

ISSN 0327-9286

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 19
N° 1
Julio 2011

Acta Toxicológica Argentina 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. 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.



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

Marcela M. López Nigro

Mónica C. Napoli

Carlos R. Mastandrea

Comité Científico

Nelson Albiano

José A. Castro

Lucrecia Ferrari

Mirtha Nassetta

Marta M. Salseduc

Organo de Fiscalización

Mirta E. Ryczel

Claudia V. Vassena

Viviana V. Crapanzano

Tribunal de Honor

Susana I. García

Irma Giolito

Augusto Piazza

Acta Toxicológica Argentina

Director

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

Comité de Redacción

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

Fabiana L. Lo Nostro, *Fac. C. Exactas y Naturales, UBA; CONICET*

Valentina Olmos, *Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA*

Adriana S. Ridolfi, *Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA*

Aldo S. Saracco, *Fac. Ciencias de la Salud, UM; MSAL Gob. de Mendoza*

Comité Editorial

Alejandro Alagón, *Universidad Autónoma de México, México*

José A. Castro, *CITEFA, CONICET, Argentina*

Fernando Díaz Barriga, *Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México*

Heraldo N. Donnerwald, *Universidad Favaloro, Argentina*

Gina D'Suze, *IVIC, Venezuela*

Amalia Laborde, *Universidad de la República, Uruguay*

Bruno Lomonte, *Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica*

Veniero Gambaro, *Università di Pavia, Italia*

Estela Giménez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*

Nelly Mañay, *Universidad de la República, Uruguay*

José M. Monserrat, *Universidad de Río Grande, Brasil*

Irma R. Pérez, *Universidad Autónoma de México, México*

Haydée N. Pizarro, *CONICET, Argentina*

María del C. Ríos de Molina, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*

María M. Salseduc, *Laboratorios Bagó, Argentina*

Carlos Sèvcik, *IVIC, Venezuela*

Francisco O. de Siqueira França, *Instituto Butantan, Brasil*

Norma Vallejo, *SEDRONAR, Argentina*

Edda Villaamil Lepori, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*

Eduardo N. Zerba, *CIPEIN-CITEFA, CONICET, Argentina*

INDICE

(CONTENTS)

CHICOS Y PIBES, propuestas innovadoras para la atención de la salud ambiental infantil en América Latina <i>Cossío Torres, Patricia; Domínguez Cortinas, Gabriela; Hernández Cruz, María Teresa; Morales Villegas, Raúl; Van Brussel, Evelyn; Díaz-Barriga Martínez, Fernando</i>	5
Escorpionismo: presentación de un posible caso grave ocurrido en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires <i>Docampo, Patricia Cynthia; Fernández, María Elisa</i>	16
Evaluación del riesgo ambiental de carbofurano en bioensayos con organismos no blanco <i>Iannacone, José Alberto; Alvariño, Lorena; Paredes, Christian; Alayo, Marianella; Mamani, Nancy; Bonifacio, Juan; Mariano, Mauro; Miglio, María Cristina</i>	19
Contribución de esterasas generales en <i>Triatoma infestans</i> (Hemiptera: Reduviidae) resistentes a piretroides de Argentina y Bolivia <i>Santo-Orihuela, Pablo Luis; Picollo, María Inés</i>	32
RESÚMENES DE TESIS	
Producción de un fragmento de anticuerpo recombinante quimérico anti-esfingomielinasa D contra la mordedura de la araña <i>Loxosceles</i> <i>Moctezuma González, Claudia L.</i>	42
Estudio de las alteraciones bioquímicas, histopatológicas y ultraestructurales producidas por la administración oral a largo plazo de cotinina en ratas. Comparación con nicotina <i>Sassone, Adriana H.</i>	44
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES	46

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

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

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

CHICOS y PIBES, propuestas innovadoras para la atención de la salud ambiental infantil en América Latina

Cossío Torres, Patricia; Domínguez Cortinas, Gabriela; Hernández Cruz, María T.;
Morales Villegas, Raúl; Van Brussel, Evelyn; Díaz-Barriga Martínez, Fernando*

Centro de Investigación en Salud Colectiva, Coordinación para la Innovación y Aplicación de la Ciencia y Tecnología,
Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

*Fernando Díaz-Barriga, Avenida Venustiano Carranza No. 2405, Col. Lomas los Filtros, San Luis Potosí 78210, SLP, México.

*fdia@uaslp.mx

Recibido: 16 de noviembre de 2010

Aceptado: 1 de marzo de 2011

Resumen. En la actualidad los niños en América Latina enfrentan viejas y nuevas amenazas químicas, físicas, biológicas y sociales que aumentan los riesgos en salud. Por ejemplo, los niños se exponen a numerosas sustancias químicas (contaminantes) y ahora además enfrentan a los compuestos de la nanotecnología; se exponen a las radiaciones solares y electromagnéticas junto al incremento en la temperatura dado por la nueva crisis climática; asimismo, mantienen su exposición a la contaminación biológica presente sobre todo en el agua no potable pero ya enfrentan el riesgo de los organismos transgénicos. Finalmente, la violencia familiar o social representa un factor de riesgo para la seguridad humana y los niños son un sector de la población particularmente vulnerable a ella. Para enfrentar estas amenazas nuestro grupo ha creado una propuesta de trabajo denominada CHICOS que incluye el trabajo bajo aspectos Comunitarios, Hospitalarios, de Investigación, con énfasis en la Capacitación, la Orientación a la comunidad y la Seguridad humana. Con esta estructura pueden generarse Programas de Intervención Basados en Evidencia (PIBE) que necesariamente deben ser multidisciplinarios a fin de atender amenazas de tan distinto origen. El fin último es reproducir la estrategia para que paulatinamente vayan estableciéndose grupos de salud ambiental infantil en América Latina.

Palabras clave: Salud ambiental; Salud infantil; Vulnerabilidad; Contaminación.

Abstract. In Latin America children today are facing new and old chemical, physical, biological and social threats. They are exposed to chemical pollutants, to solar and electromagnetic radiations, to biological contaminants and now to new threats such as: nanotechnological products, an increase in the ambient temperature due to the climate crisis, and to transgenic organisms. Furthermore, violence either within the family or in the society is also a risk factor for which children are a vulnerable population. In order to design multidisciplinary Evidence-Based Intervention Programs (PIBE) our group is proposing a new academic structure: CHICOS. This structure includes activities in different areas: the Community, the Hospital, Research, Capacity Building, community Orientation (risk communication), and human Safety. The idea is to build groups around this structure in different countries with one goal: to start working in Children's Environmental Health Issues.

Key words: Environmental health; Child health; Vulnerability; Pollution.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que a nivel global los mayores riesgos para la carga de enfermedad medidos por años de vida ajustados por discapacidad (DALYs por sus siglas en inglés) son bajo peso (6% de los DALYs globales), sexo no seguro (5%), abuso de alcohol (5%) y uso de agua no potable junto con pobres condiciones de sanidad e higiene (4%) (Organización Mundial de la Salud 2009). Esto se traduce en la

muerte de millones de niños (10,4 millones en el 2004) sobre todo en países de bajo y medio desarrollo económico. Se estima que el 39% de estas muertes se deben a problemas nutricionales, bajo peso, lactancia deficiente y riesgos ambientales prevenibles (Organización Mundial de la Salud 2009). En este contexto también se ha reportado que 42% de las infecciones respiratorias bajas y 24% de las infecciones respiratorias altas se deben a

procesos de contaminación de interiores por uso de biomasa, tabaquismo pasivo, condiciones de vivienda y contaminación atmosférica exterior (Prüss-Üstün y Corvalán 2006). En tanto, 88% de todos los casos de diarrea en el mundo se deben a las condiciones de agua, sanidad e higiene (Prüss-Üstün y Corvalán 2006). Pero los riesgos no paran ahí, las principales causas de muerte en el mundo (riesgos cardiovasculares, tabaquismo, diabetes, falta de ejercicio y sobrepeso/obesidad) están ya afectando a niños y adolescentes (Organización Mundial de la Salud 2009).

Este es el escenario que enfrentamos, este es el escenario que requiere de una intervención integral focalizada sobre todo en la prevención y por lo tanto, de atención centrada en las etapas de vida de mayor vulnerabilidad, las etapas fetales, infantiles y adolescentes. Justamente las etapas enmarcadas por la Organización Mundial de la Salud bajo el concepto de salud ambiental infantil (International Programme on Chemical Safety 1986).

¿POR QUÉ LOS NIÑOS?

Como lo señalamos en el párrafo anterior, en este artículo el concepto de niño abarcará desde la concepción hasta los 18 años de edad, que son las etapas señaladas por la OMS para salud infantil dado que durante ellas se llevan a cabo los principales procesos de desarrollo. Por lo anterior, no resulta extraño que una de las frases que mayor popularidad ha adquirido en los últimos años es la que señala que “el niño no es un adulto pequeño”. La Organización Panamericana de la Salud (Organización Panamericana de la Salud 2003), con fundamento en documentos generados por la OMS (Organización Mundial de la Salud 2002) y la Comisión de Cooperación Ambiental (Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte 2002), ha declarado que los niños son el grupo social más vulnerable a las amenazas ambientales. Las razones se explican a continuación.

Durante la etapa fetal una exposición química, física o biológica puede dar lugar a alteraciones en el desarrollo, tales como: la muerte del organismo, la aparición de anomalías estructurales, un crecimiento alterado o bien, deficiencias funcionales (International Programme on Chemical Safety 1986). Es importante hacer notar que el que se presente una manifestación u otra, depende de la dosis del tóxico y del momento crítico durante

el cual ocurre la exposición. A estos períodos críticos de susceptibilidad a la exposición se les denomina ventanas de susceptibilidad o de vulnerabilidad y son diferentes para cada órgano o tejido, ya que dependen del desarrollo propio de ellos (International Programme on Chemical Safety 1986). Las ventanas de susceptibilidad han adquirido renovado interés debido a que las manifestaciones de una exposición *in utero* pueden expresarse al nacimiento (bajo peso, malformaciones congénitas, mortalidad infantil, etc.); pero también, llegan a advertirse hasta la infancia (asma, cáncer, alteraciones neurológicas, y efectos en el comportamiento); o incluso hasta la etapa adulta (alteraciones neurodegenerativas, padecimientos cardiovasculares o cáncer) (International Programme on Chemical Safety 1986).

Después de su nacimiento el niño es un organismo que busca crecer y por lo tanto, su organismo está adaptado para absorber más y excretar menos, lo cual lo pone en riesgo si entra en contacto con algún tóxico; además, su capacidad detoxificante no está del todo desarrollada como tampoco lo está al nacimiento, la barrera hematoencefálica (facilitándose así la llegada de compuestos al sistema nervioso central) (International Programme on Chemical Safety 1986). Es claro entonces que los niños son más susceptibles, pero no solo por su estado en desarrollo, sino también, por que tienen rutas propias de exposición. Por ejemplo, tienen mayor exposición dérmica por el uso de pañales, ingieren leche materna, comen más suelo, se pasan más tiempo en áreas que les permite mayor inhalación de partículas y por su curiosidad e ignorancia se exponen a ambientes de riesgo, etc. (International Programme on Chemical Safety 1986; Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte 2002; Organización Mundial de la Salud 2002; Organización Panamericana de la Salud 2003) En un escenario de contaminación de suelo por plomo, el niño está más expuesto que el adulto, no solamente porque ingiere más suelo, sino porque el niño absorbe hasta cinco veces más plomo que el adulto. Por ello, es cierto, el niño no es un adulto chiquito y entonces es lógico concluir que las normativas ambientales que protegen al adulto no siempre protegen al niño.

La dependencia de los niños por los adultos es entonces otro factor de vulnerabilidad y no solo para generar nuevas normativas que

lleven a la protección infantil. Los niños necesitan de la orientación adulta para disminuir los riesgos de una exposición innecesaria (jugar en un sitio contaminado, prevención de accidentes domésticos como la ingestión de algún compuesto químico, etc.); pero también están a expensas de que los adultos aboguen por ellos para evitar conductas anómalas de la sociedad. Por ejemplo, legislan en contra del trabajo infantil pero no lo evitan, lo cual de inmediato convierte a este tipo de trabajo en una actividad ilegal, lo que desemboca en cargas de trabajo brutales y en condiciones mínimas de protección: sin ropa adecuada, con horarios anormales para la edad, en escenarios de alta exposición, sin cuidados médicos y por supuesto, sin poder aplicar derechos laborales de los que sí gozan los adultos.

En la sociedad actual los niños están en riesgo, pero también la sociedad lo está. Cualquier cosa que afecte a la niñez afecta al futuro de la humanidad. Tal es el caso de los neurotóxicos que disminuyen el coeficiente intelectual y las capacidades de los pequeños; la exposición a este tipo de químicos, puede provocar un futuro con un porcentaje menor de adultos con habilidades para plantear alternativas, y al mismo tiempo, un futuro con una mayor cantidad de adultos incapaces de aspirar a mejores opciones laborales, adolescentes con problemas académicos y desempleo. Un futuro con individuos que ni estudian ni trabajan pero comen y quieren divertirse. Violencia urbana, costos económicos para los países para mantener servicios y necesidad de una educación especializada, son entonces, algunos de los rubros a tomar en cuenta cuando se realice un análisis costo-beneficio de la atención de las amenazas infantiles.

Por cierto, en Estados Unidos, se ha estimado que la exposición al plomo le cuesta a aquel país 43 mil millones de dólares anuales (Landrigan y col. 2002). De hecho, se ha estimado que por cada microgramo de plomo por decilitro de sangre que logre disminuirse en programas de intervención nacionales, el ahorro llega a ser de cinco mil millones de dólares (Schwartz y col. 1985). Lo que es increíble es que el costo del plomo se da sobre todo por la pérdida económica (ganancias personales) que tendría un sujeto con coeficiente intelectual menor de lo normal (recordemos que el plomo es un neurotóxico que disminuye el intelecto).

RIESGOS INFANTILES

Riesgo se define típicamente como la probabilidad de que ocurra un efecto adverso por la exposición a una amenaza o a un estresor. Este concepto sin embargo, es limitado ya que no incluye la capacidad de respuesta del receptor (individuo o comunidad). Por lo tanto, a nosotros nos parece que la mejor manera de entender el riesgo es bajo la combinación de las magnitudes de la amenaza y de la vulnerabilidad del receptor. Así, un riesgo podría ser alto si la amenaza fuese alta o si la vulnerabilidad lo fuere; sería máximo cuando una comunidad (o un individuo) muy vulnerada estuviere expuesta a una gran amenaza. De aquí surge que la vulnerabilidad sería la incapacidad de la comunidad (o del individuo) para responder de manera adecuada ante una amenaza determinada (Wilches-Chaux 1993).

Las amenazas infantiles pueden ser químicas, físicas, biológicas y sociales. Dentro de las químicas apuntamos a los contaminantes del ambiente, pero también deberíamos incluir a los fármacos, dada su importancia en las intoxicaciones agudas y a las drogas de adicción. Una amenaza química emergente serían los productos de la nanotecnología. Amenazas físicas serían el ruido, las radiaciones (ionizantes y no ionizantes) y como amenaza emergente el incremento de temperatura asociado al fenómeno de crisis climática (golpes de calor). Finalmente, como ejemplos de amenazas biológicas estarían los virus, las bacterias, los parásitos, las toxinas biológicas y como emergente, los organismos transgénicos. La magnitud de la amenaza dependería de sus propias características fisicoquímicas, de su capacidad nociva y de su concentración en el ambiente. Ahora bien, en otro contexto también debemos hablar de las amenazas sociales, como lo podrían ser: la situación de violencia en zonas de conflicto armado; la agresión física constante de un pariente alcoholizado; o la violencia asociada al comercio de estupefacientes y otras drogas de adicción. La amenaza social constante puede provocar la formación de un niño con cualidades sorprendentes pero también la aparición de niños mutilados mentalmente.

En cuanto a los factores de vulnerabilidad hay múltiples pero algunos de ellos serían la vulnerabilidad económica (pobreza, carencia de recursos naturales, etc.); la provocada por la marginación (grupos indígenas, migrantes, etc.); la social (nivel educativo, acceso a servicios

médicos, etc.); la geográfica (vivir en sitios contaminados, en zonas endémicas de alguna enfermedad –malaria, dengue, Chagas–, en zonas vulnerables al cambio climático, etc.); o la nutricional (sobrepeso, obesidad o desnutrición) (Díaz-Barriga 2010).

ESCENARIOS COMPLEJOS

Se ha estimado globalmente que un 24% de la carga de enfermedad (años de vida sana perdidos) y un 23% de la mortalidad prematura se debe a factores ambientales (Prüss-Üstün y Corvalán 2006). Pero entre la población infantil de 0-14 años, la proporción de mortalidad atribuida al ambiente sube hasta un 36% (Prüss-Üstün y Corvalán 2006).

Ahora bien, a nivel mundial existen amplias diferencias de la carga de enfermedad ambiental infantil entre países pobres y naciones con economías desarrolladas (Prüss-Üstün y Corvalán 2006). Así por ejemplo, entre los países pobres los niños tienen una carga de enfermedad 800 veces mayor para infecciones respiratorias bajas y 140 veces mayor para diarreas que sus pares de naciones desarrolladas (Prüss-Üstün y Corvalán 2006).

Los números reflejan un escenario mundial grave, pero se podría argumentar que dicho escenario

polarizado está sesgado ya que cuenta con la influencia de los países más pobres del mundo. Si bien esto es cierto, también es cierto que al interior de los países Latinoamericanos existen regiones cuyo Índice de Desarrollo Humano (IDH) es comparable con las regiones más pobres del planeta (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo 2010); por ejemplo, en México contamos con municipios cuyo IDH se ubica por debajo del promedio para los países de la África Subsahariana (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo 2004).

Es decir, aunque un país pueda tener estadísticas nacionales adecuadas en materia de salud, al interior del mismo país podrían existir regiones que necesiten urgentes programas de atención por sus altos índices de marginación. Así, esta polaridad mundial de ricos vs. pobres, también llega a manifestarse entre las distintas regiones al interior de muchos países de economías intermedias. En estos casos, los promedios nacionales no deben justificar la inacción en regiones marginadas.

Para ejemplificar lo anterior, veamos el caso de una típica comunidad indígena al Sur de la Huasteca Potosina de México, la cual presentamos en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Amenazas, factores de vulnerabilidad y riesgos en salud infantil, de una comunidad indígena al Sur de la Huasteca Potosina de México

AMENAZAS	FACTORES DE VULNERABILIDAD	RIESGOS EN SALUD INFANTIL
Hidrocarburos poliaromáticos y otros químicos del humo de leña y de la quema de basura	Educación materna limitada	Salud mental
DDT residual por ser zona malárica	Bajo nivel escolar en la zona	Infecciones respiratorias
Manganeso proveniente de una zona minera y plomo del barro vidriado que emplean algunas familias	Desnutrición	Asma
Temperatura extrema y huracanes relacionados con cambio climático	Hacinamiento	Diarreas
Limitado acceso al agua potable y fecalismo al aire libre	Alcoholismo y violencia familiar	Violencia adolescente
Presencia de basura electrónica (radios, televisores, celulares, etc.; allegados por migrantes)	Pobreza, marginación y desempleo	Migración
	Atención médica deficiente	
	Explotación no controlada de los recursos naturales	

Es obvio que en este caso, como en muchos otros, la intervención para reducir los riesgos infantiles debería buscar abatir no solo las amenazas sino también, los factores de vulnerabilidad. Es decir, se requiere de un equipo técnico multidisciplinario que aplique una propuesta integral para abordar problemáticas ambientales, ecológicas, sociales y sanitarias. Todas con un solo objetivo, mejorar las condiciones de vida de los niños.

ESQUEMAS PARA LA ATENCIÓN DE LOS RIESGOS INFANTILES

Para la atención de la salud ambiental infantil se han generado diversas propuestas, algunas de ellas muy interesantes. Pero destaca entre todas, la red de Unidades Pediátricas Ambientales, inicialmente ideada en los Estados Unidos pero ya con adaptaciones en Canadá, México, Argentina, Chile y España.

La Unidad Pediátrica Ambiental (UPA) ha sido conceptualizada como una entidad académica, típicamente asociada a un centro médico universitario (o con algún mecanismo que permitiera la interacción entre la academia y el hospital) y cuyas principales funciones son: i) educación comunitaria y actividades de extensión; ii) capacitación de profesionales de la salud; y iii) asesoría y atención médica (muchas UPAs se encuentran asociadas a Centros de Información y Atención Toxicológicas) (AOEC 2006).

Si bien las UPAs han representado un gran avance para el área de la salud ambiental infantil, el concepto ha resultado ser poco flexible para la atención de grupos vulnerables. La primera limitante de las UPAs y la más importante para nuestra región, es la propia concepción; es decir, la de un grupo médico en un hospital de segundo o tercer nivel de atención; cuando lo que requieren los grupos vulnerables, esos con problemas de diarreas e infecciones respiratorias, es la atención primaria, es la atención en las propias comunidades. La segunda limitante es que la UPA es un concepto médico, cuando ahora lo que debe atenderse en las regiones marginadas son problemas integrales que requieren de la multidisciplinariedad, incluyendo la atención a aspectos ambientales, sociales, económicos, políticos y de recursos naturales. Finalmente, la UPA implica la capacitación de médicos concentrados en el niño y en el ambiente, lo cual es muy positivo pero poco realista en nuestro medio, donde los médicos por un lado son especialistas y

por el otro lado laboran en hospitales de concentración saturados de trabajo; además, durante la preparación del estudiante de medicina los temas de toxicología, medio ambiente y salud pública no son tópicos que se atiendan con la profundidad debida (Organización Panamericana de la Salud 2008). Es decir, no abundan los pediatras o médicos con interés por la atención de la problemática ambiental. A pesar de lo anterior, la creación de las UPAs vino a dar renovados bríos a los esfuerzos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el tema de la Salud Ambiental Infantil. La OMS ha celebrado varias reuniones internacionales y cuenta ya con una red de Centros Colaboradores en este tema, una primera propuesta de trabajo globalizado se presentará a finales del 2010.

En este escenario, en México, la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) a través de su Facultad de Medicina cumple en el 2011, 25 años de trabajo en el tema de la salud ambiental infantil. Con la experiencia de los estudios en sitios contaminados, en comunidades indígenas y en favelas urbanas, la UASLP, uno de los centros colaboradores en salud ambiental infantil de la OMS, ha desarrollado un concepto de trabajo, el cual además incluye lo mejor de las experiencias de las UPAs y toma en cuenta las ideas vertidas por la OMS en sus diversas reuniones sobre el tema.

El eje central de nuestra propuesta es la gobernanza en salud ambiental infantil. Gobernanza es un término que recientemente ha sido aplicado en diversas modalidades y por lo tanto cuenta con numerosas conceptualizaciones; sin embargo, todas ellas tienen tres ejes en común: i) algún mecanismo de acción; ii) la interacción entre integrantes de la sociedad y elementos de gobierno; y iii) la búsqueda del desarrollo sostenible.

En nuestro caso, definimos como gobernanza en salud ambiental infantil al conjunto de acciones realizadas de forma sostenida, por un mecanismo que facilite la emancipación de las comunidades vulneradas, y que lleven a la protección de la población de 0-18 años de edad (donde el cero implica desde la concepción).

Para lograr tal fin consideramos que se requieren acciones en seis espacios: i) el **Comunitario**; ii) el **Hospitalario**; iii) el de **Investigación**; iv) el de **Capacitación**; v) el de la **Orientación**; y vi) el de **Seguridad Humana**.

“CHICOS” UNA PROPUESTA DE ESTRUCTURA PARA LA ATENCIÓN DE LA SALUD AMBIENTAL INFANTIL EN COMUNIDADES VULNERABLES

La salud ambiental infantil debe ser atendida por un equipo de profesionistas donde, por supuesto, debe haber elementos del sector salud, pero dónde también tiene que haber representantes de otras especialidades. Este equipo multidisciplinario, para actuar de forma coordinada, debe contar con una estructura; “CHICOS” busca dar dicha estructura, por lo cual a continuación se detallan sus componentes y el como interaccionan entre sí.

Comunidad / CASITA

El primer elemento de la estructura “CHICOS” es el que trabaja con la comunidad y para ello se plantea la creación de una “CASITA” (Centro de Apoyo en Salud Infantil y Tópicos Ambientales) en cada una de las comunidades en las cuales se inicia un trabajo sobre salud ambiental infantil. La CASITA se concibe como un espacio físico o virtual de interacción total entre la comunidad y el cuerpo académico, para trabajar de forma conjunta en los diversos tópicos multidisciplinarios que lleven a la reducción de los riesgos infantiles y con ellos al desarrollo comunitario. La CASITA trabaja entonces bajo el concepto de los determinantes sociales de salud adaptados a la población infantil (Organización Mundial de la Salud 2008). A nivel local el espacio es manejado por miembros de la comunidad capacitados como promotores de salud ambiental, ellos son los elementos clave dado que se transforman en los coordinadores de las actividades en su comunidad. Estas actividades se dan en cuatro áreas: salud, ambiente, sociedad y ecología comunitaria. Las primeras tres se entienden y no requieren mayor explicación, pero la cuarta, deseamos señalarla aparte, por lo novedoso del término.

Por ecología comunitaria entendemos aquellas acciones que buscan manejar los recursos naturales de manera sustentable para el beneficio de la comunidad. Dos ejemplos aclaran lo señalado: i) la extinción de algunas especies de la flora pueden poner en riesgo a las comunidades en caso de que esta flora sea utilizada para artesanías, para medicina tradicional o bien para la dieta (seguridad alimentaria), en este caso, la ecología comunitaria realizaría un diagnóstico y establecería las medidas de protección ecosistémica; ii) el segundo ejemplo

tiene que ver con la malaria; ya que se ha estimado que el 42% de la carga de malaria a nivel mundial (tres millones de muertes anuales), podría prevenirse con un manejo ambiental (controlando, por ejemplo, la reproducción de vectores aplicando medidas ecológicas de control de vegetación tanto en cuerpos de agua como en la propia comunidad) (Prüss-Üstün y Corvalán 2006).

La CASITA llega a ser el eje de interacción para el diagnóstico, las propuestas de mitigación, la vigilancia ambiental y/o sanitaria y la educación comunitaria, que son en su conjunto, las fases requeridas por todo programa de intervención basado en evidencia (ver siguiente sección); por lo tanto, es indispensable que cada CASITA cuente con servicio de cómputo y conexión a internet. La conectividad hoy en día es fundamental para la asesoría a distancia.

Hospital / CIAT

En un programa de salud ambiental infantil, la participación de los profesionales de la salud (de medicina y enfermería) a nivel centro de salud es necesaria para la atención de intoxicaciones agudas o crónicas, para la orientación a padres de familia, para la producción de propuestas de prevención y para la educación de colegas en tópicos de toxicología ambiental.

Aquí el esquema de UPA queda bien, pero en América Latina contamos en varios países con un profesionista con mejor perfil para el trabajo de salud ambiental, éste es el toxicólogo clínico. Asimismo, dado que la mayoría de los toxicólogos clínicos se encuentran asociados a algún Centro de Información y Atención Toxicológica (CIAT), preferimos el modelo de CIAT con toxicólogos clínicos que el de UPA con pediatras ambientales, por ser el primero un modelo de eficiencia reconocida en América Latina. No obstante, es obvio que ambos, el CIAT y la UPA no se excluyen entre sí; en todo caso, sería aconsejable que un CIAT cuente con el apoyo de pediatras, como también lo sería el que una UPA cuente con toxicólogos clínicos. Aquí lo interesante es que el CIAT o la UPA se conecten con las CASITAS a través de las herramientas de la Telemedicina, y por lo tanto, se facilite el que el personal hospitalario participe en la formación de los promotores de salud ambiental que atiendan las CASITAS, ya que ellos serán su contacto con el personal médico o los médicos tradicionales de la región.

Investigación / CISAI

Las propuestas de investigación en un programa de salud ambiental infantil deben tener como objetivo el disminuir las incertidumbres del conocimiento científico en esta área. Por ejemplo, en la actualidad, más de 85 mil compuestos sintéticos tienen licencia de comercialización y 2800 de ellos se producen cada año en una cantidad igual o mayor a las 500 toneladas, por lo tanto, son los que mayormente podrían estar asociados a eventos de exposición humana (Landrigan y col. 2003). Desgraciadamente, menos de la mitad de estos casi tres mil compuestos han sido evaluados en cuanto a su capacidad tóxica para el humano, y menos aún lo han sido para revisar su toxicidad en los niños o durante el desarrollo. Es decir, su capacidad tóxica nos es desconocida (Landrigan y col. 2003).

Aunado a lo anterior, otros puntos que merecen ser atendidos por la investigación en salud infantil serían: i) el desarrollo de nuevos biomarcadores (de exposición, de efecto o de susceptibilidad); ii) el empleo de la epigenética para la evaluación predictiva del riesgo en salud (considerando el hecho del origen fetal de la enfermedad posnatal); y iii) la evaluación toxicológica de mezclas químicas en sitios contaminados, combinando los conocimientos en población humana y en organismos de la fauna local.

Nuestro grupo ha conjuntado todas las acciones de investigación en un Centro de Inteligencia de Salud Ambiental Infantil (CISAI) y sus participantes están en estrecho contacto con quienes trabajan en las CASITAs y en el CIAT.

Capacitación

Solamente en México existen más de 1500 municipios marginados y considerando sus estadísticas de salud, puede concluirse que todos ellos requieren de la instrumentación de programas encaminados a la protección de la salud ambiental infantil. Es obvio que ante tal número de municipios, la formación de grupos multidisciplinarios que trabajen el área de la salud infantil se convierte en una prioridad de salud pública.

La estructuración de grupos requiere del establecimiento de programas de formación de recursos humanos y de la instrumentación de talleres de educación continua. Para este fin, nuestro grupo ha desarrollado la licenciatura en ciencias ambientales y salud, participa en el posgrado multidisciplinario de ciencias am-

bientales (maestría y doctorado) y esta analizando nuevos esquemas para la residencia médica en salud pública. En cuanto a los talleres de educación continua, se trabaja en diplomados de ecotoxicología y de riesgos en salud, pero también se han generado propuestas específicas sobre evaluación del riesgo infantil para su ejecución en diversos países (por ejemplo, los de Centroamérica). Finalmente, estamos estructurando una red de salud infantil para América Latina.

Si bien la capacitación de cuadros académicos es prioritaria, también lo es la capacitación de promotores comunitarios de salud ambiental. Este punto es crucial para ligar a las comunidades con las propuestas del grupo académico y para que el cuerpo de investigadores reconozcan con claridad las propuestas de la comunidad. Dado que el perfil de un promotor de salud ambiental puede variar de región a región, continuamente estamos en revisión de las capacidades necesarias y de los cursos de entrenamiento para su enseñanza.

Orientación

La orientación debe tener dos componentes: uno dirigido a la toma de decisiones y otro a la comunicación de riesgos a la población en general pero con énfasis en la población infantil. En cuanto a la toma de decisiones, es muy importante desarrollar métodos y modelos estadísticos y/o matemáticos para la priorización de los factores de riesgo (vulnerabilidades y amenazas). La Organización Panamericana de la Salud ha lanzado desde hace tiempo un esquema denominado "sala situacional", el cual sería muy importante revisar para adaptarlo al área de la salud ambiental infantil y a la toma de decisiones para niveles comunitarios.

Sobre la comunicación de riesgos, nuestro grupo ha explorado múltiples herramientas y, por supuesto, las que mayor éxito han tenido desde el punto de vista educativo son las interactivas (obras de teatro, teatro guiñol, concursos, etc.) (Torres-Nerio y col. 2010). Sin embargo, la interpretación del dibujo infantil nos ha resultado sumamente valiosa para la evaluación de las conductas de los niños antes y después de establecido el programa de comunicación. En nuestros esquemas de orientación participan activamente todos los miembros del grupo.

Seguridad humana

El concepto de seguridad humana puede ser

tan amplio como se quiera y puede abarcar cuestiones que van desde los accidentes de tráfico hasta la seguridad alimentaria. En este contexto, es importante señalar que para algunos autores, la niñez es un constructo que tiene definiciones biomédicas (ya establecidas en este documento); pero que también depende de influencias culturales y de aspectos sociales (Boyden 2003). Por lo tanto, las vulnerabilidades y la capacidad de respuesta ante una amenaza son diferentes en los distintos contextos y dependen sí, de la etapa del desarrollo del niño, pero también de los ambientes sociales o culturales.

Sin menospreciar otros temas que son muy importantes para la población infantil (por ejemplo, los accidentes de tráfico ocupan primeros lugares de mortalidad entre los adolescentes), en tópicos de seguridad humana, nuestro grupo ha identificado una gran necesidad de trabajar en comunidades marginadas que además se ubican en: i) regiones en riesgo por conflicto armado (desplazados de territorios en combate; áreas en violencia por narcotráfico; etc.); ii) zonas amenazadas por el cambio climático (inundaciones, sequías, incendios forestales, etc); y/o iii) áreas con recursos naturales devastados. Además, en estos sitios, como en muchos otros, la prevención de las adicciones entre los jóvenes es un punto prioritario de salud pública.

Por la inseguridad y, en muchas ocasiones, por el difícil acceso a estas áreas, la metodología que mejor aplica es la organización de la co-

munidad para que ella misma identifique sus problemas y gestione sus soluciones. El trabajo comunitario en estas zonas garantiza la continuidad de los esfuerzos y la permanencia de los proyectos. En este escenario, el concepto de CASITA; la formación de promotores con visión holística de la salud y el ambiente; y la asesoría a distancia a través de la conectividad en red, se vuelven herramientas muy valiosas.

“PIBE” UNA PROPUESTA METODOLÓGICA PARA GUIAR EL TRABAJO DE LOS “CHICOS”

“CHICOS” es entonces una estructura académica que permite trabajar los frentes necesarios para desarrollar un programa de salud ambiental infantil. Pero la integración de los componentes comunitarios, hospitalarios, de investigación, de capacitación, de orientación y de seguridad humana, requieren de una metodología que los ligue horizontalmente; una metodología que al integrarlos los complemente y por lo tanto, los haga más productivos.

La metodología que hemos diseñado se basa en el diseño de Programas de Intervención Basados en Evidencias y consta de cuatro fases:

i) Peritaje integral, que es un diagnóstico de las condiciones de salud humana y en algunos casos, de la salud ecosistémica, que incluye la evaluación de las amenazas y de los factores de vulnerabilidad, con esta fase se generan las evidencias necesarias para el diseño de los programas de intervención (*Tablas 2 y*

Tabla 2. Elementos para el peritaje integral

DESCRIPCIÓN DEL ESCENARIO DE RIESGO	YIN/YAN	PROGRAMA CERO RIESGOS
FUENTES Y AMENAZAS Historia del sitio Identificación de los tóxicos prioritarios, analizando las posibles fuentes	FACTORES TÓXICOS Mecanismos y toxicocinética de los principales tóxicos en el sitio. Estableciendo las posibles interacciones entre ellos	EVALUACIÓN AMBIENTES INFANTILES Casa Escuela Recreación Ocupacionales
RUTAS DE EXPOSICIÓN Definición de ellas	FACTORES PROTECTORES Individuales (celulares). Sociales Ambientales (externos)	MONITOREO DE RUTAS DE EXPOSICIÓN Factores del sitio o del tóxico que afectan la exposición. Concentración de tóxicos índice en las rutas de exposición
RECEPTORES Humanos Ecológicos	HISTORIAS SEMEJANTES Otros sitios similares que hayan sido estudiados en alguna región del mundo (lecciones aprendidas a partir de su análisis)	ESTIMACIÓN DE LA EXPOSICIÓN Determinística Probabilística
PARTICIPACIÓN COMUNITARIA Visita al sitio Esquema de la problemática Establecimiento de la CASITA Promotores de Salud Ambiental		

Tabla 3. Elementos para el peritaje integral

TOXICOLOGÍA CLÍNICA	VULNERABILIDAD	PROCURACIÓN
<p>EVALUACIÓN EXPOSICIÓN Empleo de biomarcadores de exposición en la población infantil expuesta a los contaminantes críticos del sitio. Participación del personal del laboratorio del CISA</p>	<p>INDICADORES INTEGRALES Obtención de información de indicadores ambientales, sanitarios, sociales, y/o ecológicos. Los indicadores serán seleccionados por el cuerpo académico</p>	<p>CARGA DE ENFERMEDAD Cuando exista la información necesaria puede calcularse la carga de enfermedad (ver métodos de la OMS)</p>
<p>MARCADORES TEMPRANOS Aplicación de biomarcadores de efecto para reconocer si la exposición ha afectado a la población infantil</p>	<p>HUELLA SANITARIA Estadística aplicada a la información generada con la aplicación aplicación de los indicadores. Desarrollo de una sala situacional</p>	<p>COSTOS Y BENEFICIOS Cuando exista la información necesaria puede calcularse los costos de no hacer una intervención vs. los beneficios de hacerla, comparando los resultados contra los costos de la restauración ambiental (ver métodos de la OMS)</p>
<p>EXPLORACIÓN CLÍNICA Toxicología clínica de signos y síntomas en los niños más expuestos. Participación del personal adscrito al CIAT</p>	<p>FACTORES DE VULNERABILIDAD A partir de la huella sanitaria se podrán priorizar los factores ambientales, sociales, sanitarios y/o ecológicos que más estén afectando al sitio</p>	<p>CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO Elaboración de un dictamen sobre los riesgos identificados tomando en cuenta toda la información generada y haciendo un análisis sumando todas las evidencias</p> <p>GESTION Documento para los tomadores de decisión donde se identifiquen las medidas de intervención necesarias para disminuir los riesgos</p>

3); ii) Intervención, que son las medidas a instrumentar para lograr la reducción de los riesgos en salud infantil diagnosticados en la fase anterior; iii) Balance y vigilancia para definir las incertidumbres que requieren de investigación y evaluar el éxito de la intervención; y iv) Educación comunitaria y profesional (por ejemplo, programas de capacitación para el personal médico de la localidad en estudio).

Con respecto a la intervención es importante hacer notar que nosotros las dividimos en los procesos que intervienen en la reducción de las amenazas, en el amortiguamiento de los factores de vulnerabilidad y la atención a los aspectos sanitarios, ambientales, ecológicos y sociales de la comunidad evaluada. Asimismo, creemos indispensable generar mecanismos de protección civil a través de la función de los promotores de salud ambiental, tales como la formación de brigadas y el diseño de planes de contingencia para que, a través de internet, la CASITA pueda estar conectada con centros de salud, con el CIAT y con nuestro Centro de Investigación. Un esquema de protección civil enfocado a la población civil es nuestro programa CRIOS (comunicación de riesgos infantiles para la orientación sanitaria), con el cual, mediante diversas herramientas,

se orienta a los niños sobre los riesgos en salud presentes en sus ambientes (casa, escuela, áreas de recreación y en algunos casos ambientes ocupacionales).

La intervención deberá ser evaluada y cada grupo, cada caso, presenta necesidades diferentes por lo cual no pueden plantearse de antemano los mecanismos aplicables. Sin embargo es muy importante generar vigilancia y el esquema más útil sería la formación de una red comunitaria de vigilancia, por supuesto, coordinada por los promotores de salud ambiental.

Todo el esquema PIBE se facilita con la participación de la comunidad y de los profesionales que trabajan en ella, por lo cual, los procesos de educación en este esquema tienen como objetivo principal la homogenización de la información sobre las propuestas de trabajo. Asimismo, se plantea en esta fase educativa la necesidad de registrar en documentos académicos y de divulgación todos los datos y todas las experiencias, para que los métodos puedan ser replicados en lugares similares. Finalmente, no se descarta el empleo de medios de comunicación para informar a la comunidad sobre los trabajos a efectuar.

Sobre la metodología PIBE es útil aclarar que

en muchos sitios pudiera no ser necesaria la aplicación total de todas sus secciones; sin embargo, decidimos presentarlas para que los lectores apreciaran el alcance de las mismas.

CONCLUSIÓN

Las estadísticas nacionales y mundiales son claras, el ambiente está afectando a la salud y los niños están siendo el sector de la población más impactado por este hecho. Por consiguiente, se requiere establecer un programa de salud ambiental infantil, cuya solidez y alcances estarán condicionados a la estructura que lo promueva y a la metodología que se emplee. En este documento presentamos la propuesta de una estructura multidisciplinaria denominada "CHICOS" (con acciones en comunidad, hospital, investigación, capacitación, orientación y seguridad humana) capaz de sostener una metodología que propone el diseño de programas de intervención basados en evidencias (metodología "PIBE") y que por lo tanto incluye estudios integrales en cuanto a diagnóstico, intervención, vigilancia y educación. CHICOS y PIBE son esquemas innovadores que se adaptan plenamente a esquemas ya probados en América Latina; en consecuencia, creemos que pueden ser aplicados con facilidad bajo la sombrilla de una nueva gobernanza para la salud ambiental infantil en nuestra región.

Agradecimientos

El trabajo fue realizado gracias al apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fondo Sectorial Salud-2007-C01-69320).

BIBLIOGRAFÍA CITADA

AOEC.org [en línea]. Washington: Association of Occupational and Environmental Clinics (AOEC). The Pediatric Environmental Health Specialty Units: A Network of Experts in Children's Environmental Health [en línea]. [consulta 13 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://www.aoec.org/PEHSU.htm>.

Boyden J. Children under Fire: Challenging Assumptions about Children's Resilience. *Children, Youth and Environ.* 2003;13:1.

Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte. Programa de Cooperación sobre Salud Infantil y Medio Ambiente en América del Norte. Montreal (CA): Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte; 2002.

Díaz-Barriga F, García S, Corra L. Prevención de riesgos ambientales en poblaciones vulnerables. En: Finkelman J., Galvao L.A., editores. *Determinantes ambientales y sociales de la salud.* Organización Panamericana de la Salud. En prensa 2010.

International Programme on Chemical Safety. Principles for evaluating risks from chemicals during infancy and early childhood; the need for a special approach. *Environmental Health Criteria* 59. 1986.

Landrigan P.J., Kimmel C.A., Correa A. y Eskenazi B. Children's health and the environment: public health issues and challenges for risk assessment. *Environ Health Perspect.* 2003; 112:257-265.

Landrigan P.J., Schechter C.B., Lipton J.M., Fahs M.C., Schwartz J. Environmental pollutants and disease in American children: estimates of morbidity, mortality, and costs for lead poisoning, asthma, cancer, and developmental disabilities. *Environ Health Perspect.* 2002;110:721-728.

Organización Mundial de la Salud. *Children in the New Millennium.* Ginebra (SW): Organización Mundial de la Salud; 2002.

Organización Mundial de la Salud. Commission on Social Determinants of Health. *Reporte Final.* Ginebra (SW): Organización Mundial de la Salud; 2008.

Organización Mundial de la Salud. *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks.* Ginebra (SW): Organización Mundial de la Salud; 2009.

Organización Panamericana de la Salud. *La Formación en Medicina Orientada hacia la Atención Primaria de Salud. (Serie la Renovación de la Atención Primaria de Salud en las Américas. No. 2).* Washington (US): OPS; 2008.

Organización Panamericana de la Salud. *Los niños, los más vulnerables* [en línea]. [consulta 13 de octubre de 2010]. 2003. Disponible en: <http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/proyecto/repidisc/publica/repindex/Repi072/OMS>.

Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Informe Regional sobre Desarrollo Humano para América Latina y el Caribe 2010 Actuar sobre el futuro: romper la transmisión intergeneracional de la desigualdad. PNUD; 2010.

Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Índice de Desarrollo Humano Municipal en México. PNUD; 2004.

Prüss-Üstün A., Corvalán C. Preventing disease through healthy environments. Towards an estimate of the environmental burden of disease. Organización Mundial de la Salud; 2006.

Schwartz J., Pitcher H., Levin R., Ostro B., Nichols A.L. (Environmental Protection Agen-

cy, Office of Policy, Planning and Evaluation, Washington, DC). Costs and Benefits of Reducing Lead in Gasoline: Final Regulatory Impact Analysis. Washington (US): Office of Policy Analysis; 1985. EPA-230/05-85/006.

Torres-Nerio R., Díaz-Barriga F., Carrizales-Yáñez L., Coronado-Salas C., Nieto-Caraveo L., Moreno-Sánchez A.R., et al. Diseño y aplicación de un Programa de Comunicación de Riesgos para la salud ambiental infantil en un sitio contaminado con plomo y arsénico. Revista Ciência & Saúde Coletiva. En prensa 2010.

Wilches-Chaux G. La vulnerabilidad global. En: Los desastres no son naturales. Ed. La Red; 1993. p.140.

Escorpionismo: presentación de un posible caso grave ocurrido en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Docampo, Patricia C.*^{1,2}; Fernández, María Elisa¹

¹Hospital General de Niños "Dr. Pedro de Elizalde" (Ex Casa Cuna). Servicio de Toxicología. Av. Manuel Montes de Oca 40, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Tel: 4300-2115.

²Centro Nacional de Intoxicaciones – Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas. Av. Marconi e Illía S/N°, El Palomar, Bs. As. Tel: 4658-7777, 4654-6648, 0800-333-0160

*cynthidocampo@hotmail.com; cniposadas@intramed.net

Recibido: 10 de enero de 2011

Aceptado: 1 de marzo de 2011

Resumen. El escorpionismo, en su aspecto clínico es un envenenamiento de causa accidental producido por la inoculación del veneno de un alacrán o escorpión, que en Argentina ocurre predominantemente en áreas urbanas, en el ámbito domiciliario o peridomiciliario. En nuestro país son tres las especies de escorpiones de interés médico-sanitario: *Tityus (T.) trivittatus*, *T. confluens* y *T. bahiensis*. El cuadro clínico se caracteriza por presentar dolor agudo con escaso compromiso cutáneo y manifestaciones sistémicas que, sin tratamiento pueden provocar la muerte, principalmente en niños. El objetivo de esta comunicación es dar a conocer el primer caso de escorpionismo grave, ocurrido en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, en una niña de 4 años de edad y describir el cuadro clínico característico y la necesidad del tratamiento precoz en los casos moderados y severos.

Palabras clave: Escorpiones; *Tityus*, Antiveneno escorpiónico, Escorpionismo en Argentina.

Summary: Scorpionism in its clinical aspect is an envenoming caused by accidental sting and inoculation of venom from a scorpion, which in Argentina occurs predominantly in urban areas, in the home environment or peridomiciliary. In our country there are three species of scorpions of medical-health concern: *Tityus (T.) trivittatus*, *T. confluens* and *T. bahiensis*. The clinical picture is characterized by severe pain with limited cutaneous and systemic manifestations, that without treatment can cause death, especially in children. The aim of this communication is to present the first case of severe scorpionism occurred in the City of Buenos Aires, in a 4 years old girl, and to describe the characteristic clinical picture and the need for early treatment in moderate and severe cases of scorpionism.

Key words: Scorpions; *Tityus*, Scorpion antivenom, Scorpionism in Argentina.

INTRODUCCIÓN

Los escorpiones o alacranes son artrópodos, pertenecientes al grupo de los arácnidos. En el país habitan especies de solo dos familias de escorpiones, *Bothriuridae* y *Buthidae*, siendo esta última la única responsable de accidentes humanos graves y fatales en nuestro país (Martino y Orduna 1995; de Roodt y col. 2003; Saracco y col. 2006). Solo el género *Tityus* (Familia *Buthidae*) implica gravedad para el hombre (Saracco y col. 2006). El género *Bothriurus* no es peligroso y su diferente morfología ayuda en el diagnóstico

cuando el paciente consulta con el ejemplar. En los últimos años, entidades nacionales (SINAVE) (Saracco y col. 2006), han registrado un aumento en el número de casos. Hasta el momento, los casos registrados en Buenos Aires eran formas leves en su mayoría y, por lo tanto, sin requerimiento de antiveneno. El objetivo de este trabajo es dar a conocer el primer caso de escorpionismo grave en pediatría ocurrido en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y brindar al médico las herramientas necesarias para llegar al diagnóstico clínico e instaurar el tratamiento precoz.

Caso clínico

Paciente de sexo femenino, de 4 años de edad, previamente sana, consultó en horas de la noche por malestar general, llanto persistente por intenso dolor en el pie derecho, sialorrea, piloerección y vómitos, secundario a una picadura de causa desconocida, de aproximadamente 30 minutos de evolución. Según refirió su madre, la niña salió a la puerta de su casa a acompañar a su padre a sacar la basura y sintió un fuerte pinchazo e intenso dolor en el pie, evolucionando con los síntomas anteriormente descriptos a los 15 minutos. Ingresó a la guardia con llanto persistente por dolor intenso y continuo en el pie derecho. Pupilas isocóricas sin foco neurológico, afebril (35,9° C), con hiperventilación, rales en ambas bases pulmonares, taquipnea (FR: 30 por min.), taquicardia (FC: 140 por min.), hipotensión arterial (TA: 80-50 mmHg), palidez cutánea, varios episodios de vómitos de tipo bilioso y abdomen blando depresible indoloro. Se constató en cara interna pie derecho, zona de probable picadura, leve eritema. El laboratorio de ingreso mostró compromiso del medio interno (EAB: pH: 7,44, PCO₂: 15 mmHg, bicarbonato: 13 mEq/l, saturación O₂: 90 %, ionograma: Na: 140 mEq/l, K: 1,8 mEq/l, Cl: 105 mEq/l), hipokalemia, hiperglucemia (glucemia: 1,50 g/l), leucocitosis (glóbulos blancos: 15.000 /mm³) y hematocrito: 26 %. Se internó, se realizaron medidas de sostén y asepsia local. Se solicitó al padre que volviera al domicilio y revisara los alrededores en busca del animal responsable del accidente, no encontrándose el mismo.

Evolución

La paciente presentó sensorio alternante, pupilas mióticas reactivas a la luz, taquicardia (FC: 120 por min.), taquipnea (FR: 36 pm), saturación 96% con aire ambiental, buen relleno capilar, sin vómitos, hepatomegalia a 2-3 cm del reborde costal derecho, ingurgitación yugular y rales crepitantes bilaterales. Por las características clínicas, epidemiología compatible, (la paciente le refirió a su madre haber sentido una picadura cuando salió a la calle) y laboratorio patológico (GB: 17000/mm³; plaquetas: 238.000/mm³, Hto: 26%, Hb: 11 g/dl, urea: 0,38 g/l, glucemia 3,78 g/l, ionograma: Na: 131 mEq/l/ K: 2,75 mEq/l, Cl: 110 mEq/l, EAB: pH. 7,44, PO₂: 61 mmHg, PCO₂: 21 mmHg, bicarbonato: 14,8 mEq/l, saturación: 96 % y ácido láctico: 8,2 mmol/l); se decidió realizar tratamiento con 2 ampollas de antiveneno

escorpiónico (Instituto Nacional de Producción de Biológicos "Dr. Carlos G. Malbrán" - ANLIS, Ministerio de Salud) interpretándose el cuadro como un caso de escorpionismo grave. Recibió además dexametasona y antihistamínicos endovenosos, previo al pasaje de antiveneno. Al terminar el pasaje del mismo (aproximadamente 20-30 minutos después) se intentó colocar una segunda vía periférica y la niña respondió con llanto enérgico, lúcida, reactiva y signos vitales dentro de parámetros normales (saturación: 98% sin oxígeno suplementario FC: 110 pm, FR: 26 pm, afebril). Se realizó la ficha epidemiológica para la denuncia correspondiente de picadura de animal ponzoñoso. Permaneció hemodinámicamente estable con mejoría clínica y de parámetros de laboratorio tres horas después del tratamiento específico (glucemia: 1,40 g/l; K: 3,2 mEq/l; CPK: 180 UI; amilasa: 67 U).

Fue evaluada por cardiología con examen, ECG y ecodardiograma dentro de parámetros normales. Se otorgó egreso hospitalario a las 48 horas. En los controles ambulatorios, los hallazgos del examen físico y laboratorio fueron normales.

DISCUSIÓN

La paciente presentada concurre a la guardia en horas de la noche, traída por sus padres, con llanto enérgico por dolor en pie derecho, taquipnea, taquicardia, sialorrea y vómitos, inmediatamente después de una picadura de causa desconocida. Al interrogatorio surgió que sintió un fuerte pinchazo y dolor intenso en el pie, luego de haber salido a la vereda de su casa. La niña no se encontraba cursando cuadros respiratorios ni gastrointestinales previos a la picadura. Presentó leucocitosis, hiperglucemia, hipokalemia y aumento del ácido láctico. Se interpretó el cuadro compatible con escorpionismo grave, motivo por el cual recibió el antiveneno, con evolución favorable. Se descartó patología infecciosa gastrointestinal y del sistema nervioso central con punción lumbar normal (esta entidad no mejora rápidamente aún con tratamiento antibiótico precoz). La paciente presentó dolor agudo localizado en cara interna de pie derecho, inmediatamente después de una picadura de causa desconocida en dicha zona, seguido de síntomas adrenérgicos, colinérgicos y trastornos de laboratorio como hiperglucemia, hipokalemia y acidosis metabólica, hallazgos típicos del escorpionismo (Martino y col. 1979; Cupo y

col. 2003; Talamoni 2004; Curci 2005). El hecho de que en el transcurso de las horas la niña haya recuperado parámetros clínicos y de laboratorio, sólo con la administración del antiveneno escorpiónico y fluidos parenterales, apoyan al diagnóstico de un caso de escorpionismo grave. El diagnóstico de certeza se realiza mediante la identificación del ejemplar que no pudo rescatarse en este caso.

CONCLUSIÓN

La consulta de un paciente que presenta una picadura de origen desconocida, con lesión cutánea mínima, dolor agudo y manifestaciones sistémicas compatibles, debe hacernos pensar en escorpionismo. El interrogatorio dirigido junto con el cuadro clínico característico, son las bases fundamentales para el diagnóstico de esta entidad, lo cual permite el tratamiento precoz en los casos moderados y graves.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Cupo P., Azevedo-Marques M.M. de, Hering S.E. Escorpionismo. En: Cardozo J.L.C. y col. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Sao Paulo, Brasil: Sarvier Editora 2003;16:198-208.

Curci O. Toxicología de los venenos de origen animal (Toxinología). En: Curci O., Toxicología. Buenos Aires, Argentina. La Prensa Médica

Argentina editores. 2005. p. 315 – 317.

de Roodt A.R. García S.I. Salomón O.D., Segre L., Dolab J.A., Funes R.F., de Titto E.H. Epidemiological and clinical aspects of scorpionism by *Tityus trivittatus* in Argentina. *Toxicon* 2003;41:971-977.

Martino O., Orduna T. Escorpiones en Martino O., Orduna T. Patología cutánea ponzoñosa e infecciosa provocada por agresiones de animales. Buenos Aires, Asociación Médica Argentina 1995. p. 11 – 14.

Martino O., Mathet H., Masini R.D., Ibarra Grasso A., Thompson R., Gondell C., Bosch J. Escorpionismo en Emponzoñamiento humano provocado por venenos de origen animal. Estudio epidemiológico, clínico y experimental Buenos Aires, Ministerio de Bienestar Social de La Nación, Secretaría de Estado de Salud Pública, 1979. p. 19-76

Saracco S., de Roodt A., Cabrera A.M., García S. Envenenamiento por animales ponzoñosos. Escorpionismo. *ATA informa*. 2006;71:17-23.

Talamoni M.A. Animales venenosos en Talamoni M. y col. Guía de diagnóstico y tratamiento en Toxicología. Buenos Aires, Argentina Eudeba. 2004. p. 209-211.

Evaluación del riesgo ambiental de carbofurano en bioensayos con organismos no blanco

Iannacone, José Alberto^{1,2}; Alvaríño, Lorena²; Paredes, Christian²; Alayo, Marianella^{2,3}; Mamani, Nancy⁴; Bonifacio, Juan²; Mariano, Mauro³; Miglio, María Cristina⁴

¹Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma (URP). Av. Benavides 5440, Santiago de Surco, Lima, Perú.

²Laboratorio de Ecofisiología Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM). Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV). Av. Río de Chepén s/n. Urb. Villa Hermosa. Bravo Chico, El Agustino, Lima, Perú.

³Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

⁴Facultad de Pesquería. Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

*joseiannacone@gmail.com

Recibido: 10 de febrero de 2011
Aceptado: 25 de abril de 2011

Resumen. El carbofurano es uno de los plaguicidas más empleado en la agricultura peruana. El objetivo de este trabajo fue evaluar el riesgo ambiental del carbofurano en bioensayos de toxicidad, sobre once especies no destinatarias. La siguiente secuencia relativa de mayor a menor cocientes de riesgo (CR) del carbofurano para los 19 puntos finales de efecto en once especies fue encontrada: *Daphnia magna* (mortalidad) > *Lemna minor* (inhibición de formación de las hojas) > *Paracheirodon innesi* (nado extraño) = *P. innesi* (incremento del movimiento opercular) > *Chironomus calligraphus* (mortalidad) > *L. minor* (necrosis) > *P. innesi* (mortalidad) > *L. minor* (clorosis) > *Tetrapygyus niger* (inhibición de la fecundación) > *Coturnix japonica* (mortalidad) > *Oncorhynchus mykiss* (incremento de coloración) > *Ceraeochrysa cincta* (no eclosión de huevos) > *O. mykiss* (mortalidad con oxígeno) > *O. mykiss* (mortalidad sin oxígeno) > *Trichogramma pretiosum* (mortalidad) > *C. cincta* (mortalidad) > *T. pretiosum* (no emergencia de adultos) > *Trichogramma pintoi* (mortalidad) > *Beauveria bassiana* (inhibición del crecimiento). Los cocientes de riesgo (CR) indicaron en todos los casos un alto riesgo del carbofurano principalmente en el ambiente acuático en comparación con el terrestre.

Palabras clave: *Daphnia*; *Lemna*; *Paracheirodon*; Plaguicida.

Abstract: Carbofuran is one of the most employed pesticides in Peruvian agriculture. This research aimed to evaluate the risk assessment in bioassays of carbofuran on eleven non-target species. The following relative sequence in decreasing ecotoxicity order in terms of RQ (Risk quotient) to carbofuran to 19 end points on 11 species was found: *Daphnia magna* (mortality) > *Lemna minor* (inhibition of new fronds) > *Paracheirodon innesi* (strange swim) = *P. innesi* (increase of opercula movement) > *Chironomus calligraphus* (mortality) > *L. minor* (necrosis) > *P. innesi* (mortality) > *L. minor* (chlorosis) > *Tetrapygyus niger* (inhibition of fertilization) > *Coturnix japonica* (mortality) > *Oncorhynchus mykiss* (increase of coloration) > *Ceraeochrysa cincta* (not hatch of eggs) > *O. mykiss* (mortality without oxygen) > *O. mykiss* (mortality with oxygen) > *Trichogramma pretiosum* (mortality) > *C. cincta* (mortality) > *T. pretiosum* (not emergence of adults) > *Trichogramma pintoi* (mortality) > *Beauveria bassiana* (inhibition of growth). Risk quotient (RQ) indicated that carbofuran is highly risky mainly to aquatic environment than terrestrial.

Key words: *Daphnia*; *Lemna*; *Paracheirodon*; Pesticide.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los principales factores que impactan la biodiversidad en todas sus escalas, se destaca la degradación ambiental por sustancias químicas tóxicas y, en particular, los insecticidas químicos sintéticos que pueden llegar a los ambientes acuáticos y terrestres están considerados entre los más deletéreos. El carbofurano es un carbamato sistémico con efecto insecticida, acaricida y nematocida por contacto e ingestión y bajo efecto residual (Mascolo y col. 2005; Tazza 2005; Gera y col. 2009). Debido a su amplio

empleo, se le puede encontrar en el suelo, aguas superficiales, alimentos y fauna silvestre (Dobšiková 2003). En el agua, la toxicidad del carbofurano puede verse influenciada por las poblaciones microbianas presentes en los sedimentos. El carbofurano puede degradarse en aguas neutras y moderadamente alcalinas (Mascolo y col. 2005). El carbofurano provoca efectos negativos en la biota (Sarkar y col. 2005).

En el Perú, el carbofurano se encuentra junto con el metamidofos, clorpirifos y metomilo

entre los cuatro plaguicidas de mayor empleo en el control de plagas agrícolas y es considerado altamente tóxico. Se comercializa bajo 13 nombres en relación a sus diferentes formulaciones y cinco procedencias. El carbofurano, paraquat, metomilo, y terbufos, se encuentran entre los biocidas que ocasionan mayores intoxicaciones en los seres humanos (Tazza 2005).

Por estas razones, es importante determinar el nivel de riesgo en el ambiente (dulceacuícola, marino y terrestre) del carbofurano usando bioensayos ecotoxicológicos. Con este objetivo en mira se escogieron 11 especies biológicas y 19 puntos finales de lectura, que incluyeron seis acuáticas y cinco terrestres para realizar ensayos toxicológicos. Las seis especies acuáticas fueron: 1) pulga de agua, *Daphnia magna* Strauss, 1820, organismo de referencia utilizado en pruebas de toxicidad debido a su alta sensibilidad, ya que presenta una amplia información para determinar la toxicidad de sustancias químicas puras y de muestras ambientales (Shaw y col. 2006); 2) lombriz roja, *Chironomus calligraphus* Goeldi, 1905, abundante y con permanente disponibilidad del material biológico en el Neotrópico, fácil de criar en condiciones de laboratorio, ciclo biológico corto y sensible a tóxicos (Schuler y col. 2006); 3) erizo negro marino, *Tetrapygyus niger* Molina, 1782, del ambiente rocoso marino del Pacífico Sur (Urriago y col. 2011), en la que se han realizado estudios en bioquímica, fisiología reproductiva y en distribución geográfica (Miranda y col. 2007); 4) neón tetra, *Paracheirodon innesi* Rabout, 1940, buscada por los acuaristas amazónicos y evaluada ecotoxicológicamente (Iannacone y col. 2007a); 5) trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792, recurso íctico de la acuicultura continental en el Perú y muy sensible a contaminantes acuáticos (Orrego y col. 2005), y 6) lenteja de agua *Lemna minor* L., macrófita usada frecuentemente para remover sólidos suspendidos, nutrientes y metales pesados de cuerpos de agua contaminados (Iannacone y col. 2000; Brain y col. 2004).

Las cinco especies terrestres seleccionadas fueron: 1) hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., microorganismo promisorio y alternativo para el control biológico de insectos plagas del orden Lepidoptera y Coleoptera que afectan al hombre, a la salud animal y a la agricultura (Cova y col. 2009);

2) crisópido *Ceraeochrysa cincta* Schneider, 1851, distribuida desde Florida, Estados Unidos de América (EUA), hasta Argentina (Ramírez y col. 2007) y con potencial para la cría masiva y utilización en programas de control biológico (Tauber y de León 2001; Bortoli y col. 2005); 3 y 4) microavispa *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 y *Trichogramma pintoi* Voegelé, 1982, controladores biológicos de lepidópteros plaga (Basso y Pintureau 2004) y sensibles a varios insecticidas (Thuler y col. 2007); 5) codorniz *Coturnix japonica* Temminck y Schlegel, 1849, ave popular por su huevos, carne; por ser mascota y animal de laboratorio, usada por las Agencias Reguladoras Ambientales Internacionales (Environment Canada, United States Environmental Protection Agency (USEPA), Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)). En esta ave también hay estudios de comportamiento, neurológicos, genéticos, nutricionales y reproductivos (Ottinger y col. 2005; Chelmońska y col. 2008).

Los estudios de evaluación de riesgos acuáticos y terrestres de plaguicidas empleando modelos biológicos, combinan la evaluación de la exposición y la sensibilidad, por lo que permiten predecir el posible efecto de estas sustancias químicas en la matriz ambiental, y tomar decisiones regulatorias con relación al registro, restricciones de uso y compatibilidad con otras estrategias de control de plagas (Solomon y col. 2008).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la ecotoxicidad del carbofurano sobre once organismos no blancos y a partir de estos resultados evaluar su posible riesgo ambiental de este insecticida sintético en el ambiente acuático y terrestre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7il-metilcarbamato, PM= 221,3): se utilizó la formulación de pasta fluída (Furadán 4F[®], Farmagro SA, USA). Para los bioensayos la sustancia química sintética se disolvió al 20% en agua destilada (pH= 7,3; conductividad específica= 75 μ mhos/cm) y se aplicaron concentraciones de ingrediente activo (ia) utilizando usualmente factores de dilución fluctuantes entre 0,06 y 0,5 dependiendo de cada ensayo. Para las diluciones se empleó agua de grifo reposada (Iannacone y col. 2007b).

Diseño experimental

Para *D. magna* (mortalidad), *L. minor* (clorosis, necrosis y formación de hojas nuevas) y *Ch. calligraphus* (mortalidad): se usaron formulaciones de carbofurano a las siguientes cinco concentraciones: 0,003; 0,007; 0,0145; 0,029 y 0,048 mg/l. Para *B. bassiana* (inhibición del crecimiento) se emplearon nueve concentraciones: 0,006; 0,07; 0,82; 9,42; 108,52; 434,08; 1.736,32; 6.945,28; y 27.781,20 mg/l. Para *C. cincta* (mortalidad larvaria y eclosión de huevos) se usaron cinco concentraciones: 0,00002; 0,0002; 0,003; 0,03 y 0,48 mg/l. Para *T. pretiosum* (mortalidad) se emplearon cinco concentraciones: 0,006; 0,07; 0,82; 9,43 y 108,52 mg/l. Para los adultos de *T. pretiosum* (emergencia de adultos) se usaron cinco concentraciones: 0,0044; 0,055; 0,694; 8,68 y 108,52 mg/l, y para *T. pinto* (emergencia de adultos) se emplearon cinco concentraciones: 0,58; 2,70; 12,42; 57,16 y 262,95 mg/l. Para *O. mykiss* (mortalidad e incremento de la coloración) se emplearon las siguientes cinco concentraciones en ausencia de oxígeno: 0,384; 0,96; 2,4; 6 y 15 mg/l, y con presencia de oxígeno: 11,9; 23,8; 47,5; 95 y 190 mg/l. Para *P. innesi* se usaron cinco concentraciones: 0,0362; 0,0725; 0,145; 0,290 y 0,480 mg/l. Cuatro concentraciones 0,47; 0,94; 1,88 y 3,75 en mg/kg se emplearon para *C. japonica* (mortalidad y manifestaciones en el comportamiento). Para *T. niger* (inhibición de la fertilización) se usaron cinco concentraciones: 0,003; 0,006; 0,012; 0,025 y 0,025 mg/l. Todos los bioensayos tuvieron un diseño en bloque completamente aleatorio (DBCA), de 5-9 (concentraciones) x 4 (repeticiones). Únicamente en el caso de *C. japonica* se usaron dos repeticiones. En todos los casos se emplearon concentraciones nominales del carbofurano.

Material biológico y criterios de puntos finales

Daphnia magna. Se siguió el procedimiento señalado por Castillo (2004). Hembras maduras y ovíparas se obtuvieron de un acuario procedente de Lima, Perú. Los cultivos parciales con las hembras partenogenéticas se mantuvieron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y a un fotoperiodo de 12:12. El oxígeno disuelto se mantuvo sobre 8 mg/l. Para la prueba de toxicidad aguda se emplearon cohortes de neonatos (<24 h de nacidos). La duración de la prueba fue

de 48 h de exposición. A cada envase circular de 250 ml se agregaron 100 ml de cada una de las concentraciones, a los cuales se transfirieron diez neonatos. Se usó como criterio de mortalidad la carencia de movilidad o la ausencia de ritmo cardíaco a 15 s de observación al microscopio estereoscópico.

Chironomus calligraphus. Para cada ensayo se colectaron masas de huevos de *C. calligraphus* procedentes de una laguna de estabilización de Villa El Salvador, Lima, Perú. La obtención, cría estandarizada y bioensayo de *Chironomus* siguió las recomendaciones de Iannacone y col. (2007b). Las pruebas se efectuaron con larvas de primer estadio con menos de 24 h de edad; se colocaron 10 especímenes en cada uno de los envases de vidrio de 35 ml, con un volumen final de 25 ml. La mortalidad se midió a las 24 y 48 h de exposición. Se consideraron muertas aquellas larvas que no efectuaron ningún movimiento al ser pinchadas con un alfiler entomológico, bajo observación con estereoscopio durante 15 s. *Tetrapygus niger*. Se siguió el protocolo indicado por Iannacone y col. (2007b). Los especímenes se colectaron de la playa Ancón, Lima, Perú. Para estimular en los erizos la evaluación del esperma y de los óvulos se les inyectó KCl 0,5 M. Se prepararon soluciones de 5×10^7 espermios/ml y 2.000 óvulos/ml. El ensayo se realizó a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Para el bioensayo se emplearon tubos de centrífuga de 20 ml, a los que se agregaron 100 μl de la suspensión de espermios y después de 1 h, se le agregó 1 ml de la suspensión de óvulos. Se consideró como criterio de validez del bioensayo un 80% de fertilización en los controles después de 20 min. de agregar la suspensión de óvulos. Se agregó 0,5 ml de formalina a cada tubo para conservar el material para una lectura posterior. Para evaluar el porcentaje de fertilización se transfirió 1 ml de cada tubo de prueba a una cámara de Sedgwick-Rafter (Phyco-tech®, Sedgwick-Rafter cell, Saint Joseph, Michigan, USA). Se contabilizó un total de 400 huevos, separándolos en huevos fertilizados y no fertilizados, diferenciándolos por la ausencia de la membrana de fertilización. *Paracheirodon innesi*. Adultos de "neón tetra" *P. innesi*, sin distinción de sexo, se obtuvieron de un acuario del distrito de Lince en Lima, Perú. Los peces se alimentaron semanalmente con alimento para peces en hojuelas

(TetraMin, Tetramin Tropical Flakes, Buffalo, New York, USA), y con hojuelas de cereal (Cereal Leaves, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Los neones tetra usados en los bioensayos se extrajeron del cultivo a partir de la primera semana de aclimatación (Iannacone y col. 2007a). Las lecturas definitivas de la pruebas ecotoxicológicas se realizaron a 96 h de exposición. Los peces no se alimentaron durante los bioensayos. Cada grupo de cinco neones se colocó al azar en recipientes plásticos circulares de 500 ml con las respectivas concentraciones. La prueba de toxicidad se repitió dos veces. Se utilizaron tres parámetros como punto final de lectura: uno letal: muerte (al tocar el pez con un estilete y si después de 10 s no realiza ningún movimiento), y dos subletales: inmovilización (al tocar el pez con un estilete y si después de 10 s sigue moviendo el opérculo), y nado extraño.

Oncorhynchus mykiss. Se emplearon las edificaciones del Laboratorio de Sanidad del Centro Piscícola, El Ingenio ($11^\circ 52' \text{ LS}$, $75^\circ 15' \text{ LO}$, 3510 msnm), provincia de Concepción, departamento de Junín, Perú. Se usaron alevines de 18 ± 2 días después de la absorción del saco vitelino. Estos alevines se encontraron bajo condiciones de iniciación de alimento artificial. El protocolo de bioensayo siguió lo indicado por Iannacone y col. (2007b). El fotoperíodo fue 12:12. Los bioensayos de carácter agudo (mortalidad) y subletal (incremento de coloración) tuvieron una duración de 96 h, con un recambio de agua a las 48 h de exposición. Se realizó el ensayo con ausencia de oxígeno y otro con presencia de oxigenación. Este último fue repetido tres veces. Para cada prueba se necesitó un total de 240 alevines, de 2,4 a 3,8 cm de longitud ($F= 0,67$, $P= 0,43$) y en un número de 10 especímenes por unidad de experimentación.

Lemna minor. Se colectó de la laguna terciaria de 1 ha de la Planta de aguas residuales domésticas de San Juan de Miraflores, ubicada a 14 km al sur de la ciudad de Lima-Perú. Se crió masivamente durante dos semanas antes del inicio de la prueba, en un acuario de 60 cm largo x 30 cm de ancho x 30 cm de alto con sales nutritivas (Iannacone y col. 2000), a una profundidad del agua mayor de 80 mm y con un fluorescente de luz blanca de 4300 lux. La temperatura se mantuvo a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ (Brain y col. 2004). Se evaluó

en bioensayos estáticos un total de 12 especímenes/envase. Los especímenes tuvieron dos hojitas de aproximadamente el mismo tamaño. Los envases fueron vasos de vidrio de 80 x 50 mm. Se agregaron 25 ml de la solución tóxica/envase disuelto en solución nutritiva. La duración de la prueba fue de 96 h. Las lecturas finales de los tres efectos subletales fueron: formación de hojitas nuevas, clorosis (50% de pérdida de pigmento) y necrosis (50% de tejido muerto).

Beauveria bassiana. La cepa empleada se aisló de un trips (*Thrips tabaci* Lindeman, 1889) procedente de Lima, Perú. Estas cepas se mantuvieron en el medio de cultivo sólido Agar Sabouraud Maltosa (ASM) más 0,1 de extracto de levadura y tetraciclina 50 mg/ml a 25°C y a un fotoperíodo 12:12 durante 20 días para la producción de conidios (Vasquez y col. 2006). Los conidios obtenidos de tres placas por separado se colectaron empleando un portaobjeto de vidrio en una suspensión acuosa estéril con Tween 80 al 0,05% como diluyente para dispersar y mantener la uniformidad de los conidios y se contaron en una cámara de Neubauer. Se ajustó a una concentración de 3×10^8 conidios/ml para los bioensayos y en placas de ASM se sembró el hongo por picadura profunda, 4 veces en cada placa y a 4 cm de separación entre picaduras. Se colocaron en cada una de ellas cuatro discos de papel filtro (Schleicher y Shuel®, 90 mm) de 0,5 cm de diámetro. Cada disco fue embebido por un tiempo de 1 s en las concentraciones del carbofurano y fue secado a una temperatura ambiente de 25°C . Se determinó el crecimiento micelial (mm) a 7 días de exposición y fue determinado el porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico (%) de cada una de las concentraciones en comparación con el control (Alizadeh y col. 2007).

Ceraeochrysa cincta. Se siguió para la crianza y el bioensayo lo descrito por Iannacone y Lamas (2002). Los huevos fueron obtenidos del Programa Nacional de Control Biológico-Servicio Nacional de Sanidad Agraria (PNCB-SENASA) del Perú. Se evaluaron huevos de menos de 48 h. Las larvas fueron criadas individualmente en envases de plástico de 12 ml de capacidad y alimentadas *ad libitum* con huevos de *Sitotroga cerealella* (Olivier 1819). Las larvas fueron criadas hasta el primer estadio de desarrollo y se emplearon cohortes de especímenes entre 24 a 48 h.

Se realizaron ensayos de inmersión para los huevos y de contacto-residual para las larvas, para evaluar la eclosión de huevos y la mortalidad larvaria, respectivamente (Iannacone y Lamas 2002).

Trichogramma pretiosum y *Trichogramma pintoï*. Ambas microavispa fueron obtenidas de colonias mantenidas por el PNCB-SENASA y criadas en el laboratorio sobre huevos de *S. cerealella* a 23 ± 2 °C y 12:12 h de fotoperíodo. Por razones logísticas los ensayos de mortalidad de contacto residual se llevaron a cabo únicamente para los adultos de *T. pretiosum*. Los ensayos de emergencia de adultos se realizaron con ambas microavispas. Para los ensayos de mortalidad con *T. pretiosum* se usaron envases de plástico de 8 ml cubiertos con una tapa de algodón, a los que se les agregó 500 µl de cada una de las concentraciones acuosas con la ayuda de una pipeta automática con puntas descartables y luego con un hisopo se esparcieron homogéneamente sobre la superficie interna del vial de vidrio. Los experimentos se realizaron con cohortes de adultos < de 24 h de emergidos. Se consideraron muertos cuando no se posaban sobre el vial de vidrio y se encontraban con las patas dirigidas hacia arriba, durante 10 s de observación al microscopio estereoscópico. El porcentaje de emergencia de *T. pretiosum* y *T. pintoï* se calculó contando el número de microavispas emergidas en huevos adheridos a una cartulina de *S. cerealella*, dividiéndolo entre el número total de huevos parasitados.

Coturnix japonica. Se adquirieron especímenes machos adultos con un peso aproximado de 150 g cada uno en una tienda de aves localizada en el Centro de Lima, Perú. En el laboratorio se aclimataron por más de 30 días previos a la realización del bioensayo de toxicidad vía oral de 96 h de exposición. Grupos de cinco aves fueron dispuestas en cajas-jaulas de 40 cm x 40 cm x 24 cm. Las jaulas fueron hechas de cajones de frutas con una base de malla de metal. En la parte inferior de cada jaula se les colocó unas láminas de cartón forrado con bolsas de plástico de color negro para que allí se depositara materia fecal de las aves y la comida sobrante. Las aves fueron alimentadas con una dieta de 300 g a base de codornina® y maíz refinado remojado, la cual se distribuyó en dos porciones por día, mañana y tarde, durante todo el periodo de aclimatación.

Todos los especímenes fueron pesados antes de iniciar el bioensayo. Los bioensayos de 96 h de exposición se realizaron con los ejemplares adultos de *C. japonica* a 18 ± 2 °C y aproximadamente 80% de humedad relativa. Un ml de cada una de estas concentraciones fue suministrado a las aves por vía oral. Siete manifestaciones de comportamiento fueron observadas a los 15 min de exposición: debilitamiento de las patas, convulsiones respiratorias, plumas erizadas, temblores, expulsión de heces, convulsiones musculares espasmódicas y descoordinación motora. Al final del ensayo las aves fueron diseccionadas para observar la presencia de hepatomegalia y la coloración del hígado.

Consideraciones éticas

Todos los procedimientos en animales siguieron los protocolos estándares de las 3Rs (reemplazar, reducir y refinar) aprobados para la experimentación animal, minimizando la angustia durante la experimentación, principalmente en peces y aves (Pardo 2005).

Análisis estadístico

La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías con prueba *a posteriori* de Tukey. Los datos fueron previamente normalizados (transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno). Las Concentraciones Letales (efectiva) (inhibición) media [CL(E)(I)₅₀] fueron determinados empleando el programa Probit versión 1,5. El modelo de regresión fue verificado con el estadístico Chi-cuadrado (χ^2). Se usó el paquete estadístico SPSS, versión 17.0 para Windows XP para calcular los estadísticos descriptivos e inferenciales a un nivel de significancia de 0,05.

Evaluación del Riesgo Ambiental (ERA)

Se empleó el método de riesgo prospectivo de cálculo simple y de criterios conservadores del cociente de riesgo (CR) de tamizaje o evaluación inicial en ecotoxicología predictiva para determinar la naturaleza y magnitud del riesgo de carbofurano, usando los escenarios ambientales (acuático y terrestre) más críticos y de peor exposición. Con el fin de determinar la concentración efectiva ambiental (CEA) para los organismos acuáticos se asumió una profundidad del cuerpo de agua de 30 cm y para la CEA terrestre, a excepción

de la codorniz se consideró un valor directo de aplicación, respectivamente. Para la determinación de la CEA para la codorniz se usó el nomograma de Fletcher, considerando el peso del ave (30% para las codornices) y una dieta de 15% de cultivos forrajeros, 70% de cereales y 15% de insectos foliares. Se siguió el protocolo indicado por González-

Valero y col. (2000). Para los ensayos de toxicidad agudos y crónicos se usó un nivel crítico de comparación 0,5 y de 1, respectivamente.

RESULTADOS

Se determinó el efecto toxicológico agudo del carbofurano sobre los neonatos de *D. magna* a 24 y 48 h de exposición (Tabla 1). Se

Tabla 1. Efecto del carbofurano en el porcentaje de mortalidad de *Daphnia magna* a 24 h y 48 h de exposición, en el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Beauveria bassiana* a 7 días de exposición, en el porcentaje de mortalidad larvaria a 6 h de exposición y de no eclosión de huevos de *Cereachrysa cincta* (Chrysopidae) a 120 h de exposición, en el porcentaje de inhibición de formación de nuevas hojas y en los porcentajes de formación de clorosis y de necrosis de *Lemna minor* de 24 a 96 h de exposición, en el porcentaje de mortalidad de adultos a 24 h y de emergencia de adultos a 120 h de *Trichogramma pretiosum* y *Trichogramma pintoi* (Trichogrammatidae) y en el porcentaje de mortalidad de larvas de *Chironomus calligraphus* a 24 a 48 h de exposición

	<i>Daphnia magna</i>		<i>Beauveria bassiana</i>				<i>Cereachrysa cincta</i>			
	% mortalidad		% inhibición crecimiento				% mortalidad larvaria		% de no eclosión	
	24 h	48 h	7 días				6 h			
CL ₅₀ (mg ia/l)	0,108	0,0023	1085				1,89		0,048	
CL ₅₀ inf (mg ia/l)	0,067	0,0009	849				ND		0,006	
CL ₅₀ sup (mg ia/l)	0,263	0,003	1382				ND		0,139	

	<i>Lemna minor</i>											
	% inhibición de formación de nuevas hojas				% de clorosis				% de necrosis			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
CL(l) ₅₀ (mg ia/l)	0,014	0,017	0,003	0,003	0,231	0,059	0,022	0,022	0,138	0,039	0,017	0,016
CL(l) ₅₀ inf (mg ia/l)	0,008	0,011	0,001	0,008	0,083	0,039	0,013	0,011	0,073	0,028	0,011	0,006
CL(l) ₅₀ sup (mg ia/l)	0,015	0,027	0,006	0,007	>1,000	0,128	0,038	0,043	0,790	0,063	0,027	0,026

	<i>Trichogramma pretiosum</i>		<i>Trichogramma pintoi</i>		<i>Chironomus calligraphus</i>	
	% mortalidad		% no emergencia de adultos		% mortalidad	
	24 h		de adultos		24 h	
CL(E) ₅₀ (mg ia/l)	0,45		2,33		21,84	
CL(E) ₅₀ inf (mg ia/l)	0,15		0,61		13,66	
CL(E) ₅₀ sup (mg ia/l)	0,83		6,12		34,89	

CL₅₀= Concentración letal media. Cl₅₀ = Concentración de inhibición media. CE₅₀ = Concentración efectiva media. ND = No determinado. inf = inferior. sup = superior. En todos los casos se emplearon cuatro réplicas por concentración.

observó efecto toxicológico del carbofurano a 24 y 48 h, y un incremento significativo en el porcentaje de mortalidad de *D. magna* en comparación con el control entre las 5 concentraciones de 0,003 a 0,048 mg ia/l evaluadas ($F=8,1-13,4$; $P < 0,05$). La concentración letal media (CL_{50}) a 48 h de exposición fue 0,002 mg ia/l. Se encontró un aumento en el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *B. bassiana* con las nueve concentraciones crecientes entre 0,006 a 27.781,2 mg ia/l a 7 días de exposición ($F=46,02$; $P < 0,05$) (Tabla 1). Se vio efecto del carbofurano en el porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. bassiana* desde 108,52 mg ia/l. La CE_{50} a 7 d de exposición fue 1085 mg ia/l.

Al evaluar el efecto de contacto del carbofurano sobre las larvas de *C. cincta* se encontró que a las 6 h de exposición, la CL_{50} fue 1,89 mg ia/l ($F= 24,78$; $P < 0,05$) (Tabla 1). El porcentaje de no eclosión de huevos de *C. cincta* a 120 h presentó un valor de mayor sensibilidad al carbofurano que el de mortalidad larvaria a 6 h de exposición ($F =15,49$; $P < 0,05$) (Tabla 1).

A 96 h de exposición el porcentaje de inhibición de formación de nuevas hojas, el porcentaje de clorosis y de necrosis de *L. minor* presentaron valores de CE_{50} que incrementaron en términos de toxicidad: 0,003 ug ia/l; 0,022 ug ia/l y 0,015 ug ia/l ($F=11,83-47,28$; $P < 0,05$) (Tabla 1).

En el caso de los adultos del microhimenóptero *T. pretiosum*, se vio a 24 h de exposición, que el carbofurano produjo una CL_{50} de 0,45 mg ia/l (Tabla 1). Los porcentajes de mortalidad del adulto de *T. pretiosum* mostraron para la concentración de 0,006 mg ia/l, efecto significativo diferentes al control ($F=14,43$; $P < 0,05$) (Tabla 1). Los porcentajes de emergencia de los adultos de *T. pretiosum* y *T. pintoii*, mostraron para la concentración de 0,006 mg ia/l, efectos significativos en ambos parasitoides ($F=19,17-36,74$; $P < 0,05$) (Tabla 1). La emergencia de adultos en términos de CE_{50} de *T. pretiosum* fue mayor al de *T. pintoii* en sensibilidad al carbofurano (Tabla 1). En el caso de la larva del díptero *Ch. calligraphus*, el carbofurano a las concentraciones entre 0,003 a 0,048 mg ia/l se vio que la CL_{50} fue 0,010 ug ia/l a 48 h de exposición ($F= 10,57-21,28$; $P < 0,05$) (Tabla 1). Se encontró efecto del carbofurano en el porcentaje de mortalidad de *O. mykiss* desde 0,384 mg ia/l, en un bioensayo con o sin

oxígeno, respectivamente. A las 96 h de exposición los alevines de *O. mykiss* presentaron una $CL_{50} < 0,44$ mg ia/l en ausencia de oxígeno y de 0,36 mg ia/l en presencia del oxígeno ($F=21,09-29,42$; $P < 0,05$) (Tabla 2). En el ensayo subletal de porcentaje de incremento de la coloración en *O. mykiss* a 96 h de exposición al carbofurano se observó un valor de CE_{50} de 0,29 mg ia/l ($F=26,79-45,37$; $P < 0,05$) (Tabla 2).

En la Tabla 2 se observó en el ensayo de toxicidad aguda oral en *C. japonica* efectos en el porcentaje de mortalidad diferentes al control desde la concentración de 0,94 mg ia/kg ($F=44,81$; $P < 0,05$). A 96 h de exposición se observó que la CE_{50} de movimiento opercular de *P. innesi* fue 2,2 veces más sensible a la mortalidad ($F=13,91-38,65$; $P < 0,05$) (Tabla 2). El porcentaje de nado extraño desde la concentración 0,0362 mg ia/l ocasionó un 100% de efecto en *P. innesi* ($F=18,66-30,19$; $P < 0,05$) (Tabla 2). El porcentaje de inhibición de la fertilización en el erizo *T. niger* fue diferente del control desde 0,003 mg ia/l ($F=9,12$; $P < 0,05$). El valor de CI_{50} fue de 0,208 mg ia/l (Tabla 2).

Se encontraron efectos en el comportamiento como debilidad en las patas, convulsiones respiratorias espasmódicas, plumas erizadas, temblores y expulsión de heces desde 0,47 mg ia/kg. Convulsiones musculares espasmódicas y descoordinación motora en *C. japonica* se observaron desde la concentración 0,94 mg ia/kg (Tabla 3). La hepatomegalia por acción del carbofurano en *C. japonica* se observó a la dosis de 3,75 mg ia/kg y parcialmente notoria desde 0,94 mg ia/kg. Un cambio en la coloración del hígado a roja con bordes negros fue vista a 0,47 mg carbofurano/kg (Tabla 3).

Así, la secuencia relativa de mayor a menor cocientes de riesgo (CR) del carbofurano para los 19 puntos finales de efecto en las once especies fue: *D. magna* (mortalidad) > *L. minor* (inhibición de formación de las hojas) > *P. innesi* (nado extraño) = *P. innesi* (incremento del movimiento opercular) > *Ch. calligraphus* (mortalidad) > *L. minor* (necrosis) > *P. innesi* (mortalidad) > *L. minor* (clorosis) > *T. niger* > *C. japonica* > *O. mykiss* (incremento de coloración) > *C. cincta* (no eclosión de huevos) > *O. mykiss* (mortalidad con oxígeno) > *O. mykiss* (mortalidad sin oxígeno) > *T. pretiosum* (mortalidad) > *C. cincta* (mortalidad) > *T. pretiosum* (no emergencia de adultos) > *T. pintoii*

Tabla 2. Efecto del carbofurano en el porcentaje de mortalidad (letal) y en el porcentaje de incremento de la coloración (subletal) de alevines de *Oncorhynchus mykiss* entre 24 a 96 h de exposición; en el porcentaje de mortalidad (letal), en el porcentaje de movimiento opercular y de nado extraño (subletal) de *Paracheirodon innesi* entre 24 a 96 h de exposición; en el porcentaje de mortalidad de *Coturnix japonica* y en el porcentajes de inhibición de la fertilización de *Tetrapygus niger* (subletal)

Oncorhynchus mykiss												
	% mortalidad oxígeno				% de mortalidad con oxígeno				% de incremento de la coloraciónh			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
CL(E) ₅₀ (mg ia/l)	0,44	<0,44	<0,44	<0,44	7,31	1,02	0,49	0,36	3,17	0,82	0,42	0,29
CL(E) ₅₀ inf (mg ia/l)	0,40	ND	ND	ND	3,54	0,83	0,38	0,22	1,32	0,45	0,22	0,11
CL(E) ₅₀ sup (mg ia/l)	0,48	ND	ND	ND	10,1	1,18	0,56	0,48	7,89	1,35	0,68	0,45

Paracheirodon innesi												
	% mortalidad				% de movimiento opercular				% de nado extraño			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
CL(E) ₅₀ (mg ia/l)	0,191	0,142	0,249	0,022	0,141	0,076	0,035	0,009	0,072	0,036	0,009	<0,009
CL(E) ₅₀ inf (mg ia/l)	0,175	ND	0,028	0,013	0,126	0,039	0,028	0,001	0,006	0,012	0,001	ND
CL(E) ₅₀ sup (mg ia/l)	0,207	ND	0,067	0,029	0,158	0,123	0,042	0,018	0,150	0,052	0,018	ND

Coturnix japonica			Tetrapygus niger		
	% de mortalidad 96 h			% de inhibición de la fertilización	
	DL ₅₀ (mg ia/kg)			Cl ₅₀ (mg ia/L)	
DL ₅₀ (mg ia/kg)		1,30	Cl ₅₀ (mg ia/L)		0,208
DL ₅₀ inf (mg ia/kg)		0,91	Cl ₅₀ inf (mg ia/L)		0,106
DL ₅₀ sup (mg ia/kg)		1,83	Cl ₅₀ sup (mg ia/L)		0,796

CL₅₀ = Concentración letal media. CE₅₀ = Concentración efectiva media. DL₅₀ = Concentración efectiva media. Cl₅₀ = Concentración de inhibición media. ND = No determinado. inf = inferior. sup = superior.

Tabla 3. Efecto del carbofurano en el comportamiento y en las manifestaciones patológicas de *Coturnix japonica*

Coturnix japonica	Comportamiento								Manifestaciones patológicas
mg ia/kg	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	RO
0,47	+	+	+	+	+	-	-	-	ROBN
0,94	+	+	+	+	+	+	+	±	ROBN
1,88	+	+	+	+	+	+	+	±	ROBN
3,75	+	+	+	+	+	+	+	+	ROCN

RO = Rojo oscuro. ROBN = Rojo con bordes negros. ROCN = Rojo muy oscuro casi negro. 1 = Debilidad de las patas. 2= Convulsiones respiratorias. 3 = Plumaz erizadas. 4 = Temblores. 5 = Expulsión de heces. 6 = Convulsiones musculares espasmódicas. 7 = Descoordinación motora. 8 = Hepatomegalia. 9= Coloración del hígado. + = presencia de efecto. - = ausencia de efecto. ± = efecto parcialmente notorio.

(mortalidad) > *B. bassiana* (inhibición del crecimiento) (Tabla 4).

La ERA del carbofurano, indicó para nueve especies en el ambiente acuático y terrestre riesgo, debido a que el cociente de riesgo (CR) en base a los ensayos y al CAE para cada una de las especies fluctuó entre 0,96 y 1.440 para el carbofurano (Tabla 4). Las seis especies acuáticas mostraron en base al CR, riesgo al carbofurano. De las cinco especies terrestres, sólo una especie, *C. japonica* presentó riesgo en base al CR (Tabla 4). Las cuatro especies terrestres restantes que no mostraron riesgo al carbofurano en relación al CR fueron *B. bassiana*, *T. pintoii* y *T. pretiosum* (no emergencia de adultos) y *C. cincta* (mortalidad). La ERA del carbofurano en base a las especies terrestres mostró que los CR variaron entre 0,003 y 10,1. La ERA en base a los ensayos agudos indicó que los

CR fluctuaron entre 0,019 y 1.440; y la ERA en relación a los ensayos crónicos presentó variación del CR entre 0,003 y 960 (Tabla 4). Quince (78,94%) efectos finales de lectura, de los 19 evaluados para las once especies acuáticas y terrestres, presentaron valores mayores a 0,5 y 1, para los ensayos agudos y crónicos, respectivamente, mostrando presencia de riesgo del carbofurano a nivel del ambiente acuático y terrestre.

DISCUSIÓN

La toxicidad del carbofurano es altamente dependiente de la duración, frecuencia, intensidad de exposición, formulación y la susceptibilidad del organismo evaluado, siendo este último influenciado por la edad, sexo, vigor y variación genética (Iannacone y Tejada 2007). La comparación de mayor a menor cociente de riesgo (CR) del carbofurano para los

Tabla 4. Resumen de la evaluación de riesgo ambiental (ERA) del carbofurano con organismos no blanco

Especie	Efecto	Periodo	Unidades	Tipo de organismo	Toxicidad	Exposición	CR	LOC	Riesgo
<i>Daphnia magna</i>	mortalidad	48 h	mg ia/l	A	0,0023	2,88	1440	0,5	Si
<i>Beauveria bassiana</i>	Inhibición del crecimiento	7 días	mg ia/l	T	1085	0,432	0,003	1	No
<i>Ceratomyxa cincta</i>	mortalidad	6 h	mg ia/l	T	1,89	0,432	0,22	0,5	No
<i>Ceratomyxa cincta</i>	% no eclosión	120 h	mg ia/l	T	0,048	0,432	9	1	Si
<i>Lemna minor</i>	inhibición formación hojas	96 h	mg ia/l	A	0,003	2,88	960	1	Si
<i>Lemna minor</i>	clorosis	96 h	mg ia/l	A	0,022	2,88	131	1	Si
<i>Lemna minor</i>	necrosis	96 h	mg ia/l	A	0,016	2,88	185	1	Si
<i>Trichogramma pretiosum</i>	mortalidad	24 h	mg ia/l	T	0,45	0,432	0,96	0,5	Si
<i>Trichogramma pretiosum</i>	% no emergencia de adultos	120 h	mg ia/l	T	2,33	0,432	0,18	1	No
<i>Trichogramma pintoii</i>	% no emergencia de adultos	120 h	mg ia/l	T	21,84	0,432	0,019	1	No
<i>Chironomus calligraphus</i>	mortalidad	48 h	mg ia/l	A	0,010	2,88	287	0,5	Si
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Mortalidad sin oxígeno	96 h	mg ia/l	A	0,44	2,88	6,5	0,5	Si
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Mortalidad con oxígeno	96 h	mg ia/l	A	0,36	2,88	8	0,5	Si
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	incremento coloración	96 h	mg ia/l	A	0,29	2,88	9,93	1	Si
<i>Paracheirodon innesi</i>	mortalidad	96 h	mg ia/l	A	0,022	2,88	130,9	0,5	Si
<i>Paracheirodon innesi</i>	movimiento opercular	96 h	mg ia/l	A	0,009	2,88	290,9	1	Si
<i>Paracheirodon innesi</i>	nado extraño	96 h	mg ia/l	A	<0,009	2,88	290,9	1	Si
<i>Coturnix japonica</i>	mortalidad	96 h	mg ia/kg	T	1,3	13,1	10,1	0,5	Si
<i>Tetrapygus niger</i>	inhibición de la fertilización	1 h	mg ia/l	A	0,208	2,88	13,8	1	SI

Exposición = CAE= concentración efectiva ambiental. CR= cociente de riesgo = Exposición/Toxicidad. LOC= nivel crítico. A= acuático. T= Terrestre.

19 puntos finales de efecto en las once especies ensayadas es adecuada desde una perspectiva ecotoxicológica, debido a que considera los escenarios característicos de exposición de cada especie biológica. Aunque las rutas de exposición para cada especie son diferentes y, por ende, los procesos metabólicos y bioquímicos también deben variar. Los cocientes de riesgo (CR) indicaron un alto riesgo del carbofurano en el ambiente acuático en comparación al terrestre. Esto podría explicarse por la alta toxicidad de este insecticida carbámico en artrópodos acuáticos y en peces (USEPA 2006), su alta solubilidad en agua (351 mg/l) a 25°C, su bajo coeficiente de adsorción (K_{oc}) de 22 y a su relativa movilidad en el suelo. Al ser un producto insecticida presenta efectos por ingestión en artrópodos plagas, y por lo tanto en especies no blanco del mismo grupo biológico como *D. magna* y *Ch. calligraphus*.

D. magna fue la especie más sensible al carbofurano, lo cual podría deberse a que este agroquímico al incrementar la toxicidad anticolinesterásica inhibe la acción farmacológica de la carboxilesterasa (CaEs) que tiene un rol importante en la detoxificación de muchos plaguicidas (Laetz y col. 2009). Golombieski y col. (2008) señalan que los cladóceros como *D. magna*, fueron el grupo más sensible al efecto del agroquímico carbofurano, al provocar declinación en la densidad de estos microcrustáceos en cultivos de arroz. Los cladóceros fueron mucho más sensibles al carbofurano que rotíferos y copépodos. Herbrandson y col. (2003) muestran para *D. magna*, valores de CL_{50} de 92 a 159 ug ia/l, más altos que los encontrados en el presente estudio de 2,38 ug ia/l. La diferencia encontrada podría deberse a que en nuestro trabajo empleamos una formulación de carbofurano comercial, en contraste a Herbrandson y col. (2003) que usó carbofurano grado técnico. La USEPA (2006) señala un valor similar al obtenido en nuestro estudio de 2,23 ug ia/l para la pulga de agua *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894. Esta especie de invertebrado acuático herbívoro tiene una posición central y de conexión en las cadenas de alimentación lénticas al servir de alimento a larvas y juveniles de peces dulceacuícolas (Golombieski y col. 2008).

La lectura final de inhibición en la formación de hojas en *L. minor* fue altamente sensible al carbofurano (3,85 ug ia/l), este efecto

fitotóxico en esta macrofitas no es concordante con lo indicado con la USEPA (2006), que señala que debido al mecanismo de acción del carbofurano de inhibición de la acetilcolinesterasa, no tiene efecto fitotóxico en plantas terrestres y acuáticas. De igual forma, Hartman y Martin (1985) no encontraron efectos fitotóxicos en *L. minor* y en *Potamogeton pectinatus* L. a concentraciones de carbofurano sobre 10 mg ia/l. El carbofurano empleado fue un formulado y por lo tanto el vehículo o inerte posiblemente contribuyó a la toxicidad del producto usado aunque no fue testeado.

El alto impacto del carbofurano a *P. innesi* evaluando el nado extraño fue concordante con lo observado por Saglio y col. (1996) en el pez *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), quienes encontraron efectos en la actividad de nado (refugio, mordisquear y nado en ráfaga), interacciones sociales y disminución a la atracción química a un extracto de alimento (quironomidos) por acción del carbofurano a las concentraciones de 1, 10 y 100 ug ia/l hasta las 12 h de exposición. El carbofurano es un plaguicida altamente tóxico para peces al presentar valores de CL_{50} menores a 1 mg/l (Saglio y col. 1996; Dobšicová 2003). La USEPA (2006) señala un valor de toxicidad aguda de CL_{50} de 88 y 280 ug ia/l para el carbofurano en el pez *Lepomis macrochirus* Rafinesque, 1819 y *O. mykiss*, respectivamente, siendo mucho más alto que el obtenido para los tres puntos finales de lectura en el neón tetra *P. innesi*.

La codorniz fue la única especie dentro de las terrestres, según el cociente de riesgo, que presentó riesgo al carbofurano. Bernados y Zaccagnini (2008) señalan un riesgo muy alto del carbofurano en aves de 0,4 mg/kg para patos y 5 mg/kg para codornices, siendo las principales vías de ingreso la oral (por el alimento expuesto al tóxico) y el acicalamiento de las plumas en contacto con el tóxico. La USEPA (2006) señala para *Dendrocygna bicolor* Vieillot, 1816 un valor de toxicidad oral aguda DL_{50} de 0,238 mg/kg y considera al carbofurano altamente tóxico para las aves y entre los 15 productos plaguicidas más tóxicos para este grupo de vertebrados (Tenenbaum 2008). Existen registros de envenenamiento secundario de aves rapaces que se alimentan de aves herbívoras e insectos contaminados por carbofurano (USEPA 2006).

La especie menos sensible, de las once especies evaluadas frente al carbofurano, fue *B. bassiana*. Varios estudios han mostrado la tolerancia de este hongo entomopatógeno al uso combinado con plaguicidas carbámicos y organofosforados inhibidores de la acetilcolinesterasa, encontrando escaso efecto colateral en este hongo a varios insecticidas y la compatibilidad con el control químico (Alizadeh y col. 2007).

La guía de calidad de aguas Canadienses considera un valor máximo de contaminación por carbofurano de 0,0018 mg ia/l para la protección de la vida acuática de agua dulce. Dos de las especies acuáticas (18,18% de las ocho especies ensayadas) y dos puntos final de lectura (18,18% del total de puntos finales evaluados): *D. magna* (mortalidad) y *L. minor* (inhibición de formación de las hojas), presentaron valores de toxicidad cercanos al nivel máximo permitido de carbofurano en agua para la protección de la vida acuática. Este hallazgo nos muestra la importancia de re-analizar el valor máximo de carbofurano propuesto para la protección de la vida acuática del agua dulce.

La ERA de un solo químico y de una sola aplicación podría subestimar el impacto en los ambientes acuáticos y terrestres, donde las mezclas de múltiples agroquímicos estresores y varias aplicaciones de plaguicidas han sido comúnmente registradas, produciendo cambios bioquímicos, fisiológicos y en el comportamiento de las especies (Golombieski y col. 2008). En general se acepta que la degradación ambiental de los ecosistemas por plaguicidas de uso cotidiano como el carbofurano es un factor causal de la declinación de especies en peligro o amenazadas. Esto permite conectar la ecotoxicología y la biología de la conservación con una meta en común (Laetz y col. 2009).

Los cocientes de riesgo (CR) indican en todos los casos un alto riesgo del carbofurano principalmente en el ambiente acuático en comparación con el terrestre.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación de la Universidad Ricardo Palma (URP) por la subvención de la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Alizadeh A., Samih M.A., Khezri M., Riseh R.S. Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with several pesticides. Int J Agr Biol. 2007;9:31-34.

Basso C., Pintureau B. *Trichogramma* species from Uruguay (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Rev Soc Ent Arg. 2004;63:71-80.

Bernardos J.N., Zaccagnini M.E. Evaluación del riesgo de toxicidad aguda para aves por uso de insecticidas en arroceras. En: de Balze, V.M., Blanco, D.E., Editores. Primer Taller para la conservación de Aves playeras Migratorias en arroceras del Cono Sur. [en línea]. Wetland International, Buenos Aires, Argentina. 2008. [consulta el 12 de enero del 2011]. Disponible en: <http://lac.wetlands.org>.

Bortoli S.A., De Murata A.T., Narciso R.S., De Brito C.H. The nutritional aspects of *Ceratochrysa cincta* Schneider, 1851 (Neuroptera: Chrysopidae) and different preys. Rev. Agr. 2005;80:1-11.

Brain R.A., Johnson D.J., Richards S.M., Sanderson H., Sibley P.K., Solomon K.R. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. Environ Toxicol Chem. 2004;23:371-382.

Castillo G. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA. México. 2004.

Chelmońska B., Jerysz A., Łukaszewicz E., Kowalczyk A., Malecki I. Semen collection from Japanese Quail (*Coturnix japonica*) using a teaser female. Turkean Jour Vet Animal Sci. 2008;32:19-24.

Cova L.J., Scorza J.V., García D.E., Cañizales L.M., Guedez C.C., Avendaño M.L., Medina M.G. Efecto de *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii* y la aplicación de gasoil en el control de moscas caseras en galpones avícolas. Av Inv Agropec. 2009;13:41-53.

Dobšiková R. Acute toxicity of carbofuran to selected species of aquatic and terrestrial organisms. Plant Prot Sci. 2003;39:103-108.

Gera M., Kiran R., Mahmood A. Subacute effects of carbofuran on enzyme functions in rat small intestine. Toxicol Mech Meth. 2009;19:141-147.

Golombieski J.I., Marchesan E., Baumart J.S., Reimche G.B., Júnior Ch.R., Storck L.,

Santos S. 2008. Cladocers, copepods and rotifers in rice-fish culture handled with met-sulfuron-methyl and azimsulfuron herbicides and carbofuran insecticide. *Ciencia Rural*, 38:2097-2102.

González-Valero J.F.; Campbell P.J.; Fritsch H.J.; Grau R. & Romijn K., 2000, Exposure assessment for terrestrial non-target arthropods. *J. Pest Science*, 73: 163-168.

Hartman W.A., Martin D.B. Effects of four agricultural pesticides on *Daphnia magna*, *Lemna minor*, and *Potamogeton pectinatus*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1985;35:646-651.

Herbrandson C., Bradbury S.P., Swackhamer D.L. Influence of suspended solids on acute toxicity of carbofuran to *Daphnia magna*: I. Interactive effects. *Aquatic Toxicol*. 2003;63:333-342.

Iannacone J., Alvaríño L., Caballero C., Sánchez J. Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos. *Gayana*. 2000;64:139-146.

Iannacone J., Lamas G. Efecto de dos extractos botánicos y de un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*. 2002;65:92-101.

Iannacone J., Onofre R., Huanqui O. Efectos ecotoxicológicos del cartap sobre *Poecilia reticulata* "guppy" (Poeciliidae) y *Paracheirodon innesi* "Neon Tetra" (Characidae). *Gayana*, 2007a;71:170-177.

Iannacone J., Onofre R., Huanqui S.A., Giraldo A.J., Mamani P.N., Miglio T.M.C., Alvaríño F.L. Evaluación del riesgo ambiental del insecticida metamidofos en bioensayos con cuatro organismos acuáticos no destinados *Agric Téc (Chile)*. 2007b;67:126-138.

Iannacone J., Tejada M. Empleo de la regeneración de la planaria de agua dulce *Girardia festae* (Borelli, 1898) (Tricladida: Dugesiidae) para evaluar la toxicidad del carbofurano. *Neotrop Helminthol*. 2007;1:7-13.

Laetz C.A., Baldwin D.H., Collier T.K., Hebert V., Stark J.D., Scholz N.L. The synergistic toxicity of pesticides mixtures: implications

for risk assessment and the conservation of endangered Pacific Salmon. *Environ Health Persp*. 2009;117:348-353.

Mascolo G., Lopez A., Detomaso A., Guzzella L. UV degradation of carbofuran insecticide in aqueous solution: identification and toxicity evolution of by-products. *Wat Supp*. 2005;4:313-319.

Miranda I.G., Ventura H.J., Suárez C.S., Fuentes R. C. Actividad citotóxica y antioxidante de los productos de la reacción de Maillard de los sistemas modelo d-glucosa – glicina y d-glucosa –l-lisina. *Rev Soc Quím Perú*. 2007; 73:215-225.

Orrego R., Moraga-Cid G., Gonzalez M., Barra R., Valenzuela A., Burgos A., Gavilán J.F. Reproductive, physiological, and biochemical responses in juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sediment from pulp and paper mill industrial discharge areas. *Environ Toxicol Chem*. 2005;24:1935–1943.

Ottinger M.A., Wu J.M., Hazelton J.L., AbdeInabi M.A., Thompson N., Quinn Jr.M.L., Donoghue D., Schenck F., Ruscio M., Beavers J., Jaber M. Assessing the consequences of the pesticide methoxychlor: neuroendocrine and behavioral measures as indicators of biological impact of an estrogenic environmental chemical *Brain*. *Res Bull*. 2005;65:199–209.

Pardo C.A. Ética de la experimentación animal. directrices legales y éticas contemporáneas. *Cuad. Bioét*. 2005;16:393-417.

Ramírez D.M., López A.I., González H.A., Badii Z. M.H. Rasgos biológicos y poblacionales del depredador *Ceraeochrysa* sp. nr. *cincta* (México) (Neuroptera: Chrysopidae). *Acta Zool Mex*. 2007;23:79-95.

Saglio P., Trijasse S., Azam D. Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1996;31:232-238.

Solomon K.R., Brock T.M., De Zwart D., Posthuma L., Richards S.M., Sanderson H., Sibley P.K., Van Den Brink P. Extrapolation practice for ecotoxicological effect characterization of chemicals. New York: USA SETAC.

CRC Press Taylor & Francis Group. 2008. p. 380.

Sarkar B., Chastterjee A., Adhikari S., Ayappan S. Carbofuran –and cypermethrin-induced histopathological alterations in the liver of *Labeo rohita* (Hamilton) and its recovery. J App Ichthyol. 2005;21:131-135.

Schuler L.J., Landrum P.F., Lydy M.J. Comparative toxicity of fluoranthene and pentachlorobenzene to three freshwater invertebrates. Environ Toxicol Chem. 2006;25:985–994.

Shaw J.R., Dempsey T.D., Chen C.Y., Hamilton J.W., Folt C.L. Comparative toxicity of cadmium, zinc, and mixtures of cadmium and zinc to daphnids. Environ Toxicol Chem. 2006;25:182–189.

Tauber C.A., De León C.A.T. Systematics of green lacewing (Neuroptera: Chrysopidae): larvae of *Ceraeochrysa* from Mexico. Ann Entomol Soc America. 2001;94:197-209.

Tazza M. Plaguicidas Ia-Ib en el Perú. Campaña para la prohibición y restricción de los plaguicidas extremadamente y altamente peligrosos. Lima, Peru. Red de Acción en Alter-

nativas al uso de Agroquímicos (RAAA) (Ed.). 12 p. 2005.

Tenenbaun D. Carbofuran under review. Environ Health Persp. 2008; 116: 425.

Thuler R.T., Bortoli S.A., Viana C.L.T.P., Goulart R.M., Pratissoli D. Efeito de inseticidas químicos e produtos vegetais sobre os parasitóides *Trichogramma pretiosum* e *Trichogramma exiguum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Bol San veg Plagas. 2007;33:15-26.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). Carbofuran. Interim Reregistration eligibility Decision. Case N° 0101, EPA-738-R-06-031, 38 p. 2006.

Urriago J.D., Himmelman J.H., Gaymer, C.F. Responses of the black sea urchin *Tetrapygus niger* to its sea-star predators *Helianther helianthus* and *Meyenaster gelatinosus* under field conditions. Jour Exp Mar Biol Ecol. 2011;399:17-24.

Vásquez C., Saldarriaga Y., Pineda F. Compatibilidad de *Beauveria bassiana* con fenoxi-carb. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). 2006;78:80-85.

Contribution of general esterases to pyrethroid resistant *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia

Santo-Orihuela, Pablo Luis*; Picollo, María Inés

Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CITEDEF-CONICET), Juan Bautista de La Salle 4397, (B1603ALO), Buenos Aires, Argentina. Phone/Fax: (+5411) 4709-5334

*psantoorihuela@conicet.gov.ar

Recibido: 28 de noviembre de 2010

Aceptado: 16 de febrero de 2011

Abstract. The objective of this work was the study of the relative contribution of general esterases: α -naphthyl acetate (α -NA) and p-nitro phenyl acetate (p-NPA) in pyrethroid-resistant *T. infestans* from these locations. We used deltamethrin-resistant populations previously collected in two areas in Argentina (Salta and La Rioja) and one area in Bolivia (Tarija). In this study, frequency histograms of α -NA and p-NPA esterase activities, exhibited similar patterns between Bolivian population and the susceptible counterpart. In contrast, Argentinean field populations showed higher proportion of increased enzyme activity individuals. These results clearly demonstrated that resistances in Argentinean and Bolivian field populations are based on different mechanisms, suggesting that enzyme-based pyrethroid resistance in this species has multiple origins.

Keywords: *Triatoma infestans*; Pyrethroid resistance; α -naphthyl acetate esterases; p-nitrophenyl acetate esterases.

Resumen. El objetivo de este trabajo fue el estudio de la contribución relativa de esterases generales: α -naftil acetato (α -NA) y p-nitro fenil acetato (p-NPA) a la resistencia a piretroides de *T. infestans* provenientes de esas localidades. Se evaluaron poblaciones resistentes a deltametrina previamente recolectadas en dos áreas de Argentina (Salta y La Rioja) y un área en Bolivia (Tarija). En este estudio, los histogramas de frecuencias de actividades de α -NA y p-NPA esterases mostraron perfiles similares entre la población boliviana y la población susceptible. Por el contrario, en las poblaciones argentinas de campo se observó una elevada proporción de individuos con actividad enzimática incrementada. Estos resultados demuestran claramente que la resistencia en poblaciones argentinas y bolivianas de campo se origina a partir de distintos mecanismos, sugiriendo que la resistencia a piretroides basada en la acción de enzimas presentan múltiples orígenes en estas especies.

Palabras clave: *Triatoma infestans*; Resistencia a piretroides; α -naftil acetato esterases; p-nitro fenil acetato esterases.

INTRODUCTION

In Latin America, Chagas disease is currently the most important parasitic disease and it represents a major health and social problem. About 9 million people are infected by the causative agent of this disease, *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) (Schofield *et al.* 2006; Gurtler *et al.* 2007).

The main vector in Argentina and Bolivia is a blood-sucking insect, *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). In Argentina, this vector has been controlled using pyrethroid insecticides for 30 years. As a result,

resistance to pyrethroids has been detected in some areas of Argentina since 1997 (Vasena and Picollo 2003; González Audino *et al.* 2004). In 2002, high resistance to pyrethroid insecticides was associated with ineffective field treatments against *T. infestans* in northern Argentina (Picollo *et al.* 2005).

Resistance to pyrethroids in different species of insects has been found to be associated with elevated monooxygenases and esterases (Wilkinson 1983; Oppenorth 1985; Santo Orihuela *et al.* 2008). These enzymes produce

rapid degradation of pyrethroid insecticides to their nontoxic compounds (Karunaratne 1998; González Audino et al. 2004; Hemingway et al. 2004). Resistance associated with increased metabolism in *T. infestans* was found in a deltamethrin-resistant field population from Salta, Argentina (González Audino et al. 2004). This study demonstrated a correlation between elevated monooxygenase activity, determined on individual abdomens through ethoxycoumarin-o-deethylase (ECOD) activity, and deltamethrin resistance. Moreover, the study showed a significant difference in non specific esterase activity measured as phenyl-thioacetate and α -naphthyl acetate activities between the susceptible and Salta populations. Later, a new fluorescent substrate for examining pyrethroid-cleaving esterases was reported by Santo Orihuela et al. (2006a; 2006b) and esterase and monooxygenase microplate assays were used for evaluating the frequency distribution of enzyme activities among resistant populations of *T. infestans* from two regions in Argentina and one in Yacuiba, Bolivia (Santo Orihuela et al. 2008).

Additionally, other methods to evaluate the contribution of esterases to pyrethroid resistance are based on non specific substrates as α -naphthyl acetate (α -NA) and para-nitro phenyl acetate (p-NPA). These substrates showed important additional information in the evaluation of resistance profiles. (Fontan and Zerba 1984; González Audino et al. 2004).

Our objective was the study and evaluation of the relative contribution of general esterases (α -NA and p-NPA esterases) in pyrethroid-resistant *T. infestans* from Argentina and Bolivia.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

The chemicals used were α -naphthyl acetate, α -naphthol, 4-nitrophenyl acetate, 4-nitrophenol, diazo Blue B (o-dianisidine tetrazotized) from Sigma Chemical Co. USA and proanalysis acetone from Merck, Argentina.

Insects

Insect sampling. Field populations of *T. infestans* were collected in May 2005 from infested houses of three geographical regions in Argentina and Bolivia. The chosen regions represented areas previously identified as having pyrethroid resistant *T. infestans* based on the laboratory test, areas with reported ineffectiveness of the field application of pyrethroids,

or both. The collection sites in each area are described below (Figure 1).



Figure 1. Map of Argentina showing study sites where *T. infestans* were collected. Area A: Salvador Mazza; Area B: Cuatro Esquinas; Area C: Tarija; Area D: Figueroa.

Area A. Salvador Mazza is located in San Martín Department ($22^{\circ} 03' S$, $63^{\circ} 41' W$), Salta Province, Argentina. Resistance ratio (RRs) was 133.1 (Picollo et al. 2005). Samples from this area were provided by Mario Zaidemberg from the Ministry of Health of Argentina.

Area B. Cuatro Esquinas, San Martín Department ($31^{\circ} 48' S$, $65^{\circ} 52' W$), this site is located to the south of La Rioja Province, Argentina, the RR was 14.1 (Vassena et al., 2007). Samples from this area were provided by Cynthia Spillman from the Ministry of Health, Argentina.

Area C. Yacuiba is located in southern Bolivia (Tarija Department) ($22^{\circ} 00' S$ $63^{\circ} 40' W$). In 2003, serious levels of infestation after chemical control of field insects were reported by Abraham Jemio from the Ministry of Health and Sports, Bolivia. Later, high deltamethrin resistance was established in the laboratory (RR = 154.4) (Santo Orihuela et al. 2008).

All populations were resistant to deltamethrin. The Salta and Yacuiba populations showed high resistance ratios (RRs) to deltamethrin compared with the reference strain (RRs:

133.1 and 154.4 respectively). La Rioja population showed a lower RR to deltamethrin (RR: 14.09) (Santo Orihuela *et al.* 2008).

The laboratory reference strain was the susceptible CIPEIN (Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas), which has been reared without insecticide exposition in our laboratory since 1975 (Picollo *et al.* 1976).

A field population collected in 2005 in an area without control failures or other indications of possible resistance was used as field reference strain. This population (RR: 1.6) was collected in the Figueroa Department, located in the Santiago del Estero Province (28° 26' S, 63° C 33' W) and provided by Raúl Stariolo from the Ministry of Health, Argentina (Santo Orihuela *et al.* 2008).

Field collected insects were reared in the laboratory in order to obtain enough number of individual for assays. The RRs values reported in 2005 were confirmed in 2007 against first nymphs of the second generation of field insects (Picollo *et al.* 2005). The enzymatic activity was assessed in 2007 against the second generation of insects (development time: about 1 year).

All populations were maintained in the laboratory at $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 50% RH and a photoperiod of 12:12 (L:D) h. Bugs were fed weekly on pigeons. For all the experiments, laboratory-reared first instars (3-5 d old) and starved since eclosion (mean weight 1.2 ± 0.2 mg), were selected for the tests according to the World Health Organization protocol (WHO 1994). This protocol has been used in numerous works in this area (Vassena *et al.* 2000; González Audino *et al.* 2004; Sonoda *et al.* 2009).

Equipment

The absorbance of the wells was determined using a microplate reader spectrophotometric equipped with 340, 405, 415, 540, 595 and 655-nm wavelength filter (Microplate reader, model 680, Bio-Rad Laboratories, Inc.). The Microplate Manager[®] software v. 5.2.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) was used to collect, to analyze, and to output absorbance data from Bio-Rad's microplate readers.

Esterases

The activity of α -naphthyl acetate esterases was measured using α -naphthyl acetate as substrate. The α -naphthol generated by enzymatic hydrolysis was mixed with o-dianisidine tetrazotizade and the formed diazo-compound

was detected by espectrophotometry (600 nm) (Gomori 1953; van Asperen 1962).

Briefly, each nymph I was homogenized individually in 250 μl of phosphate buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) pH 7.2, 0.05 M. Volumes of 50 μl of homogenates were individually placed into 96-well microplates containing 50 μl of α -naphthyl acetate. The mix was incubated at 20°C for 10 minutes and then, 50 μl of o-tetrazotized dianisidine (5 mg/ml) were added. The absorbances were measured after a second incubation of 2 minutes at 20°C .

Another substrate used to determinate esterase activity was p-nitrophenyl acetate (p-NPA). This method is based on the kinetic spectrophotometric measure of p-nitrophenoxide (400 nm), product of hydrolysis of this substrate (Wallace *et al.* 1988).

First nymphs were homogenized in 250 μl of buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0.05 M, pH 7.2. A volume of 133 μl of homogenate was incubated with 3 μl of 61 mM of p-NPA. The absorbance was measured each 30 seconds for 10 minutes.

The α -naphthyl acetate and p-nitrophenyl acetate esterases activities of individuals were based on standard curves performed with commercial α -naphthol and 4-nitrophenol in concentrations of 34.75; 17.38; 8.69; 4.34; 2.17 nanomoles per well and 45.98; 16.33; 5.11; 1.70 nanomoles per well, respectively. These curves were performed per assay and each concentration of standard was made per duplicate. Activities were all corrected for background hydrolysis and expressed as nanomoles of hydrolyzed substrate per minute per insect.

Protein concentration in insects was quantified using a protein kit (Total Protein Kit, Sigma[®]) based on the technique of Bradford (1976). The number of nymphs I used was between 10 and 20 individual for each studied population.

Statistical analysis

The Kruskal-Wallis test was used to compare the amount of protein among studied populations. The values of enzymatic activity were compared among populations also using Kruskal-Wallis test. The biochemical data were plotted as the percentage of individuals responding within a particular range of values of enzyme activity (Sokal and Rohlf 1980). Frequency profiles for α -naphthyl acetate and p-nitrophenyl acetate esterases activities from individual insects were analyzed for general

esterases. To compare histograms for different populations a reasonable and discretionary threshold containing the majority (80%) of insects was established for the susceptible strain, and the percentage of insects over the threshold was calculated for each enzymatic activity and each population according to previous works about monooxygenases and esterases insect activities (Picollo *et al.* 2005; Santo Orihuela *et al.* 2008; Barrios *et al.* 2010).

RESULTS

The amount of protein calculated was not different among studied populations and susceptible strain (Kruskall-Wallis Test), thus the esterases activity (nanomoles per minute) was expressed per insect (*Table 1*).

Table 2 shows the mean enzymatic activities and statistical values for the studied populations.

The frequency distribution of esterases activities between resistant (Salvador Mazza, Cuatro Esquinas and Tarija) and susceptible (CIPEIN and Figueroa) *T. infestans* populations, based on individual assays, are shown in *figures 2 and 3*.

The α -naphthyl acetate activity for the laboratory reference strain (CIPEIN) and the susceptible field population (Figueroa) showed the minor values compared to the S. Mazza and Cuatro Esquinas resistant field populations. The percentage of individuals with activities over the susceptible activity threshold, 1.7 nanomoles per minute per insect, was 12.2 and 10.4% for susceptible populations, and 44.2 and 93.1% for the resistant ones. In contrast, the resistant Tarija population exhibited lower levels of activity relative susceptible ones (3.6% of insects over the susceptible activity threshold). (*Figure 2*)

Table 1. Means, standard deviations of protein content and number of insects (n) for studied populations

Strain / Population	n	Mean protein content \pm standard deviation (μg per insect)
Cipein	26	94.37 (\pm 28.88) ^a
Figueroa	19	84.96 (\pm 20.95) ^a
Salvador Mazza	22	109.14 (\pm 30.69) ^a
Cuatro Esquinas	17	110.14 (\pm 21.35) ^a
Tarija	12	88.67 (\pm 16.24) ^a

Means of protein content followed by the same letter are not significantly different ($P > 0.05$). Kruskal-Wallis Statistic KW = 7.479.

Table 2. Mean enzymatic activities of α -naphthyl acetate (α -NA) and p-nitrophenyl acetate esterases, standard deviations and total number of insect used (n) for studied populations

Strain / Population	n	α -NA (nmoles/min)	n	p-NPA (nmoles/min)
Cipein	74	1.202 (\pm 0.490) ^a	76	1.341 (\pm 0.521) ^a
Figueroa	67	1.048 (\pm 0.528) ^{ab}	29	1.440 (\pm 0.614) ^{ab}
Salvador Mazza	68	1.658 (\pm 0.561) ^c	54	1.962 (\pm 0.898) ^c
Cuatro Esquinas	29	2.374 (\pm 0.510) ^d	16	1.761 (\pm 0.555) ^{bc}
Tarija	28	0.833 (\pm 0.437) ^b	30	1.337 (\pm 0.866) ^a

Values in the same column followed by different letter are significantly different ($P < 0.05$) (Kruskal Wallis and Dunn's Multiple Comparisons Test). KW=107.64 (α -NA) and 27.618 (p-NPA).

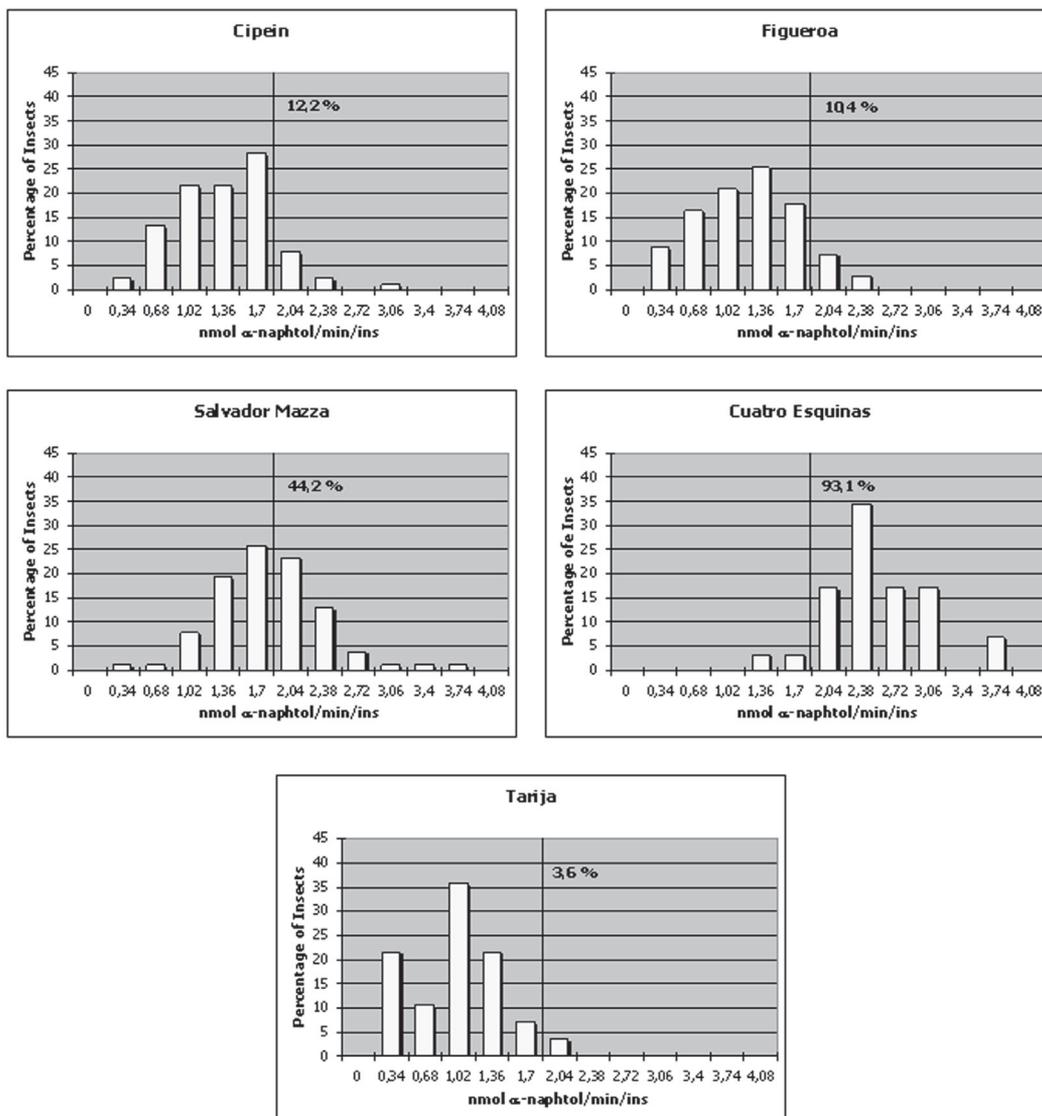


Figure 2. Histograms indicating the distribution of α -naphthyl acetate esterases activities exhibited by susceptible and resistant *T. infestans* in individual assays.

The p-nitrophenyl acetate activity distribution also separated the resistant S. Mazza and Cuatro Esquinas populations from the susceptible CIPEIN and Figueroa and the resistant Tarija. The percentage of individuals showing activities over the susceptible threshold (1.86 nanomoles per minute and per insect) was

13.2 and 20.7% for susceptible populations, and 50 and 43.8% for S. Mazza and Cuatro Esquinas resistant ones. The resistant Tarija exhibited a similar pattern of p-NPA activity to those of susceptible insects (16.7% of individuals showing activity values over the threshold) (Figure 3).

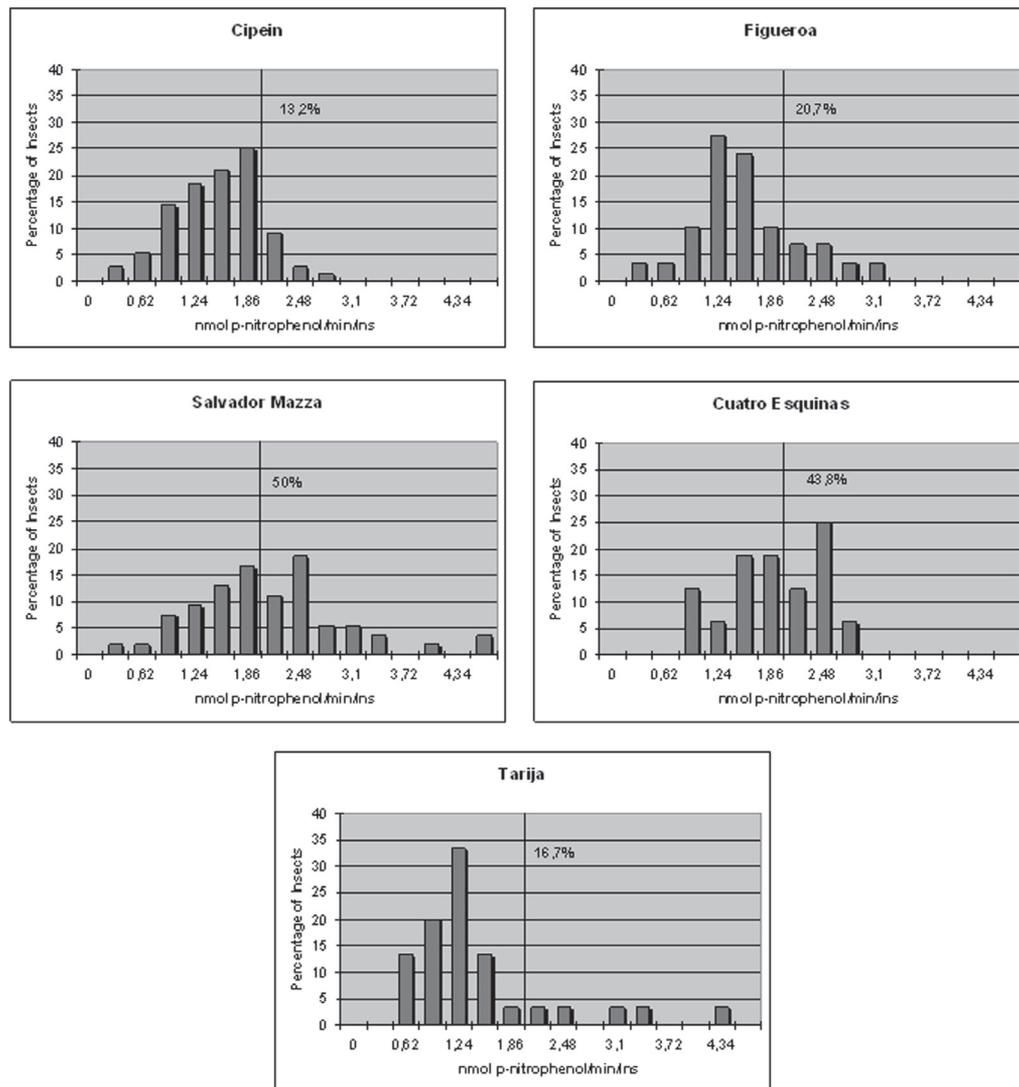


Figure 3. Histograms indicating the distribution of p-nitrophenyl acetate esterases activities exhibited by susceptible and resistant *T. infestans* in individual assays.

DISCUSSION

Despite prolonged and intensive control campaigns against Chagas disease vectors, few studies have been reported on the possible development of insecticide resistance and changes in the susceptibility of the main vector, *Triatoma infestans*.

Currently, there is very little literature related to resistance to pyrethroid insecticides and the failure of control in the field. As well as works that provide evidence of the possible mechanisms involved in resistance.

Recently, high resistance to pyrethroid insecticides has been associated with ineffective field treatments against *Triatoma infestans*

(Klug) (Hemiptera: Reduviidae) in Argentina and Bolivia (Picollo *et al.* 2005). Samples were collected from two areas in Argentina (Salta and La Rioja) and one area in Bolivia (Tarija), (Santo Orihuela *et al.* 2008) and they were subjected to toxicological and biochemical assays. All populations were resistant to deltamethrin. The Salta and Yacuiba populations showed high resistance ratios (RRs) to deltamethrin compared with the reference strain (RRs: 133.1 and 154.4 respectively). Otherwise, the La Rioja population showed a lower RR to deltamethrin (RR: 14.09). That work also reported that measured activity of P450 monooxygenase in individual

insects (based on ethoxycoumarine-O deethylase), tended to be higher in the deltamethrin-resistant populations, but the differences were not statistically significant. Activity of specific esterases determined by the hydrolysis of 7-coumaryl permethrate demonstrated an increase in the percentage of insects with higher esterase activity in Salta and La Rioja populations. Unexpectedly, the Yacuiba population showed lower pyrethroid esterase activity than the reference strain. These results demonstrated different contribution of specific esterases to pyrethroid resistance between *T. infestans* from Argentina and Bolivia, and suggested independent evolution of resistance in both areas.

In the present study, the resistant populations from Argentina (S. Mazza and Cuatro Esquinas) exhibited significantly higher levels of α -NA and p-NPA esterases relative to the susceptible counterpart. In contrast, the resistant population from Bolivia (Tarija) exhibited frequency histograms of α -NA and p-NFA esterase activities similar to the susceptible populations. These results suggest that α -NA and p-NFA esterases are involved in the pyrethroid resistance of Salvador Mazza and Cuatro Esquinas, but not in Tarija. These data clearly indicated different patterns of general esterase activity in Argentinean and Bolivian resistant populations, and suggested that resistances partly could be based on different mechanisms. Similarly, previous studies against a deltamethrin resistant population of *T. infestans* from Acambuco, Salta, Argentina were reported by Gonzalez Audino *et al.* (2004). In this work the authors studied the role of enhanced detoxification in a low resistant population (RR: 7.9). They found a significant difference in phenyltioacetate and α -NA esterase activity, and concluded that the degradative esterases play an important role in the resistance to deltamethrin in Salta colony. The examination of elevated general esterase activity by simple assays has been commonly used to implicate the involvement of hydrolytic mechanisms in insecticide resistance (Soderlund and Bloomquist 1991). The individual assays using 96-well microplate format, allows both qualitative and quantitative measurement of enzymes activities from each insect and can provide an estimate of resistance frequency of field populations (Rose *et al.* 1995). Based on individual activity assays, Zhou *et al.* characterized differences in esterase activity between susceptible and methyl-parathion resistant population of the western corn rootworm *Di-*

abrotica virgifera (Le Conte) (Zhou *et al.* 2003). Using naphtholic esters as model substrates in single larva assays, the authors established differences in esterase activity between resistant and susceptible populations. They found that resistant populations were 7.3 and 5.8 fold higher than susceptible populations and the frequency histograms of esterase activity were clearly different between resistant and susceptible populations.

The different esterases patterns found in *T. infestans* from Argentina and Bolivia suggests that enzyme-based pyrethroid resistance in this species has multiple origins (Santo Orihuela *et al.* 2008).

Nevertheless, because nerve insensitivity (related to the presence of the *kdr* mutation) is also an important mechanism related to pyrethroid resistance, further studies on the *kdr* mutation should be carried out to clarify the relative contribution of each pyrethroid-associated mechanism in deltamethrin-resistant populations of *T. infestans*. Although the importance of this study and the number of research groups working on this issue, there is not information available yet about *kdr* mutation in triatomines.

This knowledge will provide rational bases for alternative strategies for the chemical control of pyrethroid resistant *T. infestans* field populations.

Acknowledgments

We thank to Drs. Cynthia Spillmann, Mario Zaidemberg and Raúl Stariolo and technicians from the Coordinación Nacional de Control de Vectores, Ministerio de Salud de Argentina, and to Tamara Chavez, Abraham Jemio and technicians from Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia, for the coordination of field sampling. This investigation received financial support from the UNICEF/UNDP/ World Bank/World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, and the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas of Argentina (CONICET).

REFERENCES

- Barrios S., Zerba E., Picollo M., Audino P. Activity of increased specific and non-specific esterases and glutathione transferases associated with resistance to permethrin in *Pediculus humanus capitis* (phthiraptera: pediculidae) from Argentina. Parasitol Res. 2010;106(2):415-21.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1-2):248-54.

- Fontan A., Zerba E. Integumental esteratic activity in *Triatoma infestans* and its contribution to the degradation of organophosphorus insecticides. *Comp Biochem Physiol C*. 1984;79(1):183-8.
- Gomori G. Human esterases. *J Lab Clin Med*. 1953;42(3):445-53.
- González Audino P., Vassena C., Barrios S., Zerba E., Picollo M. Role of enhanced detoxication in a deltamethrin-resistant population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(3):335-9.
- Gurtler R.E., Kitron U., Cecere M.C., Segura E.L., Cohen J.E. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *P Natl Acad Sci USA*. 2007;104(41):16194-9.
- Hemingway J., Hawkes N.J., McCarroll L., Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004 Jul;34(7):653-65.
- Karunaratne S. Insecticide resistance in insects: a review. *Cey J Sci (BioSci)*. 1998;25:72-99.
- Oppenoorth F.J. Biochemistry and Genetics of Insecticide Resistance. In: Kerbut G., Gilbert L., editors. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Toronto: Pergamon Press; 1985. p. 731-73.
- Picollo M.I., Wood E., Zerba E.N., Licastro S.A., Rúveda M.A. Laboratory test for measuring toxicity of insecticides in *Triatoma infestans*. *Klug Acta Bioquim Latinoam*. 1976;10:67-70.
- Picollo M.I., Vassena C.V., Santo Orihuela P.L., Barrios S., Zaidemberg M., Zerba E. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol*. 2005;42(4):637-42.
- Rose R.L., Barbhaiya L., Roe R.M., Rock G.C., Hodgson E. Cytochrome P450-Associated Insecticide Resistance and the Development of Biochemical Diagnostic Assays in *Heliothis virescens*. *Pestic Biochem Physiol*. 1995;51(3):178-91.
- Santo Orihuela P.L., Picollo M.I., Zerba E.N., Masuh H. The 7 *cis*- or *trans*- coumaryl permethrate esterases as a possible biochemical marker of pyrethroid resistance in: *Pediculus humanus capitis*. Third International Congress on Phthiraptera (ICP3). Ciudad de Buenos Aires. Argentina. 2006a.
- Santo Orihuela P.L., Vassena C.V., Zerba E.N., Picollo M.I. Relative Contribution of Monooxygenase and Esterase to Pyrethroid Resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol*. 2008;45:298-306.
- Santo Orihuela P.L., Picollo M.I., González Audino P., Barrios S., Zerba E.N., Masuh H. 7-Coumaryl permethrate and its *cis*- and *trans*-isomers as new fluorescent substrates for examining pyrethroid-cleaving enzymes. *Pest Manag Sci*. 2006b;62(11):1039-44.
- Schofield C.J., Jannin J., Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*. 2006;22(12):583-8.
- Soderlund D.M., Bloomquist J.R. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Roush R.T., Tabashnik B.E., editors. *Pesticide resistance in arthropods*. New York: Chapman and Hall; 1991. p. 58-96.
- Sokal R., Rohlf F. *Introducción a la Bioestadística*. 1st ed. Barcelona, España: Reverté, S.A.; 1980.
- Sonoda I.V., Pessoa G.C., Cortez M.R., Dias J.C., Romanha A.J., Diotaiuti L. Susceptibility of *Triatoma infestans* to deltamethrin in Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:668-70.
- van Asperen K. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J Insect Physiol*. 1962;8(4):401-14.
- Vassena C.V., Picollo M.I., Zerba E.N.. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med.Vet. Entomol*. 2000;14(1):51-5.
- Vassena C.V., Picollo M.I., Santo Orihuela P.L., Zerba E.N.. Desarrollo y manejo de la resistencia a insecticidas piretroides en *Triatoma*

infestans: situación en Bolivia. In: Cortéz M.R., editor. Triatominos de Bolivia: *Triatoma infestans*, principal vector de la enfermedad de Chagas en Bolivia. La Paz, Bolivia: Ministerio de Salud y Deportes; 2007. p. 229-55.

Vassena C.V., Picollo M.I. Monitoreo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, insectos vectores de la Enfermedad de Chagas. RETEL [revista de toxicología en línea] 2003 [Jan 12 2003];3[21 p.]. Available on: <http://ser-tox.com.ar/retel/n03-004.pdf>.

Wallace G., Casabé N., Wood E., Zerba E. Assay of pyrethroid-hydrolysing esterases using (1,R)-*cis*-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylates as substrates. Xen-

biotica. 1988;18(4):351-5.

WHO. World Health Organization. Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre Triatominos. Acta Toxicol Arg. 1994;2:29-32.

Wilkinson C.F. Role of mixed function oxidase in insecticide resistance. In: Georghiou P., Saito T., editors. Pest Resistance to Pesticide. New York, United States of America: Plenum Press; 1983. p. 175-207.

Zhou X., Scharf M.E., Meinke L.J., Chandler L.D., Siegfried B.D. Characterization of general esterases from methyl parathion-resistant and -susceptible populations of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). J Econ Entomol. 2003;96(6):1855-63.

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

RESÚMENES DE TESIS

Producción de un fragmento de anticuerpo recombinante quimérico anti esfingomielinasa D contra la mordedura de la araña *Loxosceles*

Moctezuma González, Claudia L.

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 1001, colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos.

klaudya_moktezuma@yahoo.com.mx

De las más de 40.000 especies de arañas descritas, se consideran cuatro géneros de importancia médica por las manifestaciones clínicas y letalidad de sus venenos: *Latrodectus*, *Loxosceles*, *Phoneutria*, y *Atrax*. Las arañas del género *Loxosceles*, conocidas como violinistas, son cosmopolitas, de las cuales aproximadamente el 85% de las especies se encuentran en el continente americano.

El veneno de *Loxosceles* está constituido por diversos componentes, sin embargo, se ha comprobado que la esfingomielinasa D (SMD) es la responsable de la actividad tóxica del veneno. Como parte de la estrategia en la investigación de esta proteína, se generaron diversos anticuerpos monoclonales (AcM) específicos para la SMD de distintas especies. Uno de ellos fue capaz de reconocer e inhibir *in vitro*, la actividad de la toxina recombinante de *L. reclusa* (Oklahoma) y de *L. boneti* (México). Esta característica única del AcM, llevó a la propuesta para la generación de un fragmento de anticuerpo (Fab) recombinante quimérico derivado de este AcM, para que posteriormente pudiera ser evaluado como una herramienta terapéutica.

La estrategia para la generación del Fab quimérico consistió en amplificar por PCR las regiones variables del AcM a partir de RNA total, obtenido del hibridoma correspondiente. Los primers antisentido de cada cadena se diseñaron en función de las secuencias reportadas de IgG1 de ratón con cadenas ligeras tipo kappa. Para los primers sentido fue necesario obtener la secuencia del amino terminal y en función de ella se diseñaron primers degenerados. El primer aminoácido del extremo amino de la cadena pesada se encontraba bloqueado lo cual impidió su secuenciación. Por lo tanto se recurrió a la técnica de amplificación rápida

de los extremos de cDNA (kit RACE de Gibco BRL Cat. 18374-058) y en función de esta se diseñó el primer correspondiente.

Los fragmentos variables fueron subclonados en el vector de expresión, pSyn modificado (FEBS Journal Volume 272, Issue 10, pages 2591-2601), el cual contiene los segmentos de las regiones constantes de un Fab humano. Este plásmido genera un RNA mensajero bicistrónico (cadena pesada y ligera) e incorpora 6 histidinas en el carboxilo terminal de cada cadena, las cuales son enviadas al espacio periplásmico. Se utilizó la cepa TG1 y el medio de cultivo YT2X (ampicilina 100 g/ml y 0,1 % de glucosa). Las condiciones de crecimiento para el cultivo fueron a 30°C con agitación constante durante 12 horas después de la inducción con 1 mM de IPTG. Las células fueron colectadas e incubadas durante 20 minutos a 4°C en PPB (200 mg/l sacarosa, 1 mM EDTA, 30 mM Tris-HCl). Después de centrifugar, se recuperó y el precipitado se resuspendió en 5 mM de MgSO₄. Nuevamente se incubó durante 20 minutos a 4°C, se centrifugó y recuperó el sobrenadante. Finalmente, los sobrenadantes se centrifugaron y mezclaron. La proteína se purificó utilizando una columna de afinidad (Ni-NTA- Sepharose, Qiagen). La elución se realizó con 250 mM de imidazol en buffer de fosfatos (PBS). La proteína fue dializada contra PBS y analizada por gel de SDS-PAGE. El rendimiento de producción del Fab recombinante fue de 62,5 µg/l.

Para la generación del Fab murino fue necesario inocular intraperitonealmente ratones Balb/C con células del hibridoma productor y purificar los anticuerpos por cromatografía de afinidad (Sepharose® 4B acoplada a Proteína A, Zymed, Cat. 101042). El AcM fue dializado contra PBS y analizado por SDS-PAGE. La

digestión se realizó con papaína. La enzima en (1 mM EDTA, 50 mM buffer fosfatos, 10 mM cisteína) a 0.65 mg/ml se incubando durante 10 min a 37°C. Posteriormente se incubó un volumen de AcM en (1 mM EDTA + 50 mM buffer de fosfatos + 10 mM cisteína) a 1 mg/ml y 1 volumen de papaína durante 2 horas a 37°C. La reacción se detuvo adicionando la cantidad necesaria de E64 (ROCHE) para quedar a una concentración final de 40 µM. La purificación se realizó mediante un sistema de FPLC de intercambio iónico con dos columnas acopladas en tándem (Hi-Trap Q FF y Hi Trap SP FF Amersham Pharmacia Biotech). Las columnas se equilibraron con 25 mM Tris-HCl pH 8,0 y elución se realizó con 25 mM Tris-HCl pH 8 + 2 M NaCl. El Fab murino fue dializado contra PBS.

Para ambos fragmentos de Fab, quimérico y murino, se evaluó la capacidad de reconocimiento por ELISA y la capacidad de neutralización *in vitro* e *in vivo*. Para los ensayos de neutralización *in vitro* se usó el Kit Amplex™ Red, Molecular Probes, el cual después de una cascada de cuatro reacciones produce una molécula colorida (resorufina) en presencia de actividad de SMD. Los ensayos *in vivo* se realizaron en ratones Balb-C, inoculando una mezcla de 3 dosis letales medias de la toxina con distintas cantidades de Fab (murino o quimérico).

Los valores de EC₅₀ del análisis por ELISA son de 2.2 (95% de intervalo de confianza de 2 a 2.5) tanto para el Fab murino como para el Fab quimérico, lo cual indica que ambos fragmentos reconocen en la misma proporción a la SMD de *L. reclusa*.

El ensayo de inhibición *in vitro* con la SMD de *L. reclusa* indicó un valor de EC₅₀ de 0.031 para el AcM (95% de intervalo de confian-

za de 0.02824 a 0.03439) y de 0.032 para el Fab murino (95% de intervalo de confianza de 0.02370 a 0.04181). Al traducir estos valores a relaciones molares toxina:inhibidor, se encontró una relación de 1:0.5 para el AcM y 1:1.4 para el Fab. Considerando que el AcM es una molécula con el doble de avidéz, la capacidad de inhibición del Fab no es significativamente distinta.

De los ensayos *in vivo* se encontró que el valor EC₅₀ es de 84 µg/ratón (95% de intervalo de confianza de 80 a 88) para el AcM y de 23 µg/ratón (95% de intervalo de confianza de 22 a 25) para el Fab murino.

El Fab quimérico no fue capaz de inhibir la actividad de la toxina. La molécula Fab es un fragmento de anticuerpo que conservó una estabilidad y capacidad inhibitoria proporcional a la del anticuerpo completo. Sin embargo, la proteína quimérica perdió su capacidad neutralizante, muy probablemente el plegamiento del fragmento se ve afectado por el ambiente de la bacteria y/o por el cambio en la secuencia de las regiones constantes. El AcM presenta características únicas y su correspondiente fragmento Fab las conserva por lo que pueden evaluarse otros sistemas de expresión que además mejore los rendimientos de producción y permitan evaluar al anticuerpo quimérico.

Este trabajo contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México y del Instituto Bioclon S.A de C.V, México.

Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México

Tutor: Dr. Alejandro Alagón Cano

Co-Tutor: M. en C. Alejandro Olvera Rodríguez

Estudio de las alteraciones bioquímicas, histopatológicas y ultraestructurales producidas por la administración oral a largo plazo de cotinina en ratas. Comparación con nicotina

Sassone, Adriana H.

Cátedra de Toxicología y Química Legal. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Junín 956, 6°, CABA. C1113ADD.

El fumar tabaco tiene efectos en el ser humano sobre el comportamiento, el sistema nervioso central y periférico, el aparato cardiovascular y el sistema endocrino y, además, está asociado con la patogenia de diversas enfermedades.

La fuente principal del tabaco son las especies *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana rustica*.

La nicotina (NI), principal compuesto activo del tabaco, es una droga adictiva y se le atribuyen los principales efectos adversos del tabaquismo.

La NI se metaboliza principalmente en el hígado. En un 70-80% es convertida a cotinina (COT), que es el principal metabolito en los mamíferos, incluido el ser humano.

La acción de la COT en el ser humano es muy poco conocida a pesar de su larga vida media biológica comparada con la de la NI (10 - 30 horas vs 1 - 3 horas, respectivamente).

Hipótesis

Esta tesis postula que es posible que la COT también intervenga en alguno de los efectos que experimentalmente se le atribuyen a la NI en modelos de largo plazo.

Objetivos

Se usaron ratas Sprague Dawley adultas machos para: a) determinar los efectos de la NI y la COT sobre los niveles de glucosa y el perfil lipídico, b) estudiar el comportamiento en el "campo abierto" y c) estudiar la histopatología del sistema vascular en diferentes tejidos.

Objetivos específicos

a) Desarrollar un método analítico para identificar y cuantificar COT plasmática por cromatografía líquida de alta "performance" (HPLC); b) Estudiar la toxicocinética de la COT; c) Evaluar los efectos de NI y COT sobre el síndrome de retirada, peso corporal, niveles plasmáticos de glucosa, colesterol y triglicéridos, niveles urinarios de ácido vainillinmandélico (AVM), presión arterial, frecuencia cardíaca y alteraciones histopatológicas luego de 120 días de tratamiento.

Estudio toxicocinético

La COT fue administrada en agua de red mediante sonda gástrica vía oral en una dosis de 1,30 mg/kg de peso animal luego de un ayuno de 12 horas.

Estudios crónicos

La NI (5 y 10 mg/kg/día) y la COT (4, 8 y 12 mg/kg/día) fueron administradas en el agua de bebida durante 120 días. El grupo control (C) recibió solamente agua de red.

Resultados

La NI disminuyó el peso corporal respecto del grupo C alcanzando una significación estadística a partir del día 56. El grupo COT se comportó de manera similar al C.

En el "campo abierto" se midieron 9 movimientos. La privación de NI (10 mg/kg/día) por 24 horas modificó de manera significativa 5 de los movimientos respecto de C y COT. La abstinencia de COT (12 mg/kg/día) por 24 horas alteró sólo 1 movimiento respecto de C. El reemplazo de NI por COT 12 por 24 horas modificó 7 de los movimientos respecto al nivel basal sin privación de NI.

La NI ($p < 0,05$) y la COT ($p < 0,001$) aumentaron la glucemia respecto de C. Los valores medios de glucosa de los grupos COT 8 y 12 y NI 10 aumentaron respecto de los niveles basales en un 100%, 75% y 34%, respectivamente.

La COT no afectó los valores de triglicéridos plasmáticos, mientras que la NI los disminuyó significativamente con respecto a C. No hubo diferencias significativas en los niveles de colesterol entre los grupos.

En el grupo COT 12, el AVM urinario aumentó más del 100% ($p < 0,001$) respecto del grupo C y del grupo NI 10.

No se registraron diferencias significativas entre los valores de la presión arterial ni de la frecuencia cardíaca entre los grupos.

Estudios histopatológicos

La COT a la dosis de 8 mg/kg/día produjo vasculitis con perivascularitis arteriolo-capilar e infiltrados inflamatorios de tipo crónico en pulmón

y riñón. El efecto fue dependiente de la dosis. El grupo COT 12 mostró numerosas dilataciones capilares e infiltrado celular en pulmón. En las células miocárdicas, pulmonares y renales se observó daño celular permanente. Las células endoteliales del tejido se mostraron hiperplásicas con vacuolización citoplasmática y congestión.

Conclusiones parciales

El método de HPLC desarrollado para cuantificar COT plasmática fue preciso, específico, consistente y confiable.

La concentración máxima de COT plasmática en las ratas fue alcanzada a los 60 minutos, se mantuvo constante entre las 3 - 6 horas y el $t_{1/2}$ fue de 5,9 hs.

La COT no estaría involucrada en el descenso del peso corporal de las ratas.

El modelo experimental utilizado resultó efectivo para estudiar el síndrome de retirada de la NI y de la COT, para lograr importantes niveles plasmáticos de COT y adecuado para estudiar las alteraciones de la vasculatura

La COT participaría en el síndrome de retirada nicotínica de modos diferentes: atenuando, empeorando o no alterando sus efectos. Podría ser la responsable del aumento de los niveles de glucosa plasmática observado en

ratas y el mismo fue dependiente de la dosis

Conclusiones finales

La COT aumentaría la glucemia por estímulo sobre la médula suprarrenal con el consecuente aumento plasmático de catecolaminas detectado a través del AVM urinario.

La hiperglucemia sería la responsable de la injuria sobre las células endoteliales pues se demostró experimentalmente que los niveles de glucosa aumentados alteran la homeostasis de la pared vascular.

En respuesta a la hipótesis de trabajo y en base a los datos experimentales obtenidos en este modelo el comportamiento de la NI y la COT es diferente. La COT modularía alguno de los efectos de la NI en especial a altas dosis y podría estar involucrada o ser responsable de algunos de los efectos adversos atribuidos a la NI.

Este conocimiento implica un adelanto y plantea la necesidad de ampliar la investigación en el tema.

Tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires

Directora: Dra. Clara M. López

Co-Director: Dr. Juan C. Perazzo Rossini

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 0327-9286) es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina. Integra, desde el año 2007, 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 los 1000 caracteres.

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 cam-

bios 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 procesador 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 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 de 10 puntos y en un sólo 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 y col. 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 y col. 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.* 2002;347(4):284-287.

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.htmArticle>

- 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.

INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 0327-9286) 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) since 2007. 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 characters.

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 to: 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. Keywords must be headed by capital letters and separated by semicolons.

Introduction. It should include updated background references and clearly stated study goals.

Materials and methods. This section 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 formats: 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.* 2002;347(4):284-7.
2. Books and monographs.
Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. *Medical microbiology.* 4th ed. St. Louis: Mosby, 2002.
3. Book chapters.
Meltzer P.S., Kallioniemi A., Trent J.M.

Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein 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* [on line]. 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 On line 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.

INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 0327-9286) é o órgão oficial de difusão científica da Associação Toxicológica Argentina. Engloba o Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas, tem acesso a artigos e textos completos através da 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 da 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 tenham em suas características 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.

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.

As revisões ou atualizações compreendem 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.

Acta Toxicológica Argentina (em adiante *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 Comitê opte por rejeitar, aceitar com alterações ou aceitar para publicação o trabalho submetido à sua consideração. A identidade dos autores e

revisores será mantida de forma confidencial.

Envio de trabalhos

Os trabalhos podem ser enviados por via eletrônica à: 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 detalhadas abaixo. Junto com o envio do trabalho deverá ser enviada 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 tenha 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 se houve ou não conflito de interesses. Se houver financiamento externo, deverá deixar clara 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 do artigo ser publicado, todos os autores cedem os direitos de autor à *Acta*.

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

Aspectos gerais na preparação do trabalho como artigo original:

Os trabalhos devem ser digitados em 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 deverão ser numeradas desde a capa. As letras em **negrito** ou *itálico* serão usadas somente quando corresponder.

Na primeira página deverá estar indicado: título do trabalho (maiúscula), nomes e sobre-

nomes completos de todos os autores; lugar de trabalho (nome da instituição e endereço postal), se houver autores com distintos lugares de trabalho, deverão ser colocados super-índices numéricos, não 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 super-índice 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 estar separadas por ponto-e-vírgula.

Introdução. Deve incluir antecedentes atualizados sobre o tema em questão e objetivos do trabalho definidos com clareza.

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 Investigação que aprovou o estudo e que foi realizado com o consentimento escrito dos pacientes. Em todos os estudos com organismos não humanos, devem estar especificadas as linhas éticas com respeito ao manejo dos mesmos durante a realização do trabalho.

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

Resultados. Deverão ser apresentados através de **uma** das seguintes formas: no texto, ou através de tabelas e/ou figura/s. Deverão ser evitadas repetições e serão destacados somente dados importantes. Deverá ser deixada para a seção Discussão a interpretação mais extensa.

As **tabelas** deverão ser apresentadas em folha à parte, numeradas consecutivamente com números arábicos, com as **aclarações** correspondentes. Os avisos para esclarecimentos de rodapé deverão ser realizados empregando

números arábicos entre parênteses e super-índice. Somente as bordas externas da primeira e última linhas e a separação entre os títulos das colunas e os dados deverão ser marcados com linha contínua. Não marcar as bordas das colunas. Assegurar-se de que cada tabela seja citada no texto.

As **figuras** deverão ser apresentadas em folhas à parte, numeradas consecutivamente com números arábicos. Os desenhos deverão estar em condições que assegurem uma adequada repetição. Os gráficos de barras, tortas ou estatísticas deverão estar no formato GIF. Os números, letras e sinais deverão ter dimensões adequadas para serem legíveis quando forem impressas. As referências dos símbolos utilizados nas figuras deverão ser incluídas no texto da legenda.

As **fotografias** deverão ser feitas em branco e preto, com contraste, em papel brilhante e com qualidade suficiente (mínimo 300 dpi) para assegurar uma boa reprodução. Nos desenhos originais ou fotografias deverão constar, no verso, os nomes dos autores e número de ordem escritos com lápis.

As fotos para versão eletrônica deverão ser realizadas em formato JPEG ou TIFF, com alta resolução. Tanto as figuras quanto as fotografias deverão ser legíveis. O tamanho mínimo deverá ser de média 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 deverão ser apresentadas exclusivamente em folha à parte, ordenadas e numeradas, e deverão expressar especificamente o que mostra a figura.

Abreviaturas. Serão utilizadas unicamente abreviaturas normalizadas. Deverão ser evitadas as abreviaturas no título e no resumo. Quando no texto se empregar pela primeira vez uma abreviatura, esta deverá ir precedida do termo completo, com exceção se tratar-se de uma unidade de medida comum.

Unidades de medida. As medidas de longitude, tamanho, peso e volume deverão ser expressas em unidades métricas (metro, quilograma, litro) ou seus múltiplos decimais. As temperaturas serão expressas em graus Celsius e as pressões arteriais em milímetros de mercúrio. Todos os valores de parâmetros hematológicos e bioquímicos deverão ser apresentados em unidades do sistema métrico decimal, de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI). Não obstante, os editores poderão 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 referência prioritária as normas da IUPAC. Os organismos serão denominados conforme as normas internacionais, indicando sem abreviaturas o gênero e a espécie em itálico.

Discussão. Terá ênfase sobre os aspectos mais importantes e inovadores do estudo, e serão interpretados dados experimentais em relação com o que já foi publicado. Serão indicadas as conclusões, evitando reiterar dados e conceitos já citados em seções anteriores.

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

Bibliografia. As citações bibliográficas deverão 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 mais antiga à mais atual. No caso de mais de dois autores, serão 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 um consenso geral, seria desejável que a ingestão total de cafeína durante a gravidez supere 300 mg/dia (Organization of Teratology Information Specialists (OTIS) 2001; Kaiser y Allen 2002; Nawrot *et al.* 2003)”.

As referências bibliográficas completas serão 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 padrão em publicação periódica

Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected pa-

tients. N Engl J Med. 2002;347(4):284-287.

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 [on-line]. 2002 Jun. [consulta 12 de Agosto 2002];102(6):[1 p.]. Disponível em: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htmArticle>.

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

c. Parte de uma página de internet American Medical Association [on-line]. 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 correta citação de possíveis referências bibliográficas que puderam não estar 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.