 16.** Zang, J.J.; Smith, K.R. (2007). Household air pollution from coal and biomass fuel in China: measurement, health impacts, and interventions. *Environ Health Perspect.* 115, 848-55.
- 17.** Clifford, P. (1972). Carcinogens in the nose and throat: nasopharyngeal carcinoma in Kenya. *Proc R Soc Med.* 65, 682-6.
- 18.** Franco, E.L.; Kowalski, L.P.; Oliveira, B.V.; Curado, M.P.; Pereira, R.N.; Silva, M.E. (1989). Risk factors for oral cancer in Brazil: a case control study. *Int. J. Cancer.* 43, 992-1000.
- 19.** Pintos, J.; Franco, E.L.; Kowalski, L.P.; Oliveira, B.V.; Curado, M.P. (1998). Use of wood stoves and risk of cancers of the upper aerodigestive tract: a case-control study. *Int. J. Epidemiol.* 27 (6), 936-40.
- 20.** Kleinerman, R.; Wang, Z.; Lubin, J.; Zhang, S.; Metayer, C.; Brenner, A. (2000). Lung cancer and indoor air pollution in rural China. *Ann Epidemiol.* 10, 469.
- 21.** Ramanakumar, A.V.; Parent, M.E.; Siemiatycki, J. (2007). Risk of lung cancer from residential heating and cooking fuels in Montreal, Canada. *American Journal of Epidemiology* 165, 634-642.

- 22.** World Health Organization. (2000). Addressing the links between indoor air pollution, household energy and human health. Based on the WHO-USAID Global Consultations on the Health Impact of Indoor Air pollution and Household Energy in Developing Countries. Washington, DC.
- 23.** Bruce, N.; Pérez-Padilla, R.; Albalack, R. (2000). Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge. *Bulletin of the World Health Organization* 78, 1078-1092.
- 24.** Kleinman, M.T. (2000). Carbon monoxide: evaluation of current California air quality standards with respect protection of children. Prepared for California Air Resources Board, California Office of Environmental Health Hazard Assessment. Irvine, CA: University of California, Irvine.
- 25.** Estrella, B.; Estrella, R.; Oviedo, J.; Narváez, X.; Reyes, M.T.; Gutiérrez, M.; Naumova, E.N. (2005). Acute respiratory disease and carboxyhemoglobin status in children of Quito, Ecuador. *Environ Health Perspect.* 113, 607-11.
- 26.** Environmental Protection Agency. (2000). Air quality criteria for carbon monoxide. EPA 600/P-99/001F. Washington, DC. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency.
- 27.** Danielsen, P.H.; Bräuner, E.V.; Barregard, L.; Sällsten, G.; Wallin, M.; Olinski, R.; Rozalski, R.; Moller, P.; Loft, S. (2008). Oxidatively damaged DNA and its repair after experimental exposure to wood smoke in healthy humans. *Mutat Res.* 642, 37-42.
- 28.** Musthapa, M.S.; Lohani, M.; Tiwari, S.; Mathur, N.; Prasad, R.; Rahman, Q. (2004). Cytogenetic biomonitoring of Indian women cooking with biofuels: micronucleus and chromosomal aberration test in peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen.* 43, 243-9.
- 29.** Ozturk, S.; Vatansever, S.; Cefle, K.; Palanduz, S.; Güler, K.; Erten, N.; Erk, O.; Karan, M.A.; Tascioglu, C. (2002). Acute wood or coal exposure with carbon monoxide intoxication induces sister chromatid exchange. *J Toxicol Clin Toxicol.* 40, 115-20.
- 30.** Pandey, A.K.; Bajpayee, M.; Parmar, D.; Rastogi, S.K.; Mathur, N.; Seth, P.K.; Dhawan, A. (2005). DNA damage in lymphocytes of rural Indian women exposed to biomass fuel smoke as assessed by the Comet Assay. *Environ Mol Mutagen.* 45, 435-41.
- 31.** Beutler, E.; West, C. (1984). Simplified determination of carboboxyhemoglobin. *Clin Chem.* 30, 871-874.
- 32.** Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175, 184-191.
- 33.** Riojas-Rodríguez, H.; Romano-Riquer, P.; Santos-Burgoa, C.; Smith, K.R. (2001). Household firewood use and the health of children and women of Indian communities in Chiapas, Mexico. *Int J Occup Environ Health.* 7, 44-53.
- 34.** Zuk, M.; Rojas, L.; Blanco, S.; Serrano, P.; Cruz, J.; Angeles, F.; Tzintzun, G.; Armendariz, C.; Edwards, R.D.; Johnson, M.; Riojas-Rodríguez, H.; Maser, O. (2007). The impact of improved wood burnig stoves on fine particulate matter concentrations in rural Mexican homes. *J. Expo Sci Environ Epidemiol.* 17, 224-32.
- 35.** Torres-Dosal, A.; Pérez-Maldonado, I.N.; Jasso-Pineda, Y.; Martínez-Salinas, R.I.; Alegría-Torres, J.A.; Díaz-Barriga, F. (2008). Indoor air pollution in a Mexican indigenous community: Evaluation of risk reduction program using biomarkers of exposure and effect. *Science of the Total Environment.* 390, 362-368.
- 36.** Bosken, C.H.; Wei, Q.; Amos, C.I.; Spitz, M.R. (2002). An analysis of DNA repair as a determinant of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 94, 1091-9.
- 37.** Wei, Q.; Lee, J.E.; Gershenwald, J.E.; Ross, M.I.; Mansfield, P.F.; Strom, S.S.; Wang, L.E.; Guo, Z.; Qiao, Y.; Amos, C.I.; Spitz, M.R.; Duvic, M. (2003). Repair of UV light-induced DNA damage and risk of cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 95, 308-15.

## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

---

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 03279286) es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina. Integra el Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas y se puede acceder a sus artículos a texto completo a través de SciELO Argentina.

Acta Toxicológica Argentina tiene por objetivo la publicación de trabajos relacionados con las diferentes áreas de la Toxicología, en formato de artículos originales, reportes de casos, comunicaciones breves, actualizaciones o revisiones, artículos de divulgación, notas técnicas, resúmenes de tesis, cartas al editor y noticias.

**Los artículos originales** son trabajos de investigación completos y deben presentarse respetando las siguientes secciones: Introducción; Materiales y métodos; Resultados y Discusión (que pueden integrar una sección conjunta).

**Los reportes de casos** son descripciones de casos clínicos que por sus características signifiquen un aporte importante a la Toxicología.

**Las comunicaciones breves** son trabajos de menor extensión pero con connotación toxicológica novedosa y que signifiquen un aporte al campo toxicológico.

**Las revisiones o actualizaciones** comprenden trabajos en los cuales se ha realizado una amplia y completa revisión de un tema importante y/o de gran interés actual en los diferentes campos de la Toxicología.

**Los artículos de divulgación** y artículos especiales son comentarios de diversos temas de interés toxicológico.

**Las notas técnicas** son descripciones breves de técnicas analíticas o dispositivos nuevos avalados por trabajos experimentales concluyentes.

**Los resúmenes de tesis** son resúmenes ampliados que describen tesis de Maestría o Doctorales aprobadas. Estas deben incluir copia de la aprobación de la tesis con la declaración jurada del autor y su director. El texto no debe superar las 1000 palabras.

Acta Toxicológica Argentina (en adelante "Acta"), publicará contribuciones en español, portugués y/o inglés. Todas serán evaluadas por al menos dos revisores; la selección de los mismos será atributo exclusivo de los editores.

Este proceso determinará que el mencionado Comité opte por rechazar, aceptar con cambios o aceptar para su publicación el trabajo sometido a su consideración. La identidad de autores y revisores se mantendrá en forma confidencial.

### Envío de manuscritos

Los manuscritos se pueden remitir por vía electrónica a envios.acta.ATA@gmail.com o en CD-ROM por correo postal a Alsina 1441, oficina 302, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1088AAK).

En el caso de envío electrónico indicar en el asunto: manuscrito para Acta y en el cuerpo del mensaje indicar el título del trabajo y los nombres y apellidos de todos los autores. Adjuntar el manuscrito (archivo de Word 2003 o superior) redactado según las instrucciones para los autores que se detallan más abajo.

Junto con el envío del manuscrito se deberá enviar una carta al Director en formato Word, con el nombre de todos los autores solicitando la consideración del artículo para su publicación. En la carta deberá constar claramente que:

- El trabajo remitido no ha sido publicado en ningún medio y no será enviado a otra revista científica o a cualquier otra forma de publicación, mientras dure la evaluación en Acta.
- Todos los autores son responsables del contenido del artículo.
- Todos los autores manifiestan si hubo o no, conflicto de intereses. De haber financiación externa, aclarar cuál fue la fuente. Asimismo, señalar si uno o más de los autores tiene alguna relación con la compañía comercial cuyo producto/s fueron empleados o son mencionados en el estudio realizado.
- En caso que el artículo sea publicado, todos los autores ceden los derechos de autor al Acta.

**No se podrá iniciar el proceso editorial si la carta no contiene todos los puntos señalados.**

### Aspectos generales en la preparación del manuscrito para artículo original

Los manuscritos deberán redactarse con pro-

cesador de texto (Microsoft Word versión 2003 o superior), a **doble espacio** (incluso los resúmenes, referencias y tablas) con un tamaño mínimo de letra Arial en 12 puntos. Las páginas deberán numerarse desde la portada. Las letras en **negrita** o *itálica* se usarán sólo cuando corresponda.

En la primera página se indicará: título del trabajo (mayúscula), nombres y apellidos completos de todos los autores; lugar de trabajo (nombre de la institución y dirección postal), de haber autores con distintos lugares de trabajo, se colocarán superíndices numéricos (no encerrados entre paréntesis) junto a los nombres, de manera de identificar a cada autor con su respectivo lugar de trabajo; fax y/o correo electrónico del autor responsable de la correspondencia (que se indicará con un asterisco en posición de superíndice ubicado junto al nombre).

En la segunda página se incluirá el título en inglés y el resumen en el idioma del artículo y en inglés, seguido cada uno de ellos de una lista de cuatro palabras clave, en el idioma correspondiente. Si el trabajo estuviese escrito en inglés, deberá tener un resumen en español. Las palabras clave iniciarán con mayúscula e irán separadas por punto y coma.

**Introducción.** Incluirá antecedentes actualizados acerca del tema en cuestión y los objetivos del trabajo definidos con claridad.

**Materiales y métodos.** Contendrá la descripción de los métodos, aparatos, reactivos y procedimientos utilizados, con el detalle suficiente para permitir la reproducción de los experimentos.

**Consideraciones éticas.** En todos los estudios clínicos se deberá especificar el nombre del Comité de Ética e Investigación que aprobó el estudio y que se contó con el consentimiento escrito de los pacientes. En todos los estudios con organismos no humanos, se deberán especificar los lineamientos éticos con respecto al manejo de los mismos durante la realización del trabajo.

**Análisis estadístico.** Se deberán informar las pruebas estadísticas con detalle suficiente como para que los datos puedan ser verificados por otros investigadores y fundamentar el empleo de cada una de ellas. Si se utilizó un programa estadístico para procesar los datos, éste deberá ser mencionado en esta sección.

**Resultados.** Se presentarán a través de una de las siguientes formas: en el texto, o mediante tabla/s y/o figura/s. Se evitarán repeticiones y se destacarán sólo los datos importantes. Se dejará para la sección

Discusión la interpretación más extensa. Las **tablas** se presentarán en hoja aparte, numeradas consecutivamente con números arábigos, con las leyendas y/o aclaraciones que correspondan al pie. Las llamadas para las aclaraciones al pie se harán empleando números arábigos entre paréntesis y superíndice. Sólo los bordes externos de la primera y la última fila y la separación entre los títulos de las columnas y los datos se marcarán con línea continua. No se marcarán los bordes de las columnas. Asegúrese que cada tabla sea citada en el texto. Las **figuras** se presentarán en hoja aparte, numeradas consecutivamente con números arábigos. Los dibujos deberán estar en condiciones que aseguren una adecuada reproducción. Los gráficos de barras, tortas o estadísticas deberán tener el formato GIF. Los números, letras y signos tendrán dimensiones adecuadas para ser legibles cuando se hagan las reducciones necesarias. Las referencias de los símbolos utilizados en las figuras deberán ser incluidas en el texto de la leyenda. Las **fotografías** deberán ser realizadas en blanco y negro, con buen contraste, en papel brillante y con una calidad suficiente (mínimo 300 dpi) para asegurar una buena reproducción. Los dibujos originales o las fotografías tendrán al dorso los nombres de los autores y el número de orden escritos con lápiz.

Las fotos para la versión electrónica deberán ser realizadas en el formato JPEG o GIF, con alta resolución. Tanto las figuras como las fotografías deberán ser legibles. El tamaño mínimo será media carta, es decir, 21 x 15 cm, a 300 dpi. En todos los casos se deberá indicar la magnificación utilizada (barra o aumento).

Los epígrafes de las figuras se presentarán exclusivamente en una hoja aparte, ordenadas numéricamente y deberán expresar específicamente lo que se muestra en la figura.

**Abreviaturas.** Se utilizarán únicamente abreviaturas normalizadas. Se evitarán las abreviaturas en el título y en el resumen. Cuando en el texto se emplee por primera vez una abreviatura, ésta irá precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

**Unidades de medida.** Las medidas de longitud, talla, peso y volumen se deberán expresar en unidades métricas (metro, kilogramo, litro) o sus múltiplos decimales.

Las temperaturas se facilitarán en grados Celsius y las presiones arteriales en milímetros de mercurio.

Todos los valores de parámetros hematológicos y bioquímicos se presentarán en unidades del sistema métrico decimal, de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). No obstante, los editores podrán solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores añadan unidades alternativas o distintas de las del SI.

**Nomenclatura.** 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 itálica.

**Discusión.** Se hará énfasis sobre los aspectos del estudio más importantes y novedosos, y se interpretarán los datos experimentales en relación con lo ya publicado. Se indicarán las conclusiones a las que se arribó, evitando la reiteración de datos y conceptos ya vertidos en secciones anteriores.

**Agradecimientos.** Deberán presentarse en letra Arial con un tamaño 10 puntos y en un solo párrafo.

**Bibliografía.** Las citas bibliográficas se señalarán en el texto mediante el apellido del/los autor/es (hasta dos autores) y el año de publicación todo entre paréntesis, separados por punto y coma, en el caso de más de una cita, empezando por la cita más antigua a la más actual. En el caso de más de dos autores se señalará el apellido del primer autor seguido de *et al.* y el año de la publicación.

#### **Ejemplos:**

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es la sustancia psicoactiva más consumida en el mundo (Concon 1988; Lewin 1998; Nehlig 1999).

El consenso general es que sería deseable que la ingesta total de cafeína durante el embarazo no supere los 300 mg/día (Organization of Teratology Information Specialists (OTIS) 2001; Kaiser y Allen 2002; Nawrot *et al.* 2003)

Las referencias bibliográficas completas se incluirán al final del manuscrito bajo el título de Bibliografía Citada, en orden alfabético, con el nombre de todos los autores en cada caso.

#### **Ejemplos:**

##### **1. Artículo estándar en publicación periódica**

Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 347(4):284-287, 2002.

##### **2. Libros y monografías**

Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby, 2002.

##### **3. Capítulo de libro**

Meltzer P.S., Kallioniemi A., Trent J.M. Chromosome alterations in human solid tumors. En: Vogelstein B., Kinzler K.W., editores. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

##### **4. Material electrónico**

**a.** Artículo en publicación periódica en internet  
Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [en línea]. 2002 Jun. [consulta 12 de Agosto 2002];102(6):[1 p.]. Disponible en: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>Article

##### **b.** Página en internet

Cancer-Pain.org [en línea]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [actualizado al 16 de Mayo de 2002; consulta 9 de Julio de 2002]. Disponible en: <http://www.cancer-pain.org/>.

##### **c.** Parte de una página de internet

American Medical Association [en línea]. Chicago: The Association; c1995-2002 [actualizado al 23 de Agosto de 2001; consulta 12 de Agosto de 2002]. AMA Office of Group Practice Liaison. Disponible en: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

Para la correcta citación de posibles referencias bibliográficas que pudiesen no citarse en este instructivo, consultar el estilo propuesto por el Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas en "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" disponible en: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html) (consulta 14 de Enero 2010).

## INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

---

*Acta Toxicológica Argentina* (*Acta Toxicol. Argent.*) (ISSN 03279286) is the official publication for scientific promotion of the *Asociación Toxicológica Argentina*. It is a member of the *Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas* (Basic Core of Argentinean Scientific Journals). Full articles can be accessed through SciELO Argentina electronic library.

The goal of *Acta Toxicológica Argentina* is to publish articles concerning all areas of Toxicology, including original articles, case reports, short communications, revisions, popularization of science articles, technical notes, thesis summaries, letters to the editor and relevant news.

**Original articles** must detail complete research and should be organized into the following sections: Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion (the last two can be combined into one section).

**Case reports** include description of clinical case studies which represent a contribution to the field of Toxicology.

**Short communications** are brief, concise articles that contribute to the respective area of Toxicology.

**Revisions or updates** comprise studies where an extensive revision of a topic of current importance and/or interest has been carried out.

**Articles concerned with popular science and special articles** can comment on a broad range of toxicological topics.

**Technical notes** should briefly describe new devices or analytical techniques validated by conclusive experimental studies.

**Thesis summaries** are sufficiently detailed abstracts of approved doctoral or magisterial thesis. They must include a copy of acceptance and a sworn statement by the author and director, and should not exceed 1,000 words.

Articles can be submitted to *Acta Toxicológica Argentina* (henceforth "Acta") in Spanish, Portuguese or English. All submissions will be evaluated by at least two independent reviewers, selected by the editors. The Editorial board will base its decision to reject, accept with changes or accept for publication the submitted article on these reviews. The identity of authors and reviewers will not be disclosed throughout this process.

### Submission of Manuscripts

Manuscripts can be submitted in electronic form by the e-mail address [envios.acta.ATA@gmail.com](mailto:envios.acta.ATA@gmail.com), or sent in CD-ROM to the postal address Alsina 1441, office 302, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1088AAK).

For electronic submissions, please include "Manuscript for Acta" in the subject. The body of the e-mail should contain the title of the article, as well as the first and last name of all authors. Articles must be attached as Microsoft Word 2003 files or higher, and be in accordance to the guide for authors specified below.

A letter to the Director in Word format in the name of all authors requesting the article be considered for publication also needs to be included. This letter should clearly state that:

- The submitted article has not been published, is not under consideration for publication elsewhere, and will not be sent to another journal or published in any way until the reviewing process in *Acta* concludes.
- All authors are responsible for the content of the article.
- All authors express whether any conflict of interest arose from the study. If they received external funding, the source should be declared. Likewise, any association between authors and commercial companies whose product/s were used or mentioned in the study must be stated.
- If the article is accepted for publication, all authors agree to transfer copyright to *Acta*.

**If one or more of these items are not addressed in the letter the editorial process cannot be initiated.**

### General guidelines in the preparation of manuscripts for original articles.

Articles must be written using a word processor (Microsoft Word 2003 or higher) with double-spacing throughout (including abstract, references and tables), and a minimum letter size of Arial 12. Manuscripts must contain page numbers on each page from the first page. The use of bold and italic letters must be limited to the bare minimum necessary.

First page should contain the article title (in capital letters), full name and affiliations of all

authors, workplace (name of institution and postal address), if it differs between authors, numerical superscripts, (not in parentheses) next to each author should be used to identify it, fax and/or e-mail address of the corresponding author (signaled by a subscript asterisk next to the name).

Second page must include an English title and the abstract, both in the language of submission and in English, each followed by four key words in the corresponding language. If the article is written in English, then the abstract in Spanish must be provided. Key words must be headed by capital letters and separated by semicolons.

**Introduction.** Should include updated background references and clearly stated study goals.

**Materials and methods.** Should describe the methods, devices, reagents and procedures used, sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced.

**Ethical considerations.** All clinical studies must specify the name of the Ethics and Research Committee responsible for the approval of the study, as well as the patients' written consent. Studies involving non human experimental subjects must give assurance that ethical guidelines for the protection of animal handling and welfare were followed.

**Statistical analysis.** The statistical tests employed should be properly explained and justified to allow verification by other researchers. If statistical software was used to process data, it should be mentioned.

**Results.** Can be showed through one of the following: text, tables or figures. Authors should avoid repetition, and only the relevant data should be presented. An extensive interpretation of the results should be left for the Discussion section.

**Tables** must be typed in separate pages and numbered consecutively with Arabic numerals in order of appearance in the text. Legends or explanations should be included as footnotes. Marks for footnotes must be superscript Arabic numerals in parentheses. Continuous lines may be only used for the outer borders of the first and last row and to separate columns and data titles, not for outer borders of columns. Please make sure that each table is cited in the text.

**Figures** should be numbered consecutively with Arabic numerals and presented in separate pages. Drawings must be of good enough quality to ensure adequate reproduction. Bar,

pie or statistical charts must be prepared in GIF format. Numbers, letters and signs within figures must be of the appropriate size to be legible when the final sizing takes place. All signs used must have a reference in the figure caption.

Black-and-white only **photographs** should have proper contrast and a minimum resolution of 300 dpi. Submit all original drawings and photographs in glossy paper with the authors' name and figure number written in pencil in the back. For the electronic submission, photographs should be in high resolution JPEG or GIF formats. Both figures and photographs must be clearly legible. The minimum size for figures is half-letter paper size (21 x 15 cm) at 300 dpi. Magnification must be indicated whether by a scale bar or the magnification number.

Present figure captions in a separate page, accordingly numbered. Only the elements visible in the corresponding figure must be included in the caption.

**Abbreviations.** Authors should only use conventional abbreviations, avoiding their use in the title and abstract. When an abbreviation is first introduced in the text it must be preceded by the full term, except in the case of unit measures.

**Unit measures.** Length, size, weight and volume measures should be expressed according to the metric system (meter, kilogram, liter or their decimal multiples). Temperatures will be provided in degrees Celsius; blood pressure in millimeters of mercury.

All hematological and biochemical parameters should follow the metric system, according to the International System of Units (SI). However, editors could require that alternate units be provided before publication.

**Nomenclature.** For chemicals, authors should primarily adhere to IUPAC norms. Designate organism names according to international norms by stating the unabbreviated genus and species in italic.

**Discussion.** Emphasis should be placed on the most relevant and novel aspects of the study. Interpret experimental data in terms of previous published findings. Include conclusions without repeating data and concepts stated elsewhere.

**Acknowledgements.** Limit to a single paragraph, using Arial 10 lettering.

**References.** Citations in the text consist of the authors' last name (up to two authors) and the

year of publication in parentheses. In the case of more than one citation, list them from the oldest to the newest and separate citations by semicolons. For more than two authors, only cite the first author's last name followed by et al. and the year of publication.

**Examples:**

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is the psychoactive substance with the largest consumption worldwide (Concon 1988; Lewin 1998; Nehlig 1999).

During pregnancy the total consumption of caffeine should not exceed 300 mg/day (Organization of Teratology Information Specialists (OTIS) 2001; Kaiser and Allen 2002; Nawrot et al. 2003).

Full references must be listed alphabetically at the end of the manuscript under the subheading References.

**Examples:**

**1. Standard article in periodical publications.**

Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 347(4):284-7, 2002.

**2. Books and monographs.**

Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. *Medical microbiology*. 4<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby, 2002.

**3. Book chapters.**

Meltzer P.S., Kallioniemi A., Trent J.M. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vo-

gelstein B., Kinzler K.W., editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. P. 93-113.

**4. Electronic material.**

**a. Article published in an online journal.**

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [online]. 2002 Jun. [accessed August 12, 2002];102(6):[1 p.]. Available at: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>Article

**b. Website.**

Cancer-Pain.org [online]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated May 16, 2002; accessed July 9, 2002]. Available at: <http://www.cancer-pain.org/>.

**c. Partial website.**

American Medical Association [online]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated August 23, 2001; accessed August 12, 2002]. AMA Office of Group Practice Liaison. Available at: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

For correct citation please refer to the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" proposed by the International Committee of Medical Journals Directors, available at: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html) (accessed January 14, 2010).

## INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

---

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 03279286) é o órgão oficial de difusão científica da Associação Toxicológica Argentina. Engloba o Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas ter acesso a artigos e texto completo através de SciELO Argentina.

Acta Toxicológica Argentina tem como objetivo a publicação de trabalhos relacionados com diferentes áreas da Toxicologia, em artigos originais, relatos de casos, comunicações breves, atualizações ou revisões, artigos de divulgação, resumos de tese, notas técnicas, cartas ao editor e notícias.

**Os artigos originais** são trabalhos de pesquisa completos e devem ser apresentados respeitando as seguintes seções: Introdução; Materiais e métodos; Resultados e Discussão (que podem integrar uma seção anexa).

**Os relatos de casos** são descrições de casos clínicos que por suas características tenham um significado ou aporte importante à Toxicologia.

**As comunicações curtas são trabalhos** de menor extensão mas com conotação toxicológica inovadora e que aporte ao campo toxicológico.

**As revisões ou atualizações** compreendam trabalhos nos quais se tenha realizado uma ampla e completa revisão de um tema importante e/ou de grande interesse atual nos diferentes campos da toxicologia.

**Os artigos de divulgação e artigos especiais** são comentários de diversos temas de interesse toxicológico.

**As notas técnicas** são descrições breves de técnicas analíticas ou dispositivos novos ou apoiados por trabalhos experimentais conclusivos.

**Resumos de tese:** Resumos ampliados que descrevem teses de Mestrado e Doutorado aprovadas. Estas devem incluir cópia da aprovação da tese com a declaração juramentada do autor e seu orientador. O texto não deve superar 1000 palavras.

Acta Toxicológica Argentina (em diante "Acta"), publicará contribuições em espanhol, português e/ou inglês. Todas serão avaliadas por pelo menos dois revisores; a seleção dos mesmos será atributo exclusivo dos editores. Este processo determinará que o mencionado Comité opte por rejeitar, aceitar com altera-

ções ou aceitar para publicação o trabalho submetido a sua consideração. A identidade dos autores e revisores será mantida em forma confidencial.

### Envio de trabalhos

Os trabalhos podem ser enviados por via eletrônica a [envios.acta.ATA@gmail.com](mailto:envios.acta.ATA@gmail.com) ou em CD-ROM por correio postal à Alsina 1441, oficina 302, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1088AAK).

No caso de envio eletrônico, indicar no assunto: trabalho para Acta e no corpo da mensagem indicar o título do trabalho e os nomes e sobrenomes de todos os autores. Anexar o trabalho (arquivo de Word 2003 ou superior) digitado segundo instruções para autores que estão detalhadas abaixo.

Junto com o envio do trabalho deverá ser enviado uma carta ao Diretor em formato Word, com os nomes de todos os autores solicitando a consideração do artigo para publicação. Na carta deverá constar claramente que:

- O trabalho enviado não haja sido publicado em nenhum outro meio e não será enviado a outra revista científica ou a qualquer outra forma de publicação, enquanto dure a avaliação na *Acta*.
- Todos os autores são responsáveis pelo conteúdo do artigo.
- Todos os autores deverão manifestar de houve ou não conflito de interesses. Se houver financiamento externo, deverá deixar claro a fonte. Assim mesmo, indicar se um ou mais autores tem alguma relação com a companhia comercial cujo produto/s foram empregados ou são mencionados no estudo realizado.
- Em caso de que o artigo seja publicado, todos os autores cedem os direitos de autor à *Acta*.

**Não se poderá dar por iniciado o processo editorial se a carta não contém todos os pontos indicados.**

### Aspectos gerais na preparação do trabalho como artigo original

Os trabalhos devem ser digitados com processador de texto (Microsoft Word versão 2003 ou superior), **com espaço duplo** (inclusive resumos, referências e tabelas) com tamanho

mínimo de letra Arial 12. As páginas deverao ser numeradas desde a capa. As letras em **negrito** ou *itálico* serao usadas somente quando corresponda.

Na primeira página deverá estar indicado: título do trabalho (maiúscula), nomes e sobrenomes completos de todos os autores; lugar de trabalho (nome da instituição e endereço postal), se há autores com distintos lugares de trabalho, deverá ser colocado superíndices numéricos (nao entre parênteses) junto aos nomes, para identificar cada autor com seu respectivo lugar de trabalho; fax e/ou correio eletrônico do autor responsável correspondente (que será indicado com um asterisco na posição de superíndice localizado junto ao nome).

Na segunda página será incluído título em inglês e o resumo no idioma do artigo e em inglês, seguido cada um deles de uma lista de quatro palavras chave, no idioma correspondente. Se o trabalho estiver escrito em inglês, deverá apresentar um resumo em espanhol. As palavras chave devem começar com letra maiúscula e ir separadas por ponto e vírgula.

**Introdução.** Debe incluir antecedentes atualizados sobre o tema e questao e objetivos do trabalho definidos com claridade.

**Materiais e métodos.** Deverá conter a descrição dos métodos, equipamentos, reativos e procedimentos utilizados, com detalhes suficientes para permitir a repetição dos experimentos.

**Considerações éticas.** Em todos os estudos clínicos deverá estar especificado o nome do Comitê de Ética e Investigaçao que aprovó o estudo e que foi realizado com o consentimento escrito dos pacientes. Em todos os estudos com organismos nao humanos, devem estar especificadas as linhas éticas com respeito ao manejo dos eismos durante a realização do trabalho.

**Análises estatísticas.** Devem ser informadas as provas estatísticas com detalle suficiente para que os datos possan ser revisados por outros pesquisadores descrevendo detalhes de cada uma delas. Se foi utilizado um programa estatístico para processar os dados, este deverá ser mencionado nesta seção.

**Resultados.** Deverao ser apresentadas através de **uma** das seguintes formas: no texto, ou através de tabelas e/ou figura/s. Deverao ser evitadas repeticoes e serao destacadas somente dados importantes. Deverá ser deixada para a seção Discussao a interpretação mais extensa. As **tabelas** deverao ser apresentadas em folha á parte, numeradas consecutivamente

com números arábicos, con las leyendas y/o aclaraciones que correspondan al pie. Os avisos para esclarecimentos de rodapé deverao ser realizados empregando números arábicos entre parênteses e superíndice. Somente os bordes externos da primeira e última linha e a separaçao entre os títulos das colunas e os dados deverao ser marcados com linha continua. Nao marcar os bordes das colunas. Assegurar-se que cada tabela seja citada no texto. As **figuras** deverao ser apresentadas em folhas á parte, numeradas consecutivamente com números arábicos. Os desenhos deverao estar em condições que assegurem uma adequada repetição. Os gráficos de barras, tortas ou estatísticas deverao estar no formato GIF. Os números, letras e sinais deverao ter dimensoes adequadas para ser legíveis quando forem impressas. As referencias dos símbolos utilizados nas figuras deverao ser incluídas no texto da legenda. As **fotografias** deverao ser realizadas em branco e negro, com contraste, em papel brilhante e com qualidade suficiente (mínimo 300 dpi) para assegurar uma boa reprodução. Nos desenhos originais ou fotografias deverao constar, no verso, os nomes dos autores e número de ordem escritos com lápis.

As fotos para versao eletrônica deverao ser realizadas em formato JPEG ou TIFF, con alta resolução. Tanto as figuras quanto as fotografias deverao ser legíveis. O tamanho mínimo deverá ser de media carta, ou seja, 21 x 15 cm, a 300 dpi. Em todos os casos deverá estar indicado o aumento (barra o aumento).

As epígrafes das figuras deverao ser apresentadas exclusivamente em folha aparte, ordenadas e numeradas e deverao expressar especificamente o que moestra a figura.

**Abreviaturas.** Serao utilizadas unicamente abreviaturas normalizadas. Deverao ser evitadas as abreviaturas no título e no resumo. Quando no texto se empregue por primeira vez uma abreviatura, esta deverá ir precedida do termo completo, com excessao se trata de uma unidade de medida comum.

**Unidades de medida.** As medidas de longitude, tamaño, peso e volume deverao ser expressas em unidades métricas (metro, quilogramo, litro) ou seus múltiplos decimais. As temperaturas serao expressas em graus Celsius e as pressoes arteriais em milímetros de mercurio.

Todos os valores de parâmetros hematológicos e bioquímicos deverao ser apresentadas em unidades do sistema métrico decimal, de

acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI). Não obstante, os editores poderao solicitar que, antes de publicar o artigo, os autores agreguem unidades alternativas ou diferentes das do SI.

**Nomenclatura.** No caso de substâncias químicas será tomada como referencia prioritária às normas da IUPAC. Os organismos serao denominados conforme as normas internacionais, indicando sem abreviaturas o gênero e a especie em itálico.

**Discussao.** Será feita ênfase sobre os aspectos mais importantes e inovadores do estudo, e serao interpretados dados experimentais em relação com o que já foi publicado. Serao indicadas as conclusoes, evitando reiterar dados e conceitos já citados em seções anteriores.

**Agradecimentos.** Deverao ser apresentados em letra Arial, tamanho 10 e em um parágrafo.

**Bibliografia.** As citações bibliográficas deverao estar indicadas no texto por meio do sobrenome de/os autor/es (até dois autores) e o ano de publicação tudo entre parênteses, separados por ponto e vírgula, e no caso de mais de uma citação, deve-se começar pela da mais antiga a mais atual. No caso de mais de dois autores serao indicados o sobrenome do primeiro autor seguido de *et al.* E o ano da publicação.

#### Exemplos:

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma substância psicoativa mais consumida no mundo (Concon 1988; Lewin 1998; Nehlig 1999).

Em censo geral, seria desejavel que a ingestão total de cafeína durante a gravidez supere 300 mg/día (Organization of Teratology Information Specialists (OTIS) 2001; Kaiser y Allen 2002; Nawrot *et al.* 2003)

As referencias bibliográficas completas serao incluídas ao final do trabalho, abaixo do título da Bibliografia Citada, em ordem alfabética, com o nome de todos os autores em cada caso.

#### Exemplos:

##### 1. Artigo padrao em publicação periódica

Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 347(4):284-287, 2002.

##### 2. Livros e monografias

Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A.. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby, 2002.

##### 3. Capítulo de livro

Meltzer P.S., Kallioniemi A., Trent J.M. Chromosome alterations in human solid tumors. En: Vogelstein B., Kinzler K.W., editores. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

##### 4. Material eletrônico

a. Artigo em publicação periódica em internet  
Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [en línea]. 2002 Jun. [consulta 12 de Agosto 2002];102(6):[1 p.]. Disponível em: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>Article

##### b. Página em internet

Cancer-Pain.org [en línea]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [atualizado al 16 de Maio de 2002; consulta 9 de Julio de 2002]. Disponível en: <http://www.cancer-pain.org/>.

##### c. Parte de uma página de internet

American Medical Association [en línea]. Chicago: The Association; c1995-2002 [atualizado em 23 de Agosto de 2001; consulta 12 de Agosto de 2002]. AMA Office of Group Practice Liaison. Disponível em: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

Para a correcta citação de possíveis referencias bibliográficas que pudessem não ser citadas neste documento, consultar o estilo proposto pelo Comitê Internacional de Diretores de Revistas Médicas em "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html) (consulta 14 de janeiro 2010).