

ISSN 0327-9286

Acta
Toxicológica
Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 19
N° 2
Diciembre 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

Marta A. Carballo

Vicepresidente

Adriana S. Ridolfi

Tesorero

María L. Oneto

Secretario

Gerardo D. Castro

Vocales

Marcela M. López Nigro

Patricia N. Quiroga

Mónica C. Napolia

Vocales Suplentes

Gabriela Fiorenza

María C. Travella

Marta D. Mudry

Comité Científico

Nelson Albiano

José A. Castro

Lucrecia Ferrari

Mirtha Nassetta

Marta M. Salseduc

Organo de Fiscalización

Viviana V. Crapanzano

Mirta E. Ryczel

Claudia V. Vassena

Tribunal de Honor

Susana I. García

Irma Giolito

Augusto Piazza

Acta Toxicológica Argentina

Director

Adolfo R. de Roodt *INPB, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"; 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)

Envenenamiento de <i>Chelydra serpentina</i> (Reptilia: Testudines) por <i>Tityus trivittatus</i> (Scorpionida: Buthidae) <i>de Roodt, Adolfo R; Regner, Pablo I.; Costa de Oliveira, Vanessa; Laskowicz, Rodrigo D.; Lanari, Laura C.</i>	55
El estrés oxidativo como mecanismo de acción del plomo. Implicancias terapéuticas <i>Martínez, Samanta Andrea; Cancela, Liliana Marina; Virgolini, Miriam Beatriz</i>	61
Bromadiolona: un caso judicial relacionado con la muerte de abejas <i>Salinas, Guillermo Pablo</i>	80
Resúmenes de tesis	
Evaluación del potencial tóxico del proteinato débil de plata <i>Quiroga, Patricia N.</i>	85
Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce <i>Vera, María Solange</i>	87
Agradecimientos a revisores 2009-2011	89
Índice de autores 2008-2011	90
Índice de temas 2008-2011	93
Instrucciones para los autores	95

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

Envenenamiento de *Chelydra serpentina* (Reptilia: Testudines) por *Tityus trivittatus* (Scorpionida: Buthidae)
Envenomation of *Chelydra serpentina* (Reptilia: Testudines) by *Tityus trivittatus* (Scorpionida: Buthidae)

de Roodt, Adolfo R.^{1,2*}; Regner, Pablo I.^{1,2}; Costa de Oliveira, Vanessa^{1,2}; Laskowicz, Rodrigo D.²; Lanari, Laura C.²

¹Laboratorio de Toxinopatología, Centro de Patología Experimental y Aplicada, Facultad de Medicina, UBA. Uriburu 950, 5° Piso, C1114AAD, CABA, Argentina. Tel. 4508-3602.

²Área de Investigación y Desarrollo, INPB-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Av. Vélez Sarsfield 563, CP 1281, CABA, Argentina. Tel. 4301-2888.

*aderoodt@gmail.com

Recibido: 17 de septiembre de 2011

Aceptado: 18 de noviembre de 2011

Resumen. Se describe el caso de un ejemplar de tortuga mordedora (*Chelydra serpentina*) que fue hallada con los miembros tetanizados en extensión, midriasis y poca respuesta a estímulos externos, en cuyo recinto se encontró un ejemplar de escorpión *Tityus trivittatus*. Ante el claro cuadro de envenenamiento, se trató al quelonio con antiveneno escorpiónico específico retornando a un estado de relajación muscular a las seis horas y encontrándose totalmente normal a las 24 horas sin mostrar secuelas posteriores. Este es el primer comunicado sobre el envenenamiento de quelonios por escorpiones. Se discuten algunos aspectos de este envenenamiento escorpiónico y su tratamiento con antiveneno específico.

Palabras clave: Tortuga; Escorpión; *Tityus trivittatus*; Toxicidad.

Abstract. We report the case of a snapping turtle (*Chelydra serpentina*) found tetanized, with the limbs in extension, mydriasis and poor response to external stimuli, in whose terrarium was found a *Tityus trivittatus* scorpion. Based on the clear clinical picture of envenoming, the turtle was treated with a specific scorpion antivenin, returning to a state of muscle relaxation after six hours of treatment and it was found totally normal at 24 hours, without envenoming sequelae. This is the first report on turtle envenomation by scorpion. The scorpion envenomation in reptiles and the treatment with specific antivenom is discussed.

Key words: Turtle; Scorpion; *Tityus trivittatus*; Toxicity.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las 1500-2000 especies de escorpiones que se estima que existen en el mundo, solo cerca de 30 han demostrado toxicidad para humanos (Bucherl 1971). En Argentina los escorpiones o alacranes están representados por las Familias Bothriuridae y Buthidae con alrededor de 50 especies verificadas (Acosta 2005; Ojanguren – Affilastro 2005). Si bien todos los escorpiones poseen veneno, los de la Familia Buthidae son los que poseen venenos con componentes tóxicos para mamíferos y, por lo tanto, de importancia médica (Buchler 1971). Los representantes de esta Familia en Argentina pertenecen a los Géneros *Ananteris* (con una sola especie), *Zabius* (con dos especies) y *Tityus* (con seis especies). En este último género se encuentran los escorpiones responsables de envenenamientos graves y muertes de humanos en la Argenti-

na, siendo el principal responsable *Tityus trivittatus* (Figura 1) siguiéndole en importancia *Tityus confluens* (de Roodt y col. 2009; 2010). Sin embargo, a pesar de que su toxicidad está bien definida para el humano, en algunos mamíferos de experimentación y en artrópodos, no existen datos de envenenamientos por estos escorpiones en reptiles.

La tortuga *Chelydra serpentina* ("tortuga mordedora" o "tortuga lagarto"), está distribuida en Norte y Centroamérica y es comercializada en todo el mundo como animal de compañía no convencional o de ornato. Es una tortuga que puede ser muy agresiva y provocar daños por su fuerte y rápida mordedura.

En esta comunicación, describimos el cuadro de envenenamiento sufrido por un ejemplar de *Chelydra serpentina*, emponzoñado por un ejemplar de *Tityus trivittatus*, y su recuperación tras la aplicación del antiveneno específico.



Figura 1. Ejemplar adulto de *Tityus trivittatus*. Obsérvense los pedipalpos (pinzas) delgadas y la presencia en el telson de la apófisis subaculear (apófisis bajo en agujón) característicos de este Género. Obsérvense también en el dorso del animal las tres líneas oscuras paralelas, que le dan su nombre a esta especie. Un ejemplar adulto raramente supera los 60 mm.

DESCRIPCIÓN DEL CASO

El ejemplar de *Chelydra serpentina*, de 14 cm de largo de caparazón, (donado al Serpentario del Instituto Nacional de Producción de Biológicos de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”), habita en una pecera con una gran superficie de agua, donde se alimenta regularmente con ratones lactantes y se mantiene libre de patologías. Durante uno de los controles diarios, el animal fue hallado súbitamente con los miembros en extensión y el cuello en extensión hacia atrás (Figura 2), no presentó respuesta a los estímulos táctiles, sonoros, ni visuales (Figura 3). Al realizarse el examen físico del ejemplar y buscar posibles causas de intoxicación, en su hábitat se encontró un ejemplar de *Tityus trivittatus*.

Dados los signos clínicos compatibles con un envenenamiento escorpiónico, de acuerdo a los signos desarrollados en humanos o animales de experimentación, y descartadas otras posibles causas que pudiesen provocar un cuadro clínico con estas características, se decidió la aplicación del antiveneno específico (Antiveneno Escorpión, Instituto Nacional de Producción de Biológicos, Lote 917, vencimiento 2009). Se aplicó un vial de antiveneno (ampolla de 2 ml) vía intracelómica y se mantuvo al ejemplar en reposo sin agregar otra medicación adicional. El recinto de la tortuga fue modificado *ad hoc*, eliminando la profundidad del agua, dado que el animal envenenado no estaba capacitado para nadar y se lo ais-

ló de estímulos externos sonoros o lumínicos. A las 6 horas posteriores a la aplicación del antiveneno, la contractura muscular era menor y el animal respondía a algunos estímulos externos. A las 24 horas de la aplicación del antiveneno, el diámetro pupilar y el sistema musculo-esquelético del animal retornaron clínicamente a la normalidad y comenzó a comer. Durante los meses posteriores al evento no mostró ninguna alteración clínica, realizándose el último control un año posterior al accidente, donde se encontró completamente normal.



Figura 2. Tortuga (*Chelydra serpentina*) picada por un ejemplar de *Tityus trivittatus*. Obsérvense los miembros en extensión y el aspecto tetaniforme general. La respuesta a los estímulos externos en esta instancia era mínima o ausente.



Figura 3. Dilatación pupilar del ejemplar de *Chelydra serpentina* picado por un ejemplar de *Tityus trivittatus*.

DISCUSIÓN

Los venenos de arácnidos poseen componentes tóxicos, que son activos preponderantemente para artrópodos, que constituyen mayoritariamente su dieta. Sin embargo, algunas especies poseen toxinas que pueden producir alteraciones en vertebrados, incluyendo a los reptiles. Lagartijas, pequeñas aves y serpientes pueden ser alimento ocasional de diferentes especies de arañas, siendo esto más conocido entre las mygalomorphas (vulgarmente llamadas “pollito” en Argentina) como las *Grammostola sp.*, entre otras. Componentes no del todo bien caracterizados de los venenos de estas arañas, les permiten paralizar entre otros vertebrados a pequeños reptiles, en general escamosos (Squamata) como saurios u ofidios. También ocasionalmente pueden encontrarse pequeños reptiles en las telas de algunas araneomorphas.

Sin embargo, las referencias bibliográficas sobre la toxicidad del veneno de escorpiones en reptiles son escasas o nulas. El Dr. Lourival Possani, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México, comentó a uno de los autores (AdeR) un caso de envenenamiento por picadura de alacrán en un lagarto del género *Heloderma* (*Heloderma suspectum* “monstruo de gila”). Este ejemplar fue picado por un escorpión del género *Centruroides*, responsable del envenenamiento de humanos en América del Norte, América Central y en el norte de América del Sur (Colombia). En el caso referido previamente, el personal del zoológico observó signos de envenenamiento por escorpión en el monstruo de gila. Ante la habitualidad de los envenenamientos humanos por alacranes en México (Possani y col. 2000; Possani y Rodríguez de la Vega 2006), no dudaron en aplicarle un vial de antiveneno antialacrán (Alacramyn^{NR}, Instituto Bioclón S.A. de C.V., México DF), remitiendo el cuadro a las pocas horas. A excepción de esta comunicación y del caso descrito en la presente comunicación, en un ejemplar de *Chelydra serpentina*, no conocemos otros cuadros de envenenamiento por escorpión en reptiles. Los escorpiones inoculan su veneno mediante la introducción del acúleo (“aguijón”) en el tejido de sus presas o atacantes. Éste se encuentra en el extremo del metasoma (“cola”) tras el último segmento abdominal, en una vesícula (telson) que contiene las glándulas productoras de veneno y con las cuales se conecta. La perforación del tegumento de la presa (o

el agresor), no es sencilla, el escorpión debe buscar puntos débiles en el cuerpo de los mismos para poder allí introducir el acúleo e inyectar el veneno. Esto es fácilmente observable al ver a escorpiones capturando presas grandes, a las que necesariamente debe inyectarles veneno para paralizarlas antes de ingerirlas. Estas tortugas son voraces y agresivas y probablemente el ejemplar que presentó el cuadro de envenenamiento intentó capturar al escorpión, dándole a éste la oportunidad de perforar la mucosa bucal o la piel del cuello de la tortuga e inyectarle veneno. Independientemente de la imposibilidad de atravesar el caparazón, la mayor parte de la superficie cutánea de las tortugas jóvenes o adultas, hace poco probable que un escorpión de las características físicas de *Tityus trivittatus* pueda atravesarla con su aguijón en condiciones normales.

El veneno de los escorpiones del Género *Tityus* posee decenas de péptidos neurotóxicos dirigidos a diferentes estructuras, siendo los más estudiados aquellos que bloquean canales de potasio y los que modulan canales de sodio (Becerril y col. 1996). Las toxinas de mayor importancia para los mamíferos son las moduladoras de canales de sodio (Possani y col. 1999). Éstas actúan a diferentes niveles, provocando un cuadro clínico muy variado cuya característica conspicua reside en la desregulación del sistema nervioso autónomo, presentando los envenenados una signología variada que puede ser adrenérgica, colinérgica o mixta, causante de la denominada “tormenta autonómica” observada en estos envenenamientos. Una vez instalado el cuadro de pérdida de la regulación autonómica, el paciente rápida y progresivamente va deteriorándose, produciéndose la muerte en general por falla cardíaca y/o por un síndrome de insuficiencia respiratoria pulmonar aguda (síndrome de “distrés” respiratorio) (Ministerio de Saúde 1999; Cupo y col. 2003; Ministerio de Salud 2011). La tortuga presentó signos compatibles con estimulación colinérgica, como algunos de los descritos en reptiles envenenados con organofosforados (Fitzgerald y col. 2008) tales como la tetania y el opistótono (*Figura 2*), así como signos adrenérgicos, manifestados por la intensa midriasis que presentaba el animal (*Figura 3*).

Experimentalmente, ratones inoculados con el veneno de *Tityus sp.*, muestran trastornos músculo-esqueléticos como tetania y movimientos

de extremidades, los que también observamos en el envenenamiento experimental por *T. trivittatus* (de Roodt y col. 2001; 2010) (Figura 4). Este compromiso músculo-esquelético no es muy común en humanos picados por *Tityus sp.* de la Argentina (de Roodt y col. 2003) pero sí en pacientes picados por ejemplares de *Centruroides sp.* (Lo Vecchio y McBride 2003; Boyer y col. 2009). La parálisis y la signología con compromiso neuromuscular que presentó la *Chelydra*, recuerdan a los signos que pueden presentarse en ratones (Figuras 2 y 4) durante el envenenamiento experimental con dosis altas de veneno de *Tityus trivittatus* (de Roodt y col. 2001; 2010). El compromiso músculo-esquelético en estos casos podría residir en motivos inherentes a la dosis de veneno inoculado o a diferencias en cuanto a los péptidos neurotóxicos que poseen los venenos de *Tityus sp.* y *Centruroides sp.* (Possani y col. 1985; Becerril y col. 1997; Valdez-Cruz y col. 2004). Si bien no existen datos al respecto, no podría descartarse una sensibilidad diferencial para las toxinas de estos escorpiones de los canales iónicos relacionados con las uniones mioneurales en estos reptiles. En una misma especie de roedores, se han detectado diferencias en cuanto a la sensibilidad al veneno de escorpiones muy emparentados (Rowe y Rowe 2008), por lo que una sensibilidad diferencial a un mismo veneno en diferentes especies, no sería una posibilidad descabellada.

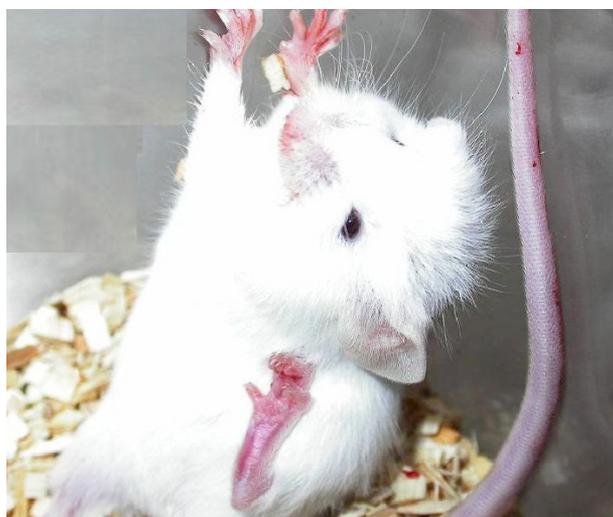


Figura 4. Ratón inoculado experimentalmente con veneno de *Tityus*. Obsérvese el compromiso músculo-esquelético tras el envenenamiento.

Foto gentileza del Dr. Alejandro Alagón del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México.

La aplicación del antiveneno escorpiónico debe hacerse muy rápido para evitar que las toxinas se unan a sus dianas en los tejidos. De otra forma, estas se unirán a los diferentes canales iónicos modificando su funcionamiento y causando alteraciones sistémicas, en especial autonómicas tanto colinérgicas como adrenérgicas. Se estima que el tiempo conveniente para aplicar el antiveneno no debería ser mayor a dos horas (Ministerio de Salud 2011). Tras ese tiempo si bien el antiveneno igualmente neutralizará al veneno circulante, sería muy lento para actuar sobre el que ya se fijó. Se ha sugerido que la utilidad terapéutica del antiveneno aplicado en períodos de tiempo superiores a las dos horas no es conveniente, debido a la rápida difusión de las toxinas y la instauración del cuadro de envenenamiento (Ministerio de Saúde 1999; Cupo y col. 2003; de Roodt y col. 2003; Sevcik y col. 2004; Vázquez y col. 2005; de Roodt y col. 2009; Ministerio de Salud 2011). No existen datos sobre la toxicidad de este tipo de venenos en reptiles en general o quelonios en particular. Tampoco sabemos si los quelonios son mayoritariamente sensibles a las toxinas de canales de sodio o a aquellas dirigidas contra canales de potasio (muy abundantes en estos venenos y poco tóxicas para mamíferos) o si las toxinas dirigidas contra canales de cloro o calcio (presentes en estos venenos pero menos estudiadas pueden tener algún efecto tóxico sobre reptiles. Sin embargo, independientemente de la falta de conocimiento sobre estos temas, los datos presentados en este caso, indicarían la sensibilidad de estos quelonios a las toxinas del veneno de *Tityus trivittatus* y la efectividad del antiveneno específico para neutralizar el efecto causado por las mismas.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Acosta L.E. Escorpiones: Escorpiones o alacranes. En: Salomon O.D., editor. Artrópodos de Interés Médico en la Argentina. Buenos Aires: Fundación Mundo Sano Eds; 2005. p. 21-27.

Becerril B., Marangoni S., Possani L.D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. *Toxicon*. 1997; 35: 821-835.

Boyer L.V., Theodorou A.A., Berg R.A., Mallie J., Arizona Envenomations Investigators, Chávez-Mendez A., García-Ubellohde W., Hardiman S., Alagón A. Antivenom for Critically

Ill Children with Neurotoxicity from Scorpion Stings. N Engl J Med. 2009;360:2090-2098.

Bucherl W. Classification, biology and venom extraction of scorpions. En: Bucherl, W., Buckley, E., editores. Venomous animals and their venoms. Venomous invertebrates, vol. III. New York: Academic Press; 1971. p. 317-347.

Cupo P., Azevedo-Marquez M., Hering S.E. Escorpionismo. En: Costa Cardoso J.L., Siqueira Franca F.O., Fan Hui Wen, Sant'Ana Málaque C.M., Haddad V. Jr. Editores. Animais peconhentos no Brasil. Biología, clínica e terapêutica dos acidentes. Sao Paulo: Sarvier – Fapesp, 2003. p. 198-208.

de Roodt A.R. Estudio del veneno de algunos escorpiones de importancia médica de la Argentina. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de San Martín, 2009.

de Roodt A.R., Coronas F.I.V., Lago N., Gonzalez M.E., Laskowicz R.D., Beltramino J.C., Saavedra S., López R.A., Reati G., Vucharchuc M.G., Bazán E., Varni L., Salomon O.D., Possani L.D. General, biochemical and immunological characterization of the venom from the scorpion *Tityus trivittatus* of Argentina. Toxicon. 2010;55 (2-3):307-319.

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(8):971-977.

de Roodt A.R., Gimeno E., Portiansky E., Varni L., Dolab J.A., Segre L., Litwin S., Vidal J.C. A study on the experimental envenomation in mice with the venom of *Tityus trivittatus* Kraepelin 1898 (Scorpiones, Buthidae) captured in Argentina. Journal of Natural Toxins. 2001;10(2):99-109.

de Roodt A.R., Lago N.R., Salomón O.D., Laskowicz R.D., Neder de Román L.E., López R.A., Montero T.E., Vega V. del V. A new venomous scorpion responsible for severe envenomation in Argentina: *Tityus confluens*. Toxicon. 2009;53(1):1-8.

Fitzgerald K.T., Kristin L. Newquist K.L. Poisonings in Reptiles. Vet Clin Exot Anim. 2008;11:327-357.

LoVecchio F., McBride C. Scorpion envenomations in young children in Central Arizona. Journal of Toxicology Clinical Toxicology. 2003;41(7):937-940.

Ministerio de Salud. Guía de Prevención, Diagnóstico, Tratamiento y Vigilancia Epidemiológica del Envenenamiento por Escorpiones, Edición 2011. Ministerio de Salud de la Nación. Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones. 40 p.

Ministerio de Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peconhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1999.

Ojanguren-Affilastro A.A. Estudio monográfico de los escorpiones de la República Argentina. Revista Ibérica de Aracnología. 2005;11:75-241.

Possani L.D., Becerril B., Delepierre M., Tytgat J. Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. Eur J Biochem. 1999;264(2):287-300.

Possani L.D., Martin B.M., Svendsen I., Rode G.S., Erikson B.M. Biochem. J. Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. Biochimie. 1985;229:739-750.

Possani L.D., Merino E., Corona M., Bolivar F., Becerril B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. Biochimie. 2000;82(9-10):861-868.

Possani L.D., Rodríguez de la Vega R.C. Scorpion Venom Peptides. En: A.J. Kastin editor. Handbook of Biologically Active Peptides. Londres: Elsevier; 2006. p. 339-354.

Rowe A.H., Rowe M.P. Physiological resistance of grasshopper mice (*Onychomys spp.*) to Arizona bark scorpion (*Centruroides exilicauda*) venom. Toxicon. 2008;52: 597-605.

Sevcik C., D'Suze G., Díaz P., Salazar V., Hidalgo C., Azpúrua H, Bracho N. Modelling *Tityus* scorpion venom and antivenom pharmacokinetics. Evidence of active immunoglobulin G's F(ab)₂ extrusion mechanism from blood to tissues. Toxicon. 2004;44:731-741.

Valdez-Cruz N.A., Dávila S., Licea A., Corona M., Zamudio F.Z., García-Valdes J., Boyer L., Possani L.D. *Biochimie*. 2004;86(6):387-396.

Vázquez H., Chávez-Haro A., García-Ubbelohde W., Mancilla-Nava R., Paniagua-Solís J., Alagón A., Sevcik C. Pharmacokinetics of a F(ab)₂ scorpion antivenom in healthy human volunteers. *Toxicon*. 2005.46:797-805.

El estrés oxidativo como mecanismo de acción del plomo. Implicancias terapéuticas

Oxidative stress as a mechanism of action of lead. Therapeutic implications

Martínez, Samanta Andrea; Cancela, Liliana Marina; Virgolini, Miriam Beatriz*

IFEC-CONICET. Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Haya de La Torre y Medina Allende. CP: 5016. TEL: +54-351 4334437. Córdoba, Argentina.

*Autor responsable: TEL: +54-351 4334437. FAX: +54-351 4334420.

mvirgoli@fcq.unc.edu.ar

Recibido: 7 de junio de 2011

Aceptado: 24 de agosto de 2011

Resumen. El plomo (Pb) es un metal no esencial altamente tóxico que afecta a diversos órganos y tejidos. Si bien aún no ha sido descrito un mecanismo único mediante el cual este metal ejerce sus efectos tóxicos, un gran número de estudios han puesto en evidencia el rol fundamental del estrés oxidativo en la intoxicación por Pb. A este respecto, ha sido informado que en la intoxicación por Pb el estrés oxidativo puede ocurrir a diferentes niveles: por generación de ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA), por la capacidad *per se* que posee el Pb para inducir peroxidación lipídica en presencia de ión ferroso (Fe^{2+}), o por depleción de glutatión (GSH) y enzimas antioxidantes. Sobre la base de estos antecedentes, el objetivo de esta revisión es presentar evidencias recientes sobre la implicancia del estrés oxidativo en los efectos adversos ocasionados por Pb, destacar la posibilidad de utilización de biomarcadores de estrés oxidativo como un método complementario al diagnóstico temprano de exposición y revelar la importancia de los compuestos antioxidantes como nuevas herramientas en la prevención y tratamiento de la intoxicación por este metal.

Palabras claves: Intoxicación con plomo; Estrés oxidativo; Biomarcadores; Antioxidantes.

Abstract. Lead (Pb) is a highly toxic non-essential metal that affects different organs and tissues. Although at the present a unique mechanism by which this metal exerts its toxic effects has not been described, a large number of studies have highlighted the fundamental role of oxidative stress in the pathophysiology of Pb poisoning. In this regard, it has been reported that Pb-induced oxidative stress can occur at different levels: by the generation of δ -aminolevulinic acid (δ -ALA), through its ability to induce lipid peroxidation in the presence of ferrous ion (Fe^{2+}), or via glutathione (GSH) or antioxidant enzyme depletion. On the basis of these antecedents, the aim of this review is to present recent evidence regarding the implication of oxidative stress in the adverse effects caused by Pb, to emphasize the possibility to use oxidative stress biomarkers as a complementary method for early detection of Pb exposure, and to reveal the importance of antioxidant compounds as novel tools in the prevention and treatment of Pb exposure.

Keywords: Lead poisoning; Oxidative stress; Biomarkers; Antioxidants.

INTRODUCCIÓN

El plomo (Pb) es un metal tóxico ubicuo en el ambiente, ampliamente utilizado en el pasado principalmente como aditivo en pinturas y en combustibles, además de otras aplicaciones industriales en cañerías, baterías, juguetes, artículos escolares, cerámicos vidriados e imprentas (ATSDR 2007). Es un elemento no esencial para el ser humano y capaz de inducir alteraciones en diversos sistemas del organismo, tales como los sistemas nervioso, renal, circulatorio, inmunológico, reproductivo y hematopoyético. La detección de alteraciones en este último sistema contribuye al diagnóstico

de exposición (Souza y Tavares 2009). Sólo un porcentaje del total del Pb ingerido por vía gastrointestinal es absorbido (entre el 10 y 15% en adultos, el 50% en niños) (Markowitz 2000). Una vez que ingresa al torrente sanguíneo, el 95% del Pb se acumula dentro de los eritrocitos durante aproximadamente 30 días (Patrick 2006a), donde interfiere en la síntesis del grupo hemo dada su capacidad de alterar la actividad de algunas enzimas que forman parte de esta vía metabólica, como las enzimas ácido δ -aminolevulínico sintetasa (δ -ALAS), ácido δ -aminolevulínico dehidratasa (δ -ALAD) y ferroquelatasa (Needleman 2004). Como

resultado, los niveles de hemo en el organismo disminuyen ocasionando anemia, la cual va acompañada de alteraciones en los niveles sanguíneos de varios parámetros involucrados en esta vía de síntesis. Estas alteraciones han sido extensamente utilizadas como indicadores de intoxicación por este metal (Sakai y Morita 1996; Balparda 2008).

Por otra parte, en el organismo ocurren procesos fisiológicos o patológicos que dan lugar a la formación de radicales libres, especies de alta reactividad química con capacidad para reaccionar con biomoléculas, alterando la funcionalidad celular. En condiciones normales los mecanismos antioxidantes mantienen los niveles de estas moléculas reactivas en niveles fisiológicos, existiendo así un equilibrio entre los procesos que generan radicales libres y aquellos encargados de su eliminación; un desbalance en este equilibrio, es lo que se conoce como estrés oxidativo (Nordberg y Arnér 2001; Trachootham y col. 2008).

Si bien existen varias hipótesis para explicar los mecanismos de toxicidad del Pb, no se ha definido hasta el momento un mecanismo único. Se sabe que este metal es capaz de promover la generación de especies reactivas del oxígeno (EROs), y de afectar enzimas antioxidantes como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), entre otras. Sumado a evidencias recientes que señalan a los parámetros hematológicos como biomarcadores poco específicos de intoxicación por Pb (Ahamed y col. 2006; Ahamed y Siddiqui 2007; Cabaravdic y col. 2010; Wang y col. 2010), las alteraciones de estas enzimas y otras moléculas implicadas en los mecanismos de defensa antioxidante del organismo son consideradas posibles marcadores de daño biológico inducido por este metal, y la terapia antioxidante un posible tratamiento utilizado en pacientes con altos niveles de Pb en sangre (PbS) (Patrick 2006b).

El objetivo de esta revisión es presentar evidencias recientes que abordan los efectos tóxicos producidos por Pb como consecuencia de su capacidad de alterar el sistema de óxido-reducción celular y demostrar así la relevancia de este mecanismo en el estudio e implementación de tratamientos más efectivos contra el daño producido por este metal.

1. SISTEMA ANTIOXIDANTE Y ESTRÉS OXIDATIVO

El sistema antioxidante es el encargado de la remoción de las especies reactivas o radicales libres generados en el organismo como consecuencia de procesos fisiológicos o patológicos. Dado que la producción excesiva de estas moléculas puede inducir muerte celular, un adecuado balance entre los sistemas oxidante y antioxidante es vital para la función, regulación y adaptación de las células a diversas condiciones (Nordberg y Arnér 2001). Así, desde el punto de vista fisiológico, las células mantienen un equilibrio entre los procesos que dan lugar a la formación y eliminación de EROs y especies reactivas del nitrógeno (ERNs) (Trachootham y col. 2008). La alteración de este equilibrio se conoce como estrés oxidativo, condición bajo la cual, la función celular es extensamente afectada como consecuencia de las alteraciones en proteínas (Stadtman y Levine 2000), lípidos (Yla-Herttuala 1999) y ADN (Marnett 2000; Xu y col. 2008).

1.1. Especies reactivas del oxígeno

Las EROs se producen a partir del metabolismo celular normal o como consecuencia de la exposición a xenobióticos (Findlay y col. 2005). La mitocondria es la mayor fuente intracelular de EROs (Turrens 2003), las cuales a niveles fisiológicos se comportan como mensajeros de óxido-reducción en cascadas de señalización intracelular, mientras que a niveles elevados inducen modificaciones de macromoléculas afectando la funcionalidad celular o promoviendo apoptosis (Roberts y col. 2009; Circu y Aw 2010). Estas especies comprenden a varias moléculas químicamente reactivas derivadas del oxígeno (O_2), como son el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El $\cdot OH$ se forma a partir de H_2O_2 a través de una reacción que requiere ión ferroso (Fe^{2+}) ó cuproso (Cu^+) (reacción de Fenton o de Haber-Weiss) (Kehrer 2000) y es, probablemente, la molécula con mayor capacidad de generar daño en los sistemas biológicos en relación con otras EROs (Betteridge 2000). El $O_2^{\cdot -}$ se forma de manera espontánea a partir de O_2 principalmente en las cercanías de la membrana interna mitocondrial, sitio de la cadena respiratoria (Nordberg y Arnér 2001), también puede generarse por flavoenzimas (Zimmerman y Granger 1994), por acción de la óxido nítrico sintetasa en situaciones donde las

cantidades de su sustrato o co-factor son insuficientes (Xia y col. 1996; Xia y Zweier 1997) o por otras enzimas como lipooxigenasa (Kontos y col. 1985) y ciclooxigenasa (McIntyre y col. 1999). Una vez formadas, dos moléculas de $O_2^{\bullet-}$ pueden ser dismutadas a H_2O_2 y O_2 mediante una reacción catalizada por la enzima SOD. El H_2O_2 , si bien no es un radical libre, juega un rol fundamental como intermediario en la formación de la mayoría de las EROs y como mensajero intracelular afectando a diversos procesos celulares (Choi y col. 1998).

1.2. Principales componentes del sistema antioxidante

El sistema antioxidante puede ser dividido en dos grandes grupos: enzimático y no enzimático.

1.2.1 El sistema antioxidante enzimático está principalmente conformado por SOD, CAT, GPx y peroxiredoxinas (Prx's)

SOD

Es la enzima que cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ dando lugar a la formación de H_2O_2 y O_2 , siendo esta reacción una fuente de H_2O_2 (Fridovich 1995). La SOD está presente en el organismo en tres isoformas: Cu/Zn-SOD (SOD1) de localización citosólica, Cu/Zn-SOD extracelular (SOD3), y Mn-SOD (SOD2) presente en mitocondria (Faraci y Didion 2004), organela donde esta enzima es generada en altas concentraciones. Una vez producido, el H_2O_2 es removido por un sistema antioxidante conformado por CAT, GPx y Prx's.

CAT

Es una enzima con localización predominante en peroxisomas de células de mamíferos donde, unida a β -Nicotinamida adenina dinucleótido 2'fosfato reducido (NADPH), que la protege de la inactivación y aumenta su eficiencia, cataliza la dismutación del H_2O_2 a agua (H_2O) y O_2 . Cumple también la función de detoxificar otros sustratos como fenoles y alcoholes mediante una vía de reducción acoplada a H_2O_2 y se le ha atribuido un rol antioxidante de gran importancia, pues al disminuir el nivel de H_2O_2 disminuye también el riesgo de formación de $\bullet OH$ mediante la reacción de Fenton.

GPx

Es una enzima seleno-dependiente de la cual han sido caracterizadas cinco isoformas en humanos (Brigelius-Flohé 2006): GPx1 y GPx4, ambas citosólicas abundan en la mayoría de los tejidos; GPx2 se expresa mayormente en

el tracto gastrointestinal; GPx3 es plasmática y GPx6 está localizada preferentemente en la mucosa olfatoria y tejido embrionario. Todas pueden catalizar la reducción de H_2O_2 utilizando glutatión (GSH) como sustrato, como así también, generar la reducción de otros peróxidos y alcoholes (Ryan-Harshman y Aldoori 2005; Muller y col. 2007). Existen evidencias que indican que GPx sería importante desde el punto de vista antioxidante bajo condiciones fisiológicas, donde el ciclo de óxido-reducción del GSH es la mayor fuente de protección contra bajos niveles de EROs, mientras que otras enzimas como CAT, se vuelven más importantes en la protección contra eventos severos de estrés oxidativo (Yan y Harding 1997). Asimismo, estudios realizados en diversos tipos celulares, especialmente en eritrocitos, han demostrado que la GPx es la principal enzima antioxidante para H_2O_2 , dada su mayor afinidad hacia esta molécula con respecto a CAT (Izawa y col. 1996).

Prx's

Son un grupo de peroxidasas que también contribuyen con el control de óxido-reducción celular por su habilidad de reducir peróxidos, como H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos (Rhee y col. 2005), función que realizan en conjunto con una tiorredoxina reductasa (TrxR), tiorredoxina (Trx) y NADPH (Nordberg y Arnér 2001; Findlay y col. 2005).

1.2.2. Sistema antioxidante no enzimático

El tripéptido γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glicina o GSH es la molécula antioxidante más importante sintetizada en las células (Forman y col. 2009). Se localiza en el citosol celular donde, además de eliminar radicales libres, cumple funciones vitales como la conservación de grupos tioles de proteínas, la modulación de síntesis de ADN y de procesos relacionados con la función inmune (Lu 2009), la regulación de la homeostasis del óxido nítrico (NO) (Hogg 2002), la modulación de la actividad de proteínas por modificaciones post-transcripcionales (Pompella y col. 2003), la regulación de la división celular (Pallardó y col. 2009) y la modulación de la actividad de receptores de neurotransmisores (Oja y col. 2000). En mitocondria, el GSH es particularmente importante dado que allí no hay actividad de la enzima CAT por lo cual el GSH mitocondrial es considerado una molécula crítica en la defensa contra el estrés oxidativo (García-Ruiz y Fernández-Checa 2006). En el organismo, el GSH

existe en su forma reducida (GSH) y en su forma oxidada (glutación disulfuro, GSSG), siendo la primera la forma biológicamente activa (Kaplowitz y col. 1985). La mayor cantidad de GSH en la defensa antioxidante celular es utilizada por la GPx y por un tipo de peroxiredoxinas (Prx6), las cuales catalizan la reducción de H_2O_2 mediante la oxidación de GSH dando lugar a la formación de H_2O y GSSG. El GSSG es potencialmente tóxico, pero normalmente las células contienen altas concentraciones de GR, la cual mantiene la mayor cantidad de GSH en su forma reducida utilizando NADPH como dador de electrones, formando así un ciclo de óxido-reducción. Por último, si bien el GSH es la molécula antioxidante más importante producida a nivel celular, actualmente ha sido reportada una gran cantidad de compuestos con capacidad antioxidante como las vitaminas C (ácido ascórbico), E (α -tocoferol), A, B6 (piridoxina), el β -caroteno, la metalotioneína, la cistina, la homocisteína, la taurina, la metionina, las poliaminas, los flavonoides, los fitoestrógenos, los polifenoles, el zinc, el selenio, entre otros (Gurer y Ercal 2000; Powell 2000; Patra y col. 2001; Morin y col. 2008; Liu y col 2010; Reckziegel y col. 2011), muchos de ellos de gran aplicación terapéutica contra el estrés oxidativo.

2. ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR PLOMO

La patogénesis de la toxicidad del Pb es multifactorial puesto que interfiere directamente sobre la activación de ciertas enzimas, interrumpe la síntesis de proteínas estructurales, altera la homeostasis del calcio, inhibe por competición la absorción de elementos trazas y altera el sistema de óxido-reducción celular, siendo en la actualidad este último mecanismo el más relacionado con la etiología de las alteraciones observadas en organismos intoxicados por Pb (Patrick 2006b).

A pesar de que es un metal que no sufre reacciones químicas de óxido-reducción en el organismo, tanto el Pb como el As, el Hg y el Cd, tienen en común la capacidad de incrementar la producción de radicales libres y de disminuir la disponibilidad de reservas antioxidantes del organismo, convirtiendo al estrés oxidativo en un componente clave en las consecuencias fisiopatológicas generadas por estos metales (Jomova y Valko 2011).

La generación de estrés oxidativo en la intoxicación por Pb puede ocurrir a diferentes

niveles: por generación de ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA), que constituye una potencial fuente endógena de radicales libres (Hermes-Lima y col. 1991); por la capacidad *per se* que posee el Pb para inducir peroxidación lipídica en presencia de Fe^{2+} (Adonaylo y Oteiza 1999) o por depleción de GSH y enzimas antioxidantes (Patrick 2006b). Un análisis detallado de estos mecanismos se presenta a continuación:

2.1. Efecto pro-oxidante del Pb por generación de δ -ALA

El Pb es un catión divalente con capacidad de unirse a grupos sulfhidrilos (-SH) presentes en proteínas, modificando de esta manera la función de ciertas enzimas y proteínas estructurales. Al respecto, está descrito que el Pb presente dentro de los eritrocitos interfiere en la síntesis del grupo hemo al alterar la actividad de algunas de las enzimas involucradas en este proceso, como la enzima δ -ALAS, encargada de sintetizar δ -ALA a partir de succinil-CoA, la enzima δ -ALAD, que cataliza la condensación de dos moléculas de δ -ALA para generar porfobilinógeno (PBG), y la enzima ferroquelatasa que cataliza la incorporación de hierro a una molécula de protoporfirina IX para generar el grupo hemo (Fujita y col. 2002; Needleman 2004). La inhibición de la actividad de δ -ALAD (la enzima más sensible a los efectos tóxicos del Pb) es el parámetro más comúnmente asociado al aumento de los niveles de PbS como indicador de exposición a este metal (Goering 1993). Más de un 80% del Pb presente en eritrocitos se une a δ -ALAD inhibiendo su actividad, lo cual resulta en un marcado incremento en los niveles sanguíneos y excreción urinaria de δ -ALA, el cual se autooxida dando lugar a la formación de EROs (Bechara 1996; Noriega y col. 2003; Ahamed y Siddiqui 2007; Flora y col. 2007a). El δ -ALA se enoliza y autooxida a pH 7,0 - 8,0 y la forma enólica de δ -ALA es oxidada generando $O_2^{\bullet-}$. Por otra parte, un proceso de oxidación simultánea de δ -ALA y oxihemoglobina promueve la generación de EROs dando lugar a la formación de metahemoglobina, radical δ -ALA y H_2O_2 (Monteiro y col. 1989). De esta manera, niveles elevados de δ -ALA producen peroxidación lipídica e inducen cambios en la permeabilidad mitocondrial mediante procesos mediados por calcio, además de otros efectos como el de promover la liberación de hierro presente en moléculas de ferritina (Bechara 1996). Sumado a estos eventos, ha sido bien

establecida la capacidad de δ -ALA de inducir genotoxicidad, ya sea a través de un mecanismo que involucra $\cdot\text{OH}$ (Douki y col. 1998a) o mediante la formación de ácido 4,5-dioxovalérico, producto final de la oxidación de δ -ALA, sustancia potencialmente genotóxica (Douki y col. 1998b). De este modo, el proceso de oxidación de δ -ALA puede ser considerado un mecanismo indirecto del Pb para producir daño a nivel de ADN responsable, en parte, de la carcinogenicidad de este metal (Hiraku y Kawanishi 1996; Grover y col. 2010). Por último, teniendo en cuenta la capacidad de δ -ALA de generar EROs, se ha sugerido que la evaluación de la actividad de δ -ALAD y de los niveles sanguíneos y urinarios de δ -ALA pueden ser considerados índices de estrés oxidativo generados por Pb (Gurer-Orhan y col. 2004; Ahamed y col. 2006) dado que existen fuertes evidencias que señalan una marcada relación entre los bioindicadores de estrés oxidativo y una disminución en la actividad de la δ -ALAD (Tandon y col. 2002; Gurer-Orhan y col. 2004; Ahamed y col. 2005; 2006) y niveles incrementados de δ -ALA en sangre, orina y tejidos (Bechara 1996; Costa y col. 1997; Wang y col. 2006).

2.2. Peroxidación lipídica inducida por Pb

Ha sido bien establecida la capacidad del Pb de generar peroxidación lipídica en diversos tejidos del organismo (Acharya y Acharya 1997; Bokara y col. 2008; Ergurhan-Ilhan y col. 2008). Los eritrocitos en particular son las células más afectadas, en parte por su alta afinidad por este metal, así como por su mayor vulnerabilidad al daño oxidativo respecto a otras células (Leggett 1993).

El Pb ejerce un efecto desestabilizante en la membrana celular a través de diversos mecanismos. En primer lugar, las alteraciones en la estructura y función de membranas celulares inducidas por Pb están ampliamente relacionadas con un aumento en los niveles de EROs generados como consecuencia de los efectos de este metal sobre el equilibrio de óxido-reducción celular (Ding y col. 2000). Además, el Pb cataliza la peroxidación de ácidos grasos insaturados (Yiin y Lin 1995) e induce daño oxidativo modificando la composición de ácidos grasos en las membranas (Knowles y Donaldson 1990; Lawton y Donaldson 1991), alterando de esta manera la actividad de enzimas unidas a la membrana. Al respecto, Sandhir y col. (1994) observaron una correlación

lineal entre el aumento en la peroxidación lipídica inducida por Pb y una disminución en la actividad de acetilcolinesterasa cerebral. Asimismo, Flora y Seth (2000) observaron alteraciones en la actividad de acetilcolinesterasa y monoaminoxidasa acompañadas de niveles elevados de GSH, calcio intracelular y cambios en la fluidez de membranas celulares en ciertas áreas cerebrales de ratas expuestas a Pb. Kharoubi y col. (2008) evidenciaron una inhibición en la actividad ATPasa en células de hígado y riñón de ratas tratadas con Pb, junto a un incremento en los niveles de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos y sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), éstas últimas indicadoras de peroxidación lipídica.

De este modo, un gran número de evidencias demuestran que el Pb es capaz de incrementar la peroxidación lipídica alterando la integridad, permeabilidad y función de membranas celulares.

2.3. Efectos del Pb en el sistema de defensa antioxidante celular

El Pb, al igual que otros metales, tiene la capacidad de inactivar al GSH, disminuyendo así su función antioxidante. Asimismo, dado que la enzima GR posee en su estructura grupos funcionales $-\text{SH}$, el Pb puede inhibir su actividad reductora sobre el GSSG, lo cual disminuye aún más la disponibilidad de GSH (Patrick 2006b). Se ha observado también una disminución en la actividad de otras enzimas que utilizan GSH como la GPx, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PD) y la glutatión S-transferasa (GST) tanto en animales de experimentación como en individuos ocupacionalmente expuestos a Pb (Hunaiti y col. 1995; Sivaprasad y col. 2004). La capacidad de este metal de alterar la actividad de otras enzimas implicadas en la defensa antioxidante como CAT y SOD también ha sido reportada (Chiba y col. 1996; Han y col. 2005; Bokara y col. 2008).

Cabe destacar que, si bien el Pb puede inhibir la actividad de estas enzimas, el efecto neto observado depende de los niveles de Pb presentes en el organismo. Así, mientras se observa inhibición de actividad de ciertas enzimas a niveles elevados o en situaciones en las que el tiempo de exposición al metal es prolongado, también se ha informado que a bajos niveles de Pb ocurre un incremento en la actividad enzimática. Al respecto, varios autores

demonstraron un aumento en la actividad de CAT a concentraciones elevadas de PbS y una correlación positiva entre estos parámetros en niños, adolescentes (Ahamed y col. 2005; 2006) y trabajadores expuestos al metal (Chiba y col. 1996; Gurer-Orhan y col. 2004), así como también en animales (Gurer y col. 1998; Soltaninejad y col. 2003). Estas observaciones han sido caracterizadas como un mecanismo de defensa en eritrocitos contra el incremento de H_2O_2 durante el estrés oxidativo generado por Pb. Por otra parte, a pesar de que algunos resultados indican una correlación positiva entre niveles de PbS y actividad de SOD (Costa y col. 1997; Soltaninejad y col. 2003; Han y col. 2005), otros no evidencian una clara correlación entre estos parámetros (Chiba y col. 1996; Kasperczyk y col. 2004; Oktem y col. 2004; Ergurhan-Ilhan y col. 2008) e incluso, algunos autores reportan una disminución de la actividad de SOD en plasma y eritrocitos a elevados niveles de PbS (Ito y col. 1985; Li y col. 2004; Patil y col. 2006). Asimismo, Kasperczyk y col. (2004) demostraron una reducción significativa de GPx en sangre que se correlacionó con elevados niveles de malondialdehído (MDA), indicador de peroxidación lipídica, en eritrocitos de trabajadores expuestos a Pb cuyos niveles de PbS superaban los 40 $\mu\text{g}/\text{dl}$; mientras que en aquellos individuos con concentraciones entre 25-40 $\mu\text{g}/\text{dl}$, los niveles de esta enzima se encontraron elevados.

Por otra parte, a pesar de que el Pb puede alterar la función de enzimas antioxidantes incrementando su actividad mediante una generación excesiva de EROs o disminuyéndola por su efecto directo sobre ellas, cabe mencionar la posibilidad de que muchas de estas enzimas podrían ser afectadas por este metal mediante un mecanismo independiente de estrés oxidativo, como fue observado por Daggett y col. (1998), quienes evidenciaron un incremento en los niveles de GST en hígado y riñón de ratas expuestas a Pb como consecuencia de un mecanismo alterado a nivel transcripcional en la síntesis de esta proteína. Por último, si bien se conoce que los iones metálicos son capaces de alterar el sistema de Prx's inhibiendo la actividad de TrxR u oxidando a Trx (Lin y col. 1999; Witte y col. 2005; Hansen y col. 2006), hay escasa información disponible de los efectos del Pb sobre estas enzimas. Conterato y col. (2007) reportaron que este metal afecta la actividad de TrxR en riñón de ratas expuestas, considerando a esta

enzima como un posible indicador temprano de exposición aguda a bajos niveles de Pb.

3. TERAPIA ANTIOXIDANTE

En la actualidad, la estrategia terapéutica más utilizada en la intoxicación por Pb consiste en favorecer su excreción a través de la quelación; siendo el etilendiaminotetraacetato de calcio disódico (CaNa_2EDTA), el ácido meso 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), la D-penicilamina y "british anti-lewisita" (BAL) los agentes quelantes más utilizados (Flora y col. 2007a; 2008). Sin embargo, diversos estudios han reportado efectos adversos sobre la salud como resultado de la aplicación de estos agentes quelantes tradicionales y su incierta eficacia en revertir y/o prevenir los efectos tóxicos de este metal (Gurer y Ercal 2000; Rogan y col. 2001; Soares y col. 2003; Yu y col. 2008). Por estas razones están siendo abordadas nuevas estrategias en el tratamiento de la intoxicación por Pb, en las cuales, elementos esenciales como calcio, zinc, hierro, selenio, ciertas vitaminas y otros compuestos antioxidantes son considerados importantes modificadores de la disponibilidad y toxicidad del Pb (Ahamed y Siddiqui 2007). En base a estas consideraciones, y teniendo en cuenta el rol del estrés oxidativo como mecanismo de acción propuesto para este metal, una gran diversidad de estudios están siendo enfocados en la terapia antioxidante como un método eficiente para contrarrestar los efectos inducidos por Pb, mejorando al mismo tiempo la efectividad de los agentes quelantes actualmente utilizados (Hsu y Guo 2002).

Los compuestos antioxidantes actúan a través de diversos mecanismos con la finalidad de neutralizar radicales libres y disminuir la producción de EROs. Por otra parte, algunos de ellos poseen capacidad quelante del Pb y otros metales, y a pesar de que este efecto es menor al de los agentes quelantes tradicionales (Gurer y col. 1998; Flora y col. 2003), cuando se administran tratamientos combinados de ambas sustancias se observa un claro sinergismo que mejora la capacidad de quelación (Flora y col. 2003; 2004; Sivaprasad y col. 2002; 2004). De esta manera, y sobre la base que el uso simultáneo de diferentes agentes quelantes es considerado como el tratamiento más eficaz contra la intoxicación por Pb (Flora y col. 2007b; Flora y col. 2008; Mikler y col. 2009), diversos estudios se han focalizado en

la terapia combinada de éstos y sustancias antioxidantes (Tandon y col. 1994; Liao y col. 2008a; 2008b), los cuales han reportado efectos positivos con una mejor recuperación clínica asociada a la movilización del metal, evidenciando que este tipo de terapia combinada sería una mejor alternativa para el tratamiento de intoxicación por Pb. Más aún, ha sido también estudiado el rol protector de las sustancias antioxidantes en estadios tempranos del desarrollo neuronal, donde su administración durante la gestación y lactancia previene algunos de los efectos adversos ocasionados por el Pb en la descendencia de ratas expuestas a este metal (Antonio-García y Massó-González 2008; Massó-González y Antonio-García 2009), demostrando así la importancia de estos compuestos no sólo como una alternativa terapéutica, sino también como nutrientes claves para reducir el riesgo de intoxicación por este metal (Gulson y col. 2001; Gautam y Flora 2010; Jiao y col. 2011).

3.1. Principales compuestos antioxidantes

3.1.1. Ácido α -lipoico

Es un antioxidante endógeno que, además de reducir los peróxidos lipídicos y quelar metales tóxicos (Packer y col. 1995), posee la capacidad de incrementar la síntesis *de novo* de GSH al facilitar el transporte de cisteína (el aminoácido limitante en la producción de GSH) hacia el interior celular (Han y col. 1997). Ha sido reportado que su suministro exógeno incrementa los niveles de ácido α -lipoico libre en el organismo, el cual puede actuar como un potente antioxidante y así reducir el estrés oxidativo (Bustamante y col. 1998). De esta manera, se ha demostrado que este compuesto incrementa la supervivencia en líneas celulares tratadas con Pb (Patrick 2006b), aunque no posee un efecto quelante directo, sino que actúa como neutralizante de radicales libres o como reforzador de enzimas antioxidantes para contrarrestar los efectos del Pb sobre GSH y marcadores de estrés oxidativo (Pande y Flora 2002; Sivaprasad y col. 2003; Flora y col. 2008; Wang y col. 2008b).

3.1.2. Melatonina

Es una hormona sintetizada por la glándula pineal que actúa como un potente neutralizante de radicales libres. Sus efectos protectores contra el daño oxidativo y citotoxicidad inducida por Pb han sido reportados en numerosos estudios (Kim y col. 2000; Daniel y col. 2004;

Flora y col. 2004; Othman y col. 2004), en los cuales dichos efectos se han atribuido a sus propiedades hidrofílicas y lipofílicas (Reiter y col. 2000), y a su localización superficial en la bicapa lipídica de la membrana celular, donde posiblemente cumpla un rol protector contra el daño producido sobre proteínas de membrana (Mayo y col. 2003; Reiter 2003). Al mismo tiempo, se ha reportado que la melatonina eleva los niveles de ARNm de SOD en varios tejidos y que estimula a varias enzimas antioxidantes y enzimas involucradas en la síntesis de GSH (Kotler y col. 1998; Reiter 2003).

3.1.3. Metionina

Además de su rol como precursor en la producción de GSH en hígado (Reed y Orrenius 1977), lo que le brinda su capacidad de neutralizar EROs al aumentar la producción de GSH, la metionina reacciona con EROs generando sulfóxido de metionina e incrementa los niveles de otras moléculas y enzimas antioxidantes (Patra y col. 2001; Jurczuk y col. 2006). De este modo, ha sido reportado su efecto beneficioso contra el estrés oxidativo ocasionado por Pb, además de un efecto quelante cuando es administrado en conjunto con N-acetilcisteína (NAC) en animales de experimentación (Calderón-Cabrera y col. 2008).

3.1.4. N-acetilcisteína (NAC)

Es un compuesto antioxidante con un reconocido efecto protector contra el daño producido en la intoxicación por Pb, lo que ha llevado a proponer que esta sustancia, junto con DMSA o monoisoamil DMSA (MiADMSA), puede ser utilizada como agente preventivo y terapéutico de intoxicaciones por este metal (Pande y col. 2001). En este sentido, diversos trabajos han destacado que el tratamiento con NAC normaliza la relación entre GSH/GSSG, disminuye los niveles de MDA y aumenta la posibilidad de sobrevivencia celular en ratas expuestas a Pb (Ercal y col. 1996; Gurer y col. 1998). Provoca además una reducción y/o reversión de los efectos oxidantes generados por niveles incrementados de δ -ALA (Neal y col. 1997). Recientemente ha sido evidenciado que un derivado de este compuesto, la N-acetilcisteína amida (NACA), tiene mayor capacidad quelante y antioxidante que la NAC debido a su mayor lipofilicidad, siendo más efectivo contra los efectos neurotóxicos del Pb (Penugonda y Ercal 2011).

3.1.5. Selenio (Se)

Es un mineral requerido por la enzima GPx y se ha informado que incrementa la capacidad antioxidante celular al aumentar los niveles de SOD, GR y la disponibilidad de GSH (Othman y El-Missiry 1998). Posee además un efecto protector contra los efectos tóxicos del Pb (Yuan y Tang 2001; Moshtaghie y col. 2007), el cual ha sido atribuido a su capacidad de unirse fuertemente a este metal para formar complejos (Flora y col. 1982). Asimismo, ha sido observada una correlación negativa entre niveles de PbS y Se en plasma de niños expuestos a Pb (Osman y col. 1998), lo que podría estar sugiriendo un efecto quelante de esta sustancia.

3.1.6. Taurina

Es un aminoácido semi-esencial con efectos antioxidantes y estabilizantes en membranas celulares. Si bien no ha sido demostrada su capacidad quelante sobre el Pb, se ha observado que la taurina mejora la sobrevida celular en ratas y cultivos celulares expuestos a este metal, incrementa los niveles de GSH, y disminuye los de MDA (Selvaraj y col. 2006); demostrando así su capacidad antioxidante frente al daño ocasionado por Pb. Más aún, Fan y col (2009) evidenciaron la mayor capacidad de la taurina para revertir alteraciones en la actividad de SOD, óxido nítrico sintetasa (NOS) y en los niveles de NO en relación a otros compuestos antioxidantes.

3.1.7. Vitamina B6 (piridoxina)

El mecanismo propuesto de la piridoxina frente a la intoxicación por Pb está relacionado con su rol en la vía metabólica de trans-sulfuración, donde la metionina es metabolizada a cisteína (Patrick 2006b). Se ha demostrado que ratas carentes de vitamina B6 expuestas a Pb presentan niveles inferiores de GSH con respecto a aquellas con concentraciones normales de esta vitamina (McGowan 1989) y que la administración de piridoxina en ratas expuestas a Pb mejora los niveles de actividad de δ -ALAD (Tandon y col. 1987), sugiriendo un rol antioxidante indirecto de vitamina B6 frente a la toxicidad del Pb.

3.1.8. Vitamina C (ácido ascórbico)

Se ha demostrado que el ácido ascórbico, además de su conocida eficacia como agente neutralizante de radicales libres, inhibe la peroxidación lipídica (Hsu y col. 1998; Patra y col. 2001), revierte los efectos ocasionados

por Pb en la síntesis del grupo hemo (Vij y col. 1998) y es capaz de quelar a este metal (Dalley y col. 1990). De esta manera, diversas evidencias indican que el tratamiento con ácido ascórbico revierte los efectos oxidantes y citotóxicos ocasionados por Pb en trabajadores (Wang y col. 2007), células y animales expuestos (Tandon y col. 2001; Mohammad y col. 2010; Bussche y Soares 2011; Kosik-Bogacka y col. 2011). Por otra parte, es bien conocido que el ácido ascórbico disminuye la absorción de Pb a nivel gastrointestinal y tiene un efecto inhibitorio de la incorporación de Pb a nivel celular (Fischer y col. 1998), logrando así disminuir la toxicidad de este metal. Al respecto, si bien diversos trabajos han puesto en evidencia que la administración de ácido ascórbico reduce los niveles de Pb en sangre o tejidos (West y col. 1994; El-Shafai y col. 2011), esto no ha sido descrito efectivamente por otros autores, dado que su administración en trabajadores expuestos con concentraciones de PbS superiores a 40 μ g/dl no logró alterar estos niveles ni el metabolismo de este metal (Lauwerys y col. 1983). En consonancia con estos resultados, Patra y col. (2001) no observaron disminución de los niveles de Pb en hígado, riñón, cerebro ni sangre de ratas expuestas tratadas con ácido ascórbico.

3.1.9. Vitamina E (α -tocoferol)

Es el nutriente más conocido por su acción protectora de la estabilidad de la membrana celular y su capacidad de prevenir el daño oxidativo (Packer 1991). Su función biológica más importante es la defensa celular contra el estrés oxidativo a través de la modulación de cascadas de señalización intracelular (Azzi y col. 1992), explicando su rol protector frente a la toxicidad del Pb mediante su capacidad de prevenir la producción de EROs.

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el suministro de vitamina E previene la inhibición de la actividad de δ -ALAD y la peroxidación lipídica inducida por Pb en eritrocitos (Rendon-Ramirez y col. 2007) y en diversos tejidos (Hsu y col. 1998; Patra y col. 2001), demostrando su capacidad de revertir el daño oxidativo inducido por Pb y otros tóxicos (Jurczuk y col. 2007; Das y Saha 2010; Wilhelm-Filho y col. 2010).

3.1.10. Zinc (Zn)

Es un metal esencial que posee efectos mitigantes en la toxicidad del Pb dado que compete con éste por proteínas transportadoras

presentes en el tracto gastrointestinal. Se ha evidenciado que la deficiencia de Zn puede incrementar la citotoxicidad del Pb y la susceptibilidad de neuronas al estrés oxidativo (Aimo y Oteiza 2006), y que el tratamiento con Zn revierte tanto la inhibición de δ -ALAD y el incremento de δ -ALA causados por Pb (Singh y col. 1994; Batra y col. 1998), así como los efectos adversos a nivel del sistema nervioso central inducidos por este metal (Moshtaghie y col. 2007). A pesar de ello, no hay fuertes evidencias de los efectos del Zn como antioxidante o quelante directo y la inhibición competitiva en la recaptación de Pb parece ser el mecanismo mediante el cual el Zn actúa como antioxidante indirecto en la intoxicación por Pb.

3.1.11. β -caroteno

Si bien estudios clínicos han manifestado la existencia de efectos perjudiciales del β -caroteno (Omenn y col. 1996), existen evidencias epidemiológicas que han demostrado que el suministro de este compuesto puede reducir la incidencia de cáncer, arterosclerosis y esclerosis múltiple a través de un mecanismo preventivo de peroxidación lipídica, lo cual podría estar relacionado con su efecto antioxidante en la toxicidad por Pb (Shastri y col. 1999; Machartová y col. 2000).

CONCLUSIÓN

Es bien conocido que el sistema hematopoyético es afectado por Pb y que varios parámetros de este sistema han sido utilizados extensamente como indicadores de intoxicación por este metal (Balparda 2008). A pesar de que aún en la actualidad, varios autores siguen caracterizándolos como indicadores sensibles de daño biológico inducido por Pb (Kang y col. 2009; Wang y col. 2011), un gran número de evidencias señalan que estos parámetros comienzan a alterarse recién a partir de niveles de PbS entre 25 y 40 $\mu\text{g}/\text{dl}$, sugiriendo que no son herramientas sensibles para evaluar intoxicación a bajas concentraciones (Ichiba y Tomokuni 1990; Somashekaraiah y col. 1990; ATSDR 2007). Este hecho toma relevancia al considerar numerosos trabajos (Bellinger y Needleman 2003; Canfield y col. 2003; Jusko y col. 2008; Wang y col. 2008a) que han demostrado que el Pb produce efectos adversos, principalmente en niños, a concentraciones en sangre inferiores a 10 $\mu\text{g}/\text{dl}$, poniendo de manifiesto que no existen niveles de PbS seguros para los efectos nocivos de este me-

tal en organismos en desarrollo.

Las evidencias presentadas a lo largo de esta revisión demuestran que el equilibrio de óxido-reducción celular es alterado por Pb (ver *Figura 1*), ya sea por un aumento en la generación de EROs, por inducción directa de peroxidación lipídica o por modificaciones en la actividad de las enzimas antioxidantes (Patrick 2006b), lo cual también, puede ocurrir a bajos niveles de exposición (Lee y col. 2006). De esta manera, teniendo en cuenta la capacidad del Pb de generar estrés oxidativo a bajas concentraciones y la escasa sensibilidad de los parámetros hematológicos como indicadores de intoxicación, en la actualidad están siendo estudiados diversos componentes del sistema antioxidante como posibles bioindicadores de exposición al Pb (Patrick 2006b). Sin embargo, a pesar de que un gran número de estudios evidencian una correlación positiva entre las concentraciones de Pb y alteraciones en estos parámetros indicadores de estrés oxidativo en diversos órganos, es importante tener en cuenta que estas alteraciones, al igual que las observadas a nivel hematopoyético, no son específicas de exposición a este metal, pudiendo ser observadas en diversas intoxicaciones y patologías (Forsberg y col. 2001; Cutler 2005; Kregel y Zhang 2007). Además, y puesto que estos cambios son altamente variables dependiendo de los niveles de Pb y del tiempo de exposición al metal, se sugiere utilizar estos bioindicadores como un método complementario al diagnóstico tradicional de intoxicación por Pb, sumándose a la determinación de los niveles de PbS y la anamnesis del paciente bajo estudio.

Por otra parte, a pesar de que hasta hoy la estrategia terapéutica implementada contra la intoxicación por Pb y otros metales está basada en la utilización de agentes quelantes (Flora y col. 2007a; 2008), el gran avance en el estudio del estrés oxidativo como mecanismo fisiopatológico de este tipo de intoxicaciones, ha puesto en evidencia a una gran diversidad de compuestos antioxidantes como posibles agentes terapéuticos (Ahamed y Siddiqui 2007). Esta estrategia es considerada, en algunos casos, como más eficiente y con menor capacidad de generar efectos adversos en relación a los métodos basados en la quelación actualmente utilizados (Hsu y Guo 2002); como así también, de gran aplicación como un método preventivo de intoxicación (Gulson y col. 2001; Gautam y Flora 2010).

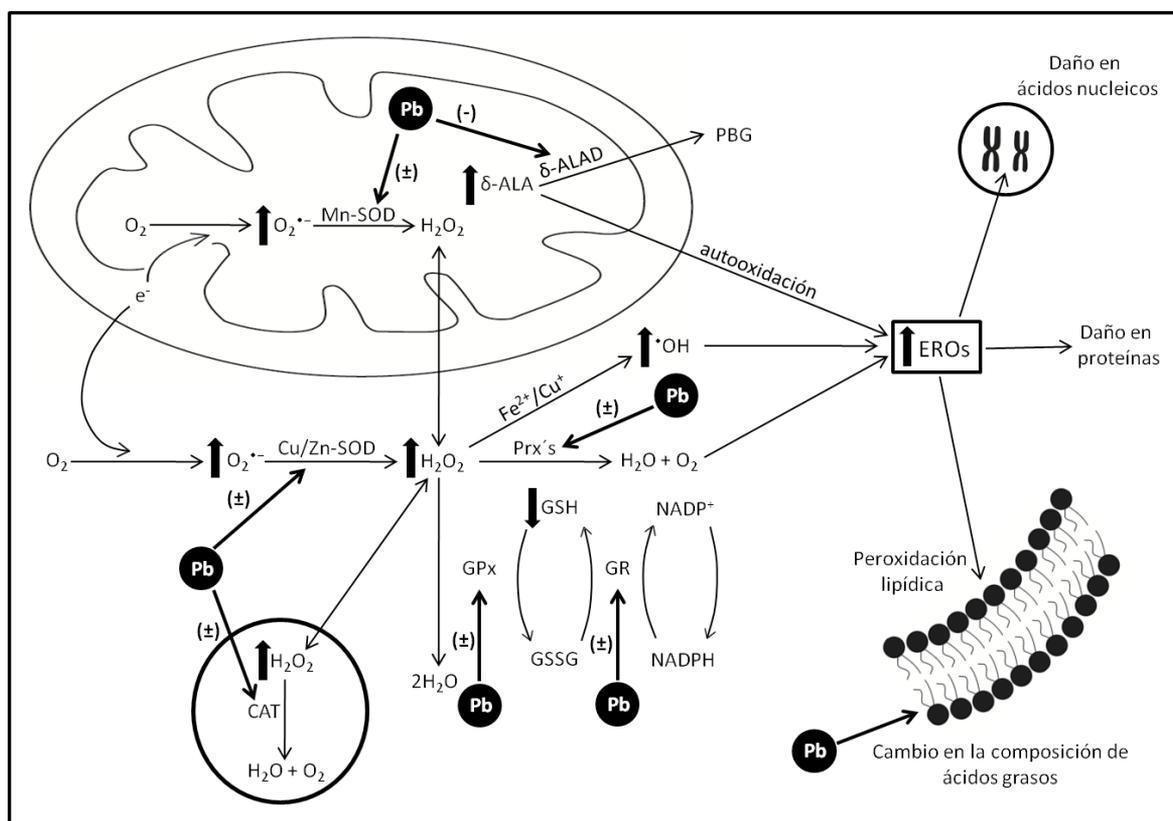


Figura 1. Mecanismos involucrados en el daño oxidativo celular inducido por Pb.

Si bien a bajos niveles el Pb promueve un incremento en la actividad del sistema antioxidante celular, a elevadas concentraciones inhibe la actividad de enzimas que metabolizan el H₂O₂ como CAT, GPx y Prx's, lo que lleva a un incremento de H₂O₂ y favorece su conversión a *OH mediante la reacción de Fenton. Por otra parte, el efecto inhibitorio de altos niveles de Pb sobre δ-ALAD, GR y los subtipos de SOD favorece el incremento de radicales libres, disminuye las reservas de GSH e impide la eliminación de O₂^{•-}. Como consecuencia, el resultante aumento de EROs inducirá daño celular a diversos niveles, efecto que se verá potenciado por la capacidad del Pb de alterar la integridad de la membrana plasmática, lo que hace a la célula más susceptible al estrés oxidativo.

(-): efecto inhibitorio; (±): efecto estimulante o inhibitorio dependiente de la concentración de Pb; █: Incremento; █: Disminución.

En conclusión, un creciente número de evidencias indica que la alteración a nivel del sistema antioxidante celular es uno de los principales mecanismos responsables de la intoxicación por Pb y que los cambios bioquímicos observados en este sistema pueden ser indicadores de exposición y/o intoxicación por este metal. Sin embargo, dada la complejidad del sistema antioxidante y la diversidad de efectos inducidos por Pb en el organismo, es clara la necesidad de seguir investigando sobre los mecanismos de toxicidad del Pb que involucran alteraciones en el equilibrio de óxido-reducción del organismo, a fin de mejorar los métodos clínicos diagnósticos y terapéuticos utilizados frente a la intoxicación por este metal, que a pesar de las políticas implementadas en diver-

sos países, continúa siendo un problema que concierne a la salud pública mundial.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Acharya S., Acharya U.R. In vivo lipid peroxidation responses of tissues in lead-treated Swiss mice. *Ind Health*. 1997;35(4):542-544.

Adonaylo V.N., Oteiza P.I. Lead intoxication: antioxidant defenses and oxidative damage in rat brain. *Toxicology*. 1999;135(2-3):77-85.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) [en línea]. Toxicological profile for lead. (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2007 [actualizado]

lizado al 15 de Julio de 2008; consulta: 21 de Septiembre de 2009]. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp13.pdf>.

Ahamed M., Siddiqui M.K. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin Chim Acta.* 2007;383(1-2):57-64.

Ahamed M., Verma S., Kumar A., Siddiqui M.K. Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. *Sci Total Environ.* 2005;346(1-3):48-55.

Ahamed M., Verma S., Kumar A., Siddiqui M.K. Delta-aminolevulinic acid dehydratase inhibition and oxidative stress in relation to blood lead among urban adolescents. *Hum Exp Toxicol.* 2006;25(9):547-553.

Aimo L, Oteiza P.I. Zinc deficiency increases the susceptibility of human neuroblastoma cells to lead-induced activator protein-1 activation. *Toxicol Sci.* 2006;91(1):184-191.

Antonio-García M.T., Massó-Gonzalez E.L. Toxic effects of perinatal lead exposure on the brain of rats: involvement of oxidative stress and the beneficial role of antioxidants. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(6):2089-2095.

Azzi A., Boscoboinik D., Hensey C. The protein kinase C family. *Eur J Biochem.* 1992;208(3):547-557.

Balparda J.K. Intoxicación por plomo: una revisión con énfasis en la población pediátrica. *Rev CES Med.* 2008;22(1):43-58.

Batra N., Nehru B., Bansal M.P. The effect of zinc supplementation on the effects of lead in the rat testis. *Reprod Toxicol.* 1998;12(5):535-540.

Bechara E.J. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Braz J Med Res.* 1996;29(7):841-851.

Bellinger D.C., Needleman H.L. Intellectual impairment and blood lead levels. *N Engl J Med.* 2003;349(5):500-502.

Betteridge D.J. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000;49(2Suppl1):3-8.

Bokara K.K., Brown E., McCormick R., Yalla-pragada P.R., Rajanna S., Bettaiya R. Lead-induced increase in antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in developing rat brain. *Biometals.* 2008;21(1):9-16.

Brigelius-Flohé R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem.* 2006;387(10-11):1329-1335.

Bussche J.V., Soares E.V. Lead induces oxidative stress and phenotypic markers of apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90(2):679-687.

Bustamante J., Lodge J.K., Marcocci L., Tritschler H.J., Packer L., Rihn B.H. alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radical Biol Med.* 1998;24(6):1023-1039.

Cabaravdic M., Mijanovic M., Kusturica J., Cabaravdic A. Occupational exposure of workers at gas station to inorganic lead. *Med Arh.* 2010;64(2):107-109.

Calderón-Cabrera L., Durán-Galetta M. G., García I., Galetta D., Lacruz L., Naranjo R., Pérez B., Ferreira E. Determination of the N-acetylcysteine and methionine effects in the cerebellum of rats intoxicated with lead. *Invest Clin.* 2008;49(1):17-28.

Canfield R.L., Henderson C.R. Jr., Cory-Slechta D.A., Cox C., Jusko T.A., Lanphear B.P. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *N Engl J Med.* 2003;348(16):1517-1526.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [en línea]. Screening young children for lead poisoning: guidance for State and Local Public Health Officials. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Public Health Service; 1991. [Actualizado al 1 de Junio de 2009; consulta: 21 de Septiembre de 2009]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/nceh/lead/publications/screening.htm>

Chiba M., Shinohara A., Matsushita K., Watanabe H., Inaba Y. Indices of lead-exposure in blood and urine of lead-exposed workers and concentrations of major and trace elements and activities of SOD, GSH-Px and catalase in their blood. *Tohoku J Exp Med.* 1996;178(1):49-62.

Choi H.J., Kang S.W., Yang C.H., Rhee S.G., Ryu S.E. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat Struct Biol.* 1998;5(5):400-406.

Circu M.L., Aw T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(6):749-762.

Conterato G.M., Augusti P.R., Somacal S., Einsfeld L., Sobieski R., Torres J.R., Emanuelli T. Effect of lead acetate on cytosolic thioredoxin reductase activity and oxidative stress parameters in rat kidneys. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007;101(2):96-100.

Costa C.A., Trivelato G.C., Pinto A.M., Bechara E.J. Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clin Chem.* 1997;43(7):1196-1202.

Cutler R.G. Oxidative stress profiling: part I. Its potential importance in the optimization of human health. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1055:93-135.

Daggett D.A., Oberley T.D., Nelson S.A., Wright L.S., Kornguth S.E., Siegel F.L. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. *Toxicology.* 1998;128(3):191-206.

Dalley J.W., Gupta P.K., Hung C.T. A physiological pharmacokinetic model describing the disposition of lead in the absence and presence of L-ascorbic acid in rats. *Toxicol Lett.* 1990;50(2-3):337-348.

Daniel S., Limson J.L., Dairam A., Watkins G.M., Daya S. Through metal binding, curcumin protects against lead- and cadmium-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates and against lead-induced tissue damage in rat brain. *J Inorg Biochem.* 2004;98(2):266-275.

Das K.K., Saha S. L-ascorbic and alpha tocopherol supplementation and antioxidant status in nickel- or lead-exposed rat brain tissue. *J Basic Physiol Pharmacol.* 2010;21(4):325-346.

Ding Y., Gonick H.C., Vaziri N.D. Lead promotes hydroxyl radical generation and lipid peroxidation in cultured aortic endothelial cells. *Am J Hypertens.* 2000;13(5Pt1):552-555.

Douki T., Onuki J., Madeiros M.H., Bechara E.J., Cadet J., Di Mascio P. DNA alkylation by 4,5-dioxovaleric acid, the final oxidation product of 5-aminolevulinic acid. *Chem. Res Toxicol.* 1998b;11(2):150-157.

Douki T., Onuki J., Madeiros M.H., Bechara E.J., Cadet J., Di Mascio P. Hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by 5-aminolevulinic acid. *FEBS Lett.* 1998a;428(1-2):93-96.

El-Shafai A., Zohdy N., El Mulla K., Hassan M., Morad N. Light and electron microscopic study of the toxic effect of prolonged lead exposure on the seminiferous tubules of albino rats and the possible protective effect of ascorbic acid. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(4):734-743.

Ercal N., Treeratphan P., Hammond T.C., Matthews R.H., Grannemann N.H., Spitz D.R. In vivo indices of oxidative stress in lead-exposed C57BL/6 mice are reduced by treatment with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid or N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(2):157-161.

Ergurhan-Ilhan I., Cadir B., Koyuncu-Arslan C., Arslan C., Gultepe F. M., Ozkan G. Level of oxidative stress and damage in erythrocytes in apprentices indirectly exposed to lead. *Pediatr Int.* 2008;50(1):45-50.

Fan G., Feng C., Li Y., Wang C., Yan J., Feng J., Shi X., Bi Y. Selection of nutrients for prevention or amelioration of lead-induced learning and memory impairment in rats. *Ann Occup Hyg.* 2009;53(4):341-351.

Faraci F.M., Didion S.P. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(8):1367-1373.

Findlay V.J., Tapiero H., Townsend D.M. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? *Bio-med Pharmacother.* 2005;59(7):374-379.

Fischer A.B., Hess C., Neubauer T., Eikmann T. Testing of chelating agents and vitamins against lead toxicity using mammalian cell cultures. *Analyst.* 1998;123(1):55-58.

- Flora G.J., Seth P.K. Alterations in some membrane properties in rat brain following exposure to lead. *Cytobios.* 2000;103(403):103-109.
- Flora S.J., Flora G., Saxena G., Mishra M. Arsenic and lead induced free radical generation and their reversibility following chelation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2007a;53(1):26-47.
- Flora S.J., Jain V.K., Behari J.R., Tandon S.K. Protective role of trace metals in lead intoxication. *Toxicol Lett.* 1982;13(1-2):51-56.
- Flora S.J., Mittal M., Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res.* 2008;128(4):501-523.
- Flora S.J., Pande M., Kannan G.M., Mehta A. Lead induced oxidative stress and its recovery following co-administration of melatonin or N-acetylcysteine during chelation with succimer in male rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004;50:OL543-OL551.
- Flora S.J., Pande M., Mehta A. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chem Biol Interact.* 2003;145(3):267-280.
- Flora S.J., Saxena G., Mehta A. Reversal of lead-induced neuronal apoptosis by chelation treatment in rats: role of reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007b;322(1):108-116.
- Forman H.J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):1-12.
- Forsberg L., de Faire U., Morgenstern R. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys.* 2001;389(1):84-93.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97-112.
- Fujita H., Nishitani C., Ogawa K. Lead, chemical porphyria, and heme as a biological mediator. *Tohoku J Exp Med.* 2002;196(2):53-64.
- García-Ruiz C., Fernández-Checa J.C. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006;21(Suppl3):S3-S6.
- Gautam P., Flora S.J. Oral supplementation of gossypin during lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats. *Nutrition.* 2010;26(5):563-570.
- Goering P.L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology.* 1993;14(2-3):45-60.
- Grover P., Rekhadevi P. V., Danadevi K., Vuyyuri S. B., Mahboob M., Rahman M. F. Genotoxicity evaluation in workers occupationally exposed to lead. *Int Hyg Environ Health.* 2010;213(2):99-106.
- Gulson B.L., Mizon K.J., Korsch M.J., Mahaffey K.R., Taylor A.J. Dietary intakes of selected elements from longitudinal 6-day duplicate diets for pregnant and nonpregnant subjects and elemental concentrations of breast milk and infants formula. *Environ Res.* 2001;87(3):160-174.
- Gurer H., Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2000;29(10):927-945.
- Gurer H., Ozgunes H., Neal R., Spitz D.R., Ercal N. Antioxidant effects of N-acetylcysteine and succimer in red blood from lead-exposed rats. *Toxicology.* 1998;128(3):181-189.
- Gurer-Orhan H., Sabir H.U., Ozgunes H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology.* 2004;195(2-3):147-154.
- Han D., Handelman G., Marcocci L., Sen C.K., Roy S., Kobuchi H, Tritschler H.J., Flohé L., Packer L. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors.* 1997;6(3):321-338.
- Han S.G., Kim Y., Kashon M.L., Pack D.L., Castanova V., Vallyathan V. Correlates of oxidative stress and free-radical activity in serum from asymptomatic shipyard welders. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(12):1541-1548.

Hansen J.M., Zhang H., Jones D.P. Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(1):138-145.

Hermes-Lima M., Pereira B., Bechara E.J.H. Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica.* 1991;21(8):1085-1090.

Hiraku Y., Kawanishi S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by delta-aminolevulinic acid in the presence of copper ion. *Cancer Res.* 1996;56(8):1786-1793.

Hogg N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:585-600.

Hsu P.C., Guo Y.L. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology.* 2002;180(1):33-44.

Hsu P.C., Hsu C.C., Liu M.Y., Chen L.Y., Guo Y.L. Lead-induced changes in spermatozoa function and metabolism. *J Toxicol Environ Health A.* 1998;55(1):45-64.

Hunaiti A., Soud M., Khalil A. Lead concentration and the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in the blood of some occupational workers from Irbid City, Jordan. *Sci Total Environ.* 1995;170(1-2):95-100.

Ichiba M., Tomokuni K. Studies on erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase (P5N) test and its evaluation in workers occupationally exposed to lead. *Int Arch Occup Environ Health.* 1990;62(4):305-310.

Ito Y., Niiya Y., Kurita H., Shima S., Sarai S. Serum lipid peroxide level and blood superoxide dismutase activity in workers with occupational exposure to lead. *Int Arch Occup Environ Health.* 1985;56(2):119-127.

Izawa S., Inoue Y., Kimura A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 1996;320(Pt1):61-67.

Jiao J., Lü G., Liu X., Zhu H., Zhang Y. Reduction of blood lead levels in lead-exposed mice by dietary supplements and natural antioxidants. *J Sci Food Agric.* 2011;91(3):185-491.

Jomova K., Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011;283(2-3):65-87.

Jurczuk M., Brzóska M. M., Moniuszko-Jakoniuk J. Hepatic and renal concentrations of vitamins E and C in lead- and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(8):1478-1486.

Jurczuk M., Moniuszko-Jakoniuk J., Brzóska M.M. Involvement of some low-molecular thiols in the peroxidative mechanisms of lead and ethanol action on rat liver and kidney. *Toxicology.* 2006;219(1-3):11-21.

Jusko T.A., Henderson C.R., Lanphear B.P., Cory-Slechta D.A., Parsons P.J., Canfield R.L. Blood lead concentrations < 10 microg/dL and child intelligence at 6 years of age. *Environ Health Perspect.* 2008;116(2):243-248.

Kang H. G., Jeong S. H., Cho M. R., Bischoff K. Time-dependent changes in lead and delta-aminolevulinic acid after subchronic lead exposure in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2009;28(10):647-654.

Kaplowitz N., Aw T.Y., Ookhtens M. The regulation of hepatic glutathione. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1985;25:715-744.

Kasperczyk S., Birkner E., Kasperczyk A., Zalejska-Fiolka J. Activity of superoxide dismutase and catalase in people protractedly exposed to lead compounds. *Ann Agric Environ Med.* 2004;11(2):291-296.

Kehrer J.P. The Heber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 2000;149(1):43-50.

Kharoubi O., Slimani M., Aoues A., Seddik L. Prophylactic effects of Wormwood on lipid peroxidation in an animal model of lead intoxication. *Indian J Nephrol.* 2008;18(2):51-57.

Kim Y.O., Pyo M.Y., Kim J.H. Influence of melatonin on immunotoxicity of lead. *Int J Immunopharmacol.* 2000;22(10):821-832.

Knowles S.O., Donaldson W.E. Dietary modification of lead toxicity: effects on fatty acid and eicosanoid metabolism in chicks. *Comp*

Biochem Physiol C. 1990;95(1):99-104.

Kontos H.A., Wei E.P., Ellis E.F., Jenkins L.W., Povlishock J.T., Rowe G.T., Hess M.L. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ Res.* 1985;57(1):142-151.

Kosik-Bogacka D.I., Baranowska-Bosiacka I., Marchlewicz M., Kolasa A., Olszewska M., Lanocha N., Wiernicki I., Millo B., Wiszniewska B., Chlubek D. The effects of L-ascorbic acid and/or tocopherol supplementation on electrophysiological parameters of the colon of rats chronically exposed to lead. *Med Sci Monit.* 2011;17(1):BR16-26.

Kotler M., Rodriguez C., Sainz R.M., Antolín I., Menéndez-Paláez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res.* 1998;24(2):83-89.

Kregel K.C., Zhang H.J. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292(1):R18-R36.

Lauwerys R., Roels H., Buchet J.P., Bernard A.A., Verhoeven L., Konings J. The influence of orally-administered vitamin C or zinc on the absorption of and biological response to lead. *J Occup Med.* 1983;25(9):668-678.

Lawton L.J., Donaldson W.E. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res.* 1991;28(2):83-97.

Lee D.H., Lim J.S., Song K., Boo Y., Jacobs D.R. Jr. Graded associations of blood lead and urinary cadmium concentrations with oxidative-stress-related markers in the U.S. population: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Environ Health Perspect.* 2006;114(3):350-354.

Leggett R.W. An age-specific kinetic model of lead metabolism in humans. *Environ Health Perspect.* 1993;101(7):598-616.

Li G.J., Zhang L.L., Lu L., Wu P., Zheng W. Occupational exposure to welding fume among welders: alterations of manganese, iron, zinc, copper, and lead in body fluids and the oxi-

dativ stress status. *J Occup Environ Med.* 2004;46(3):241-248.

Liao Y., Yu F., Jin Y., Lu C., Li G., Zhi X., An L., Yang J. Selection of micronutrients used along with DMSA in the treatment of moderately lead intoxicated mice. *Arch Toxicol.* 2008a;82(1):37-43.

Liao Y., Zhang J., Jin Y., Lu C., Li G., Yu F., Zhi X., An L., Yang J. Therapeutic potentials of combined use of DMSA with calcium and ascorbic acid in the treatment of mild to moderately lead intoxicated mice. *Biometals.* 2008b;21(1):1-8.

Lin S., Cullen W.R., Thomas D.J. Methylarsenicals and arsinothiols are potent inhibitors of mouse liver thioredoxin reductase. *Chem Res Toxicol.* 1999;12(10):924-930.

Liu C-M., Zheng Y-L., Lu J., Zhang Z-F., Fan S-H., Wu D-M., Ma J-Q. Quercetin protects rat liver against lead-induced oxidative stress and apoptosis. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010;29:158-166.

Lu S.C. Regulation of synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):42-59.

Machartová V., Racek J., Kohout J., Senft V., Trefil L. Effect of antioxidant therapy on indicators of radical activity in workers at risk of lead exposure. *Vnitr Lek.* 2000;46(8):444-446.

Markowitz M. Lead poisoning. *Pediatr Rev.* 2000;21(10):327-335.

Marnett L.J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):361-370.

Massó-González E.L., Antonio-García M.T. Natural antioxidants protect against lead-induced damage during pregnancy and lactation rat's pups. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2009;72(8):2137-2142.

Mayo J.C., Tan D.X., Sainz R.M., Natarajan M., Lopez-Burillo S., Reiter R.J. Protection against oxidative protein damage induced by metal-catalyzed reaction or alkylperoxyl radicals: comparative effects of melatonin and other antioxidants. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1620(1-3):139-150.

McGowan C. Influence of vitamin B6 status on aspects of lead poisoning in rats. *Toxicol Lett.* 1989;47(1):87-93.

McIntyre M., Bohr D.F., Dominiczak A.F. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension.* 1999;34(4Pt1):539-545.

Mikler J., Banovcin P., Jesenak M., Hamzikova J., Statelova D. Successful treatment of extreme acute lead intoxication. *Toxicol Ind Health.* 2009;25(2):137-140.

Mohammad A., Ali N., Reza B., Ali K. Effect of ascorbic acid supplementation on nitric oxide metabolites and systolic blood pressure in rats exposed to lead. *Indian J Pharmacol.* 2010;42(2):78-81.

Monteiro H.P., Abdalla D.S., Augusto O., Bechara E.J. Free radical generation during delta-aminolevulinic acid auto-oxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. *Arch Biochem Biophys.* 1989;271(1):206-216.

Morin B., Narbonne J.F., Ribera D., Badouard C., Ravanat J.L. Effect of dietary fat-soluble vitamins A and E and proanthocyanidin-rich extract from grape seeds on oxidative DNA damage in rats. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(2):787-796.

Moshtaghi A. A., Ani M., Aghadavod E., Fazilati M. Protective effects of selenium and zinc on changes in catecholamine levels of brain regions in lead intoxicated rat. *Pak J Biol Sci.* 2007;10(17):2964-2967.

Muller F.L., Lustgarten M.S., Jang Y., Richardson A., Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(4):477-503.

Neal R., Yang P., Fiechtl J., Yildiz D., Gurer H., Ercal N. Pro-oxidant effects of delta-aminolevulinic acid (delta-ALA) on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol Lett.* 1997;91(3):169-178.

Needleman H. Lead poisoning. *Annu Rev Med.* 2004;55:209-222.

Nordberg J., Arnér E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1287-1312.

Noriega G.O., Tomaro M.L., Del-Batlle A.M. Bilirubin is highly effective in preventing in vivo delta-aminolevulinic acid-induced oxidative cell damage. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1638(2):173-178.

Oja S.S., Janaky R., Varga V., Saranasari P. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochem Int.* 2000;37(2-3):299-306.

Oktem F., Arslan M.K., Dündar B., Delibas N., Gültepe M., Ergürhan İlhan I. Renal effects and erythrocyte oxidative stress in long-term low-level lead-exposed adolescent workers in auto repair workshops. *Arch Toxicol.* 2004;78(12):681-687.

Omenn G.S., Goodman G.E., Thornquist M.D., Balmes J., Cullen M.R., Glass A., Keogh J.P., Meykens F.L., Valanis B., Williams J.H., Barnhart S., Hammar S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 1996;334(18):1150-1055.

Osman K., Schürtz A., Akesson B., Marciniak F., Vahter M. Interactions between essential and toxic elements in lead exposed children in Katowice, Poland. *Clin Biochem.* 1998;31(8):657-665.

Othman A.I., El-Missiry M.A. Role of selenium against lead toxicity in male rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 1998;12(6):345-349.

Othman A.I., Sharawy S., el-Missiry M.A. Role of melatonin in ameliorating lead induced haematotoxicity. *Pharmacol Res.* 2004;50(3):301-307.

Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(4 Suppl):1050S-1055S.

Packer L., Witt E.H., Tritschler H.J. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 1995;19(2):227-250.

Pallardó F.V., Markovic J., García J.L., Viña J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):77-85.

Pande M., Flora S.J. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of alpha-lipoic acid and succimers in rats. *Toxicology.* 2002;177(2-3):187-196.

Pande M., Mehta A., Pant B.P., Flora S.J. Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2001;9(4):173-184.

Patil A.J., Bhagwat V.R., Patil J.A., Dongre N.N., Ambekar J.G., Jaiikhani R., Das K.K. Effect of lead (Pb) exposure on the activity of superoxide dismutase and catalase in battery manufacturing workers (BMW) of Western Maharashtra (India) with reference to heme biosynthesis. *Int J Environ Res Public Health.* 2006;3(4):329-337.

Patra R.C., Swarup D., Dwivedi S.K. Antioxidant effects of alpha tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology.* 2001;162(2):81-88.

Patrick L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev.* 2006a;11(1):2-22.

Patrick L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev.* 2006b;11(2):114-127.

Penugonda S., Ercal N. Comparative evaluation of N-acetylcysteine (NAC) and N-acetylcysteine amide (NACA) on glutamate and lead-induced toxicity in CD-1. *Toxicol Lett.* 2011;201(1):1-7.

Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini A.F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(8):1499-1503.

Powell S.R. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr.* 2000;130(5S Suppl):1447S-1454S.

Reckziegel P., Dias V.T., Benvegnú D., Boufleur N., Silva Barcelos R.C., Segat H.J., Pase C.S., Dos Santos C.M., Flores E.M., Bürger M.E. Locomotor damage and brain oxidative stress induced by lead exposure are attenuated by gallic acid treatment. *Toxicol Lett.* 2011;203(1):74-81.

Reed D.J., Orrenius S. The role of methionine in glutathione biosynthesis by isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1977;77(4):1257-1264.

Reiter R.J. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003;17(2):273-285.

Reiter R.J., Tan D.X., Qi W., Manchester L.C., Karbownik M., Calvo J.R. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept.* 2000;9(3-4):160-171.

Rendon-Ramirez A., Cerbon-Solorzano J., Maldonado-Vega M., Quintanar-Escorza M.A., Calderon-Salinas J.V. Vitamin-E reduces the oxidative damage on delta-aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *Toxicology In Vitro.* 2007;21(6):1121-1126.

Rhee S.G., Chae H.Z., Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 2005;38(12):1543-1552.

Roberts R.A., Laskin D.L., Smith C.V., Robertson F.M., Allen E.M., Doorn J.A., Slikker W. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol Sci.* 2009;112(1):4-16.

Rogan W.J., Dietrich K.N., Ware J.H., Dockery D.W., Salganik M., Radcliffe J, Jones R.L., Ragan N.B., Rhoads G.G. The effect of chelation therapy with succimer on neuropsychological development in children exposed to lead. *N Engl J Med.* 2001;344(19):1421-1426.

Ryan-Harshman M., Aldoori W. The relevance of selenium to immunity, cancer, and infectious/inflammatory diseases. *Can J Diet Pract Res.* 2005;66(2):98-102.

Sakai T., Morita Y. Delta-aminolevulinic acid in plasma or whole blood as a sensitive indicator of lead effects, and its relation to the other heme-related parameters. *Int Arch Occup Environ Health.* 1996;68(2):126-132.

Sandhir R., Julka D., Gill K.D. Lipoperoxidative damage on lead exposure in rat brain and its implications on membrane bound enzymes. *Pharmacol Toxicol.* 1994;74(2):66-71.

Selvaraj N., Bobby Z., Sathiyapriya V. Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: an in vitro study on human erythrocytes. *Clin Chim Acta.* 2006;366(1-2):190-195.

Shastri D., Kumar M., Kumar A. Modulation of lead toxicity by *Spirulina fusiformis*. *Phytother Res.* 1999;13(3):258-260.

Singh B., Dhawan D., Nehru B., Garg M.L., Mangal P.C., Chand B., Trehan P.N. Impact of lead pollution on the status of other trace metals in blood and alterations in hepatic functions. *Biol Trace Elem Res.* 1994;40(1):21-29.

Sivaprasad R., Nagaraj M., Varalakshmi P. Lipoic acid in combination with a chelator ameliorates lead-induced peroxidative damages in rat kidney. *Arch Toxicol.* 2002;76(8):437-441.

Sivaprasad R., Nagaraj M., Varalakshmi P. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid on lead-induced erythrocyte membrane lipid peroxidation and antioxidant status in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2003;22(4):183-192.

Sivaprasad R., Nagaraj M., Varalakshmi P. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Nutr Biochem.* 2004;15(1):18-23.

Soares F., Farina M., Santos F.W., Souza D., Rocha J.B., Nogueira C. W. Interaction between metals and chelating agents affects glutamate binding on brain synaptic membranes. *Neurochem Res.* 2003;28(12):1859-1865.

Soltaninejad K., Kebriaeezadeh A., Minaiee B., Ostad S.N., Hosseini R., Azizi E., Abdollahi M. Biochemical and ultrastructural evidences for toxicity of lead through free radicals in rat brain. *Hum Exp Toxicol.* 2003;22(8):417-23.

Somashekaraiah B.V, Venkaiah B., Prasad A.R. Biochemical diagnosis of occupational exposure to lead toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1990;44(2):268-275.

Souza A.M, Tavares C.F.F. Chumbo e anemia. *Medicina (Ribeirão Preto).* 2009;42(3):337-340.

Stadtman E.R., Levine R.L. Protein oxidation. *Ann N. Y. Acad Sci.* 2000; 899:191-208.

Tandon S.K., Chatterjee M., Bhargava A., Shukla V., Bihari V. Lead poisoning in Indian silver refiners. *Sci Total Environ.* 2001;281(1-3):177-182.

Tandon S.K., Flora S.J., Singh S. Influence of pyridoxine (vitamin B6) on lead intoxication in rats. *Ind Health.* 1987;25(2):93-96.

Tandon S.K., Singh S., Flora S.J. Influence of methionine-zinc supplementation during chelation of lead in rats. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 1994;8(2):75-78.

Tandon S.K., Singh S., Prasad S., Srivastava S., Siddiqui M.K. Reversal of lead-induced oxidative stress by chelating agent, antioxidant, or their combination in the rat. *Environ Res.* 2002;90(1):61-66.

Trachootham D., Lu W., Orasawara M.A., Nilsa R.D., Huang P. Redox re regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(8):1343-1374.

Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(Pt2):335-344.

Vij A.G., Satija N.K., Flora S.J. Lead induced disorders in hematopoietic and drug metabolizing enzyme system and their protection by ascorbic acid supplementation. *Biomed Environ Sci.* 1998;11(1):7-14.

Wang C., Liang J., Zhang C., Bi Y., Shi X., Shi Q. Effect of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in liver. *Ann Occup Hyg.* 2007;51(6):563-569.

Wang H.L., Chen X.T., Yang B., Ma F.L., Wang S., Tang M.L., Hao M.G., Ruan D.Y. Case-control study of lead levels and attention deficit hyper-

ractivity disorder in Chinese children. *Environ Health Perspect.* 2008a;116(10):1401-1406.

Wang H. L., Chen X. T., Yin S. T., Liu J., Tang M. L., Wu C. Y., Ruan D. Y. Opposite effects of alpha-lipoic acid on antioxidation and long-term potentiation in control and chronically lead-exposed rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2008b; 378(3):303-310.

Wang J., Wu J., Zhang Z. Oxidative stress in mouse brain exposed to lead. *Ann Occup Hyg.* 2006;50(4):405-409.

Wang Q., Ye L. X., Zhao H. H., Chen J. W., Zhou Y. K. Benchmark dose approach for low-level lead induced haematogenesis inhibition and associations of childhood intelligences with ALAD activity and ALA levels. *Sci Total Environ.* 2011;409(10):1806-1810.

Wang Q., Zhao H. H., Chen J. W., Hao Q. L., Gu K. D., Zhu Y. X., Zhou Y. K., Ye L. X. delta-Aminolevulinic acid dehydratase activity, urinary delta-aminolevulinic acid concentration and zinc protoporphyrin level among people with low level of lead exposure. *Int J Hyg Environ Health.* 2010;213(1):52-58.

West W.L., Knight E.M., Edwards C.H., Manning M., Spurlock B., James H., Johnson A.A., Oyemade U.J., Cole O.J., Westney O.E., Laryea H., Jones S., Westney L.S. Maternal low level lead and pregnancy outcomes. *J Nutr.* 1994;124(6Suppl):981S-986S.

Wilhelm-Filho D., Avila S. Jr., Possamai F. P., Parisotto E. B., Moratelli A. M., Garlet T. R., Inácio D. B., Torres M. A., Colepicolo P., Dal-Pizzol F. Antioxidant therapy attenuates oxidative stress in the blood of subjects exposed to occupational airborne contamination from coal mining extraction and incineration of hospital residues. *Ecotoxicology.* 2010;19(7):1193-1200.

Witte A.B., Anestal K., Jerremalm E., Ehrsson H., Arnér E.S. Inhibition of thioredoxin reductase but not of glutathione reductase by the

major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(5):696-703.

Xia Y., Dawson V.L., Dawson T.M., Snyder S.H., Zweier J.L. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(13):6770-6774.

Xia Y., Zweier J.L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(13):6954-6958.

Xu J., Lian L., Wu C., Wang X., Fu W., Xu L. Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(5):1488-1494.

Yan H., Harding J.J. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J.* 1997;328(Pt2):599-605.

Yiin S.J., Lin T.H. Lead-catalyzed peroxidation of essential unsaturated fatty acid. *Biol Trace Elem Res.* 1995;50(2):167-172.

Yla-Herttuala S. Oxidized LDL and atherogenesis. *Ann N. Y. Acad Sci.* 1999;874:134-137.
Yu F., Liao Y., Jin Y., Zhao Y., Ren Y., Lu C., Li G., Li Y., Yang J. Effects of in utero meso-2,3-dimercaptosuccinic acid with calcium and ascorbic acid on lead-induced fetal development. *Arch Toxicol.* 2008;82(7):453-459.

Yuan X., Tang C. The accumulation effect of lead on DNA damage in mice blood cells of three generations and the protection of selenium. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2001;36(4):501-508.

Zimmerman B.J., Granger D.N. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci.* 1994;307(4):284-292.

Bromadiolona: un caso judicial relacionado con la muerte de abejas Bromadiolone: a judicial case related to bees death

Salinas, Guillermo Pablo

Gabinete Científico Mar del Plata. Policía Federal Argentina. Sarmiento 2564, 7600, Mar del Plata. Tel-Fax: (54-223) 451-2571
labmdppfa@gmail.com

Recibido: 30 de mayo de 2011
Aceptado: 14 de diciembre de 2011

Resumen. Como resultado de una investigación impulsada por la justicia, se analizaron muestras provenientes de un posible derrame intencional de plaguicidas sobre colmenas con abejas. En los análisis realizados se utilizó GC-MS previa extracción con solventes orgánicos. Debido a dificultades iniciales en la identificación de plaguicidas sobre tres de las muestras, se procedió al reprocesamiento de los cromatogramas utilizando selección de las relaciones de masas m/z 158, 173 y 143. Utilizando es herramienta analítica se obtuvieron los correspondientes cromatogramas, y los espectros de masas con coincidencia frente al divulgado para el producto de descomposición de bromadiolona (PDB), determinando que tanto las abejas como las colmenas habían tenido contacto con bromadiolona (3-[3-(4'-bromobifenil-4-il)- 3-hidroxi-1-fenilpropil]-4- hidroxycumarina), un anticoagulante cumarínico de utilización agraria para combatir roedores, que parece ser prácticamente no tóxico para las abejas según informes internacionales. Se observó que en la literatura no se halla propuesta una estructura química definida para el PDB, lo cual podría constituir el fundamento para encarar trabajos futuros con el fin de elucidar el comportamiento de la droga madre en el contexto del caso.

Palabras clave: Bromadiolona; GC-MS; Plaguicidas; Abejas.

Abstract. As a result of an investigation boosted by ordinary justice, samples from a probable deliberate spill of pesticide over bees and hives were analyzed. Solvent extractions and then GC-MS were used to perform the tests. Due to difficulties since the beginning in pesticide identification upon three samples, chromatograms were reprocessed using mass selection at m/z 158, 173 y 143 mass rates. The correspondent chromatograms were gathered by these analytical tool, and their mass spectrums were found coincident with the previously reported as bromadiolone decomposition product (BDP), showing that hives as well as bees had been in contact with bromadiolone (3-[3-(4'-bromobiphenyl-4-yl)- 3-hydroxy-1-phenylpropyl]-4- hydroxycoumarin) - a coumarin rodenticide (anticoagulant) for agricultural use - which seems to be, according to international reports, practically non toxic for bees. It was observed that in the literature has not been proposed a defined chemical structure for BDP, so this could be a challenge for a future research in order to clarify its behavior in a similar situation.

Key words: Bromadiolone; GC-MS; Pesticide; Bees.

INTRODUCCIÓN

El presente es un reporte acerca de una investigación iniciada por una denuncia realizada en la justicia, a raíz de que un apicultor resultara perjudicado por un vuelco intencional de alguna sustancia química sobre sus colmenas a modo de sabotaje, resultando en la muerte de la totalidad de las abejas en todas las colmenas que poseía. En la denuncia propiciada por el damnificado figuran informes policiales de testigos que aseguran haber visto personas volcando alguna clase de líquido sobre las colmenas. En la misma se señala al propietario del campo vecino, como sospechoso, debido a antiguas disputas. Luego de la orden judicial respectiva, las muestras fueron

tomadas por una patrulla policial rural el 5 de marzo de 2009, y por motivos administrativos arribaron al laboratorio el 20 de setiembre de 2010; es decir que entre la toma de muestras y sus análisis transcurrieron cerca de 19 meses. Se desconoce la forma de conservación. Se habían tomado muestras de las colmenas y de productos químicos hallados en un depósito del campo vecino.

El objetivo de la investigación fue establecer un vínculo cualitativo entre posibles sustancias que se puedan hallar en las abejas o colmenas con elementos secuestrados en el galpón rural perteneciente al campo del vecino sospechoso, como parte de la evidencia

judicial para relacionar la muerte de las mismas a un acto deliberado por parte del imputado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Acetona p.a. (Merck, Darmstadt, Germany), cloroformo p.a. Rosin (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina), 2-propanol p.a. (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina), sulfato de sodio anhidro p.a. (Biopack, Argentina), n-hexano p.a. (Merck, Darmstadt, Germany).

Muestras

Las muestras provenientes del campo afectado consistieron en una abeja entera sobre la que se observó ligera tinción fucsia (muestra 1) y una sustancia (muestra 2) colectada de las colmenas con un hisopo. Las muestras correspondientes al campo vecino consistieron en distintos líquidos contenidos en cinco botellas, algunas de ellas rotuladas y otras no, las que se describen a continuación: Un líquido amarillento (muestra 3) contenido en una botella de vidrio transparente sellada con tapa a rosca. Un líquido verde (muestra 4) contenido en una botella de vidrio transparente, sellada, con tapa a rosca. Una botella de vidrio sin contenido aparente de color caramelo con tapa a rosca y etiqueta en la que se leyó "NOC-TOLIN Insecticida, Repelente, Cipermetrina", sobre la que se efectuó un lavado con 3 ml de acetona y se retuvo el líquido resultante como muestra 5. Un líquido amarillento (muestra 6) contenido en una botella de plástico blanco, con tapa a rosca, con etiqueta en la que se leyó "KARATE Lamdacialotrina". Un líquido de color rojo fucsia (muestra 7) contenido en una botella de plástico color caramelo con tapa a rosca con etiqueta en la que se leyó "GLEXRAT, Raticida, Rodenticida, Bromadiolona". Para el análisis, se tomó un volumen de 1 ml de cada líquido.

Como referencia de técnica analítica se utilizó el protocolo de trabajo propuesto por Sato (2005) y técnicas extractivas provistas por Esteve-Turrillas (2007a, 2007b).

Debido a la escasez en la cantidad de evidencia secuestrada respecto de las muestras 1 y 2, sólo se realizó cuidadosamente una extracción con acetona para cada muestra.

Procedimiento

Las muestras y un blanco de muestras se procesaron según la metodología sugerida por Sato (2005), mediante la extracción con 5 ml

de una mezcla de cloroformo/2-propanol (9:1, v/v), y luego asistida por microondas durante 30 seg a 800 W. Las mismas se centrifugaron 10 min a 1000 g. El extracto orgánico resultante fue separado y tratado posteriormente con sulfato de sodio anhidro, se centrifugó y se separó la porción orgánica. La capa orgánica resultante se transfirió cuidadosamente a viales de vidrio, donde fue evaporada hasta ser llevada a sequedad bajo presión reducida. El residuo de cada muestra se reconstituyó en 200 µl de n-hexano, y ese volumen de cada muestra se transfirió a viales de vidrio color caramelo que se cerraron con precinto de aluminio y septo de goma.

El análisis de los extractos correspondiente a las siete muestras se realizó mediante la utilización de cromatografía gaseosa acoplada a detector de masas, utilizando la metodología sugerida por Sato (2005), trabajando en las siguientes condiciones: equipo utilizado: cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer Clarus 600 T con inyector automático y detector de masas por ionización por impacto de electrones mediante filamento de renio (Perkin Elmer Instruments, Shelton, EEUU). Columna: capilar de 30 m, diámetro interno 0,25 µm, fase estacionaria 0,25 µm compuesta por metilpolisiloxano-(5% fenil) (Perkin Elmer Instruments Elite-5MS, Shelton, EEUU). Programa de temperatura de horno: inicial a 50 °C durante 2 min, luego incremento hasta 330 °C a una tasa de 20 °C/min, manteniendo la temperatura final por 3 min. Tiempo total de programa: 19,00 min. Tipo de inyección: Splitless. Volumen de inyección: 2 µl (jeringa N610-1390 5 µl - Perkin Elmer Instruments, Australia). Temperatura de inyección: 250 °C. Temperatura de fuente de iones: 150 °C. Temperatura de interfase GC-MS: 330 °C. Energía electrónica: 70 meV. Gas carrier: helio 5.0 99,999 % (Linde AG Group, Gases Division, Pullach, Germany). Flujo 50 ml/min. Detector: Scan entre 0 y 19 min, con tiempo de scan 0,4 seg, e inter-scan delay 0,05 seg. SIR scan entre 8,50 y 10,50 min, para relaciones m/z de 158, 173 y 143, con intervalos de 0,02 seg.

Criterio para el análisis de resultados: el objetivo de la investigación ordenada por la justicia fue el de demostrar el hallazgo de sustancias en común entre las muestras provistas. Esto es, hallar sustancias que se comporten de manera similar en los ensayos de laboratorio entre las muestras provistas, sirviendo como conexión o nexo entre una o más sustancias

contenidas en las botellas y sustancias xenobióticas halladas en abejas. Por ese motivo no se contó con testigos indubitables de las sustancias analizadas, como así tampoco fue el objetivo judicial determinar cantidades del o los xenobióticos en las muestras. Como punto de corte para el hallazgo de sustancias, a partir del cual considerarlo como un hallazgo positivo, se utilizó el concepto comúnmente aplicado donde señal atribuida a un analito es aquella en que la relación señal-ruido es igual o mayor a 2 (McNair y Miller, 2009).

RESULTADOS

Inicialmente, se realizó el análisis de los extractos obtenidos mediante GC-MS en las condiciones descritas y por triplicado obteniendo cromatogramas en modo TIC (Cromatograma de Iones Totales). Se identificó clorpirifos, cipermetrina, dietanolamina, n-dodecildimetilamina, 2,4-D y 1-N-(2-fluorofenil)-3-(4-morfolinil)propanamida en las muestras 3 a 6 (Tabla 1). Para la pesquisa se reprocesaron los mismos cromatogramas ya obtenidos en su forma TIC, y se realizó la selección de masas m/z 158, 173

Tabla 1. Listado de sustancias halladas en las muestras analizadas y sus respectivos tiempos de retención en modo TIC y por selección de masa específica m/z 158. Selecciones de m/z 173 y 143 rindieron resultados similares para PDB (no mostrado).

	TIC		m/z 158	
	TR (min)	Id.	TR (min)	Id.
blanco	-	-	-	-
1	-	-	10,69	PDB
2	-	-	10,68	PDB
3	14,16	Clorpirifos	-	-
4	13,98	Clorpirifos	-	-
5	17,91	Cipermetrina	17,93	Cipermetrina
6	10,70	Dietanolamina	-	-
	11,12	n-Dodecildimetilamine	-	-
	13,01	2,4-D	-	-
	15,17	1-N-(2-fluorofenil)-3-(4-morfolinil)propanamida	-	-
7	-	-	10,56-10,65	PDB

Id: Identificación de sustancia mediante biblioteca de espectros computarizada NIST. m/z: Relación de masas de los iones resultantes en el espectro obtenido. TR: Tiempo de retención. TIC: Cromatograma de Iones Totales. PDB: Producto de Descomposición de Bromadiolona.

o 143 para las siete muestras y el blanco debido a que esos iones resultaron ser mayoritarios según lo publicado para el producto de degradación de bromadiolona (Sato 2005). Los resultados correspondientes a los cromatogramas TIC y por selección de masa específica sólo para m/z 158 se muestran en la Tabla 1.

En la Figura 1, se reproducen los cromatogramas para una selección de masas de 158. Se observaron picos con tiempos de retención compatibles con bromadiolona. Los mismos se analizaron posteriormente a través de sus espectros de masas para confirmar o descartar la compatibilidad con bromadiolona.

En la Figura 2, se reproducen los espectros de masas obtenidos en las muestras 1, 2 y 7, los mismos corresponden a los picos observados con tiempo de retención (TR) entre 10,56 y 10,69 min, los que concordaron con el espectro de masas propuesto por Sato (2005) para el producto de descomposición de bromadiolona (PDB).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO 1996) y la Universidad Florida (Fishel 2010) la bromadiolona es un producto anti-coagulante de la familia de las cumarinas muy

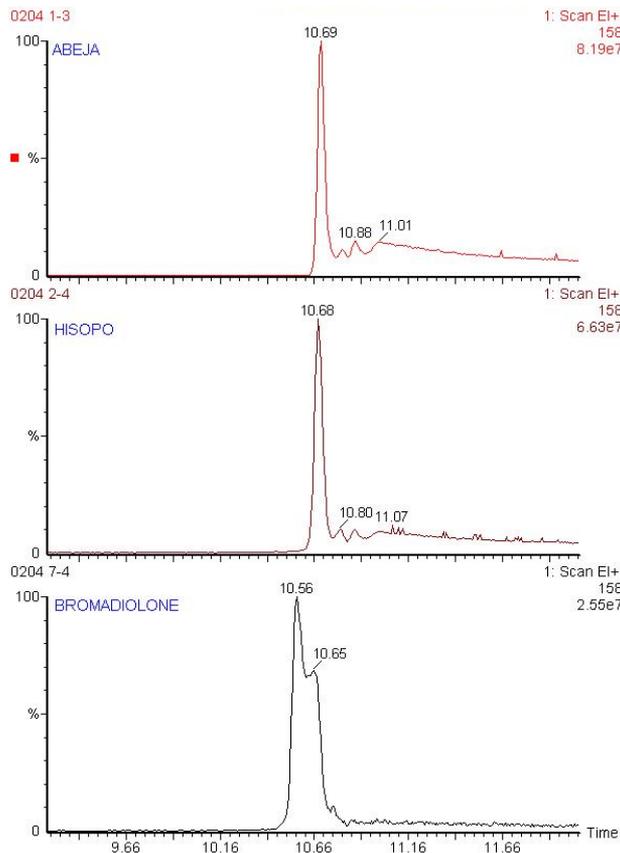


Figura 1. Cromatogramas para una selección de masas de 158.

Referencias: 0204 1-3: muestra 1 (abeja); 0204 2-4: muestra 2 (hisopo); 0204 7-4: muestra 7 (líquido conteniendo supuestamente bromadiolona).

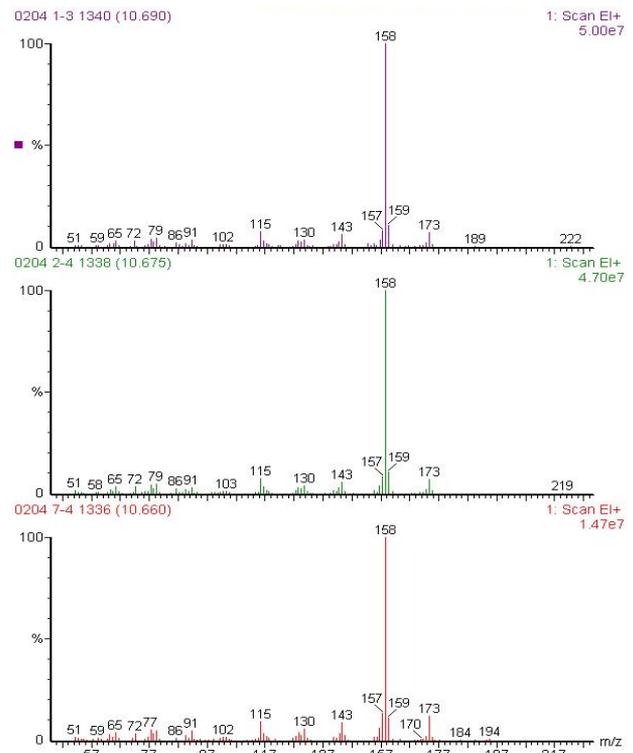


Figura 2. Espectros de masas obtenidos en las muestras 1, 2 y 7, que corresponden a los picos observados (en la figura 1) con TR entre 10,56 y 10,69 min para PDB.

Referencias: m/z: relación de masas obtenidas; %: porcentaje en intensidad de relación masas detectadas respecto de la masa mayoritaria (158). 0204 1-3: muestra 1 (abeja); 0204 2-4: muestra 2 (hisopo); 0204 7-4: muestra 7 (líquido conteniendo supuestamente bromadiolona), entre paréntesis se indica el TR correspondiente.

tóxico para todos los mamíferos, nocivo por ingestión, que inhibe el metabolismo de la vitamina K y causa disminución de los factores de coagulación dependientes, provocando la reducción de la tasa de protrombina.

La Lista Internacional de Plaguicidas Altamente Peligrosos (Neumeister y Weber 2009), menciona, entre otras sustancias, a la bromadiolona como altamente tóxica; además de indicar ser persistente y bioacumulativa.

El documento de la Oficina de Información de Pesticidas de la Universidad de Florida PI-76 (Fishel 2010) cita a la bromadiolona como relativamente no tóxica.

Previo al procesamiento de las muestras se observó que tanto la abeja (muestra 1) como el hisopo (muestra 2) presentaron una coloración rojiza no muy intensa (fucsia claro). De las cinco botellas con líquidos sólo la que correspondía a la muestra 7 poseía color rojo intenso (fucsia). Debido a esta observación se pensó en que, si bien la sustancia responsable de la

muerte de las abejas podría ser cualquiera presente en la evidencia (muestras 3 a 6) o simplemente una sustancia tóxica cuya evidencia no hubiera sido secuestrada, era muy factible que hubiera una relación entre las muestras 1 y 2 con la muestra 7. Según el rótulo observado sobre la botella correspondiente a la muestra 7, el líquido de color fucsia debería contener bromadiolona, y a causa de los resultados negativos en la detección de otras sustancias tóxicas sobre la muestra 7 y en las muestras 1 y 2, y a la particularidad de la mencionada coloración, se puso especial interés en tratar de determinar o descartar la presencia de bromadiolona. Además surgió de la causa, según documentos aportados por la justicia, que testigos oculares habían visto personas realizando maniobras de vuelco de alguna clase de líquido sobre las colmenas. Este hecho sugirió la posibilidad de que las abejas hayan tenido contacto directo con alguna sustancia volcada sobre ellas.

La bromadiolona es difícil de detectar mediante GC-MS luego de cualquier tipo de derivatización practicada sobre la molécula con el fin de mejorar su detección. A pesar de la dificultad de detección por derivatización o en forma directa, la bromadiolona fue analizada mediante la localización de su producto de descomposición, el cual se informó detectable a través de un espectro de masas con picos de relación m/z de 158 (mayoritario), 173 y 143 (Sato 2005).

En los cromatogramas TIC de las muestras 1, 2 y 7, los picos resultantes correspondientes a PDB se mostraron en niveles confundibles con ruidos de base. Por tal motivo se procedió al reprocesamiento de los datos mediante selección de m/z 158, 173 y 143 alternativamente, mostrando picos cromatográficos claramente diferenciables de ruidos de base (Figura 1). El retraso en algo más de 1 minuto en el tiempo de retención respecto del trabajo publicado por Sato (2005) podría deberse a diferencias en la columna utilizada, sin embargo, los tiempos de retención en las tres muestras implicadas fueron similares (Figura 1). De todos modos, los espectros observados de las muestras 1, 2 y 7 (Figura 2) y el publicado como identificador de bromadiolona (Sato 2005) resultaron similares entre sí.

El espectro de masas obtenido en todos los casos, según biblioteca de espectros NIST, correspondió con mayor probabilidad a 1,2-dihidro-2,2,4-trimetil-quinolina (también conocido como Flectol H), cuya estructura molecular contiene un nitrógeno en lugar del esperado oxígeno resultante del clivaje de la molécula de bromadiolona. En el trabajo de Sato (2005) no se propuso una estructura química definida para el PDB, lo cual podría constituir el fundamento para encarar trabajos futuros con el fin de elucidar el comportamiento de la droga madre en el contexto del caso.

Finalmente, y a pesar de la escasez del tamaño de la muestra, el tiempo transcurrido entre la toma de muestras y su análisis, y de las dificultades iniciales en su hallazgo, se pudo establecer que las abejas tuvieron contacto con bromadiolona, aportando la evidencia química solicitada por la justicia. Sin embargo, el hallazgo del plaguicida sobre la abeja o colmena no sería suficiente para relacionar la muerte de esos insectos directamente a los elementos secuestrados en el campo vecino, siendo necesario en ese caso muestreos en otras propiedades aledañas y/o información adicional

que complemente los hallazgos vertidos en este reporte.

AGRADECIMIENTOS: Dedico un especial agradecimiento a la Lic. Sandra Karina Medici, la que me brindó toda su experiencia y asesoramiento. Además reconocer la invaluable ayuda en la corrección del manuscrito a la Dra. Marta N. Vacchino, Dra. Mónica Viviana Barg y el Dr. Guillermo Humberto Sturlini.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Esteve-Turrillas F.A. Preparación de Muestras para el Análisis de Plaguicidas Mediante Microondas y Fluidos Presurizados. Universitat de Valencia. Servei de Publicacions; 2007a. p. 37-43.

Esteve-Turrillas F.A. Preparación de Muestras para el Análisis de Plaguicidas Mediante Microondas y Fluidos Presurizados. Universitat de Valencia. Servei de Publicacions; 2007b. p. 88-89.

Fishel F.M. Pesticide Toxicity Profile: Coumarin and Indandione Rodenticides. University of Florida, IFAS Extension. Gainesville. PI-76, 2010.

McNair H.M., Miller J.M. Detectors. En: Basic Gas Chromatography. 2nd. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2009. p. 109.

Neumeister L., Weber C. PAN International list of Highly Hazardous Pesticides. Carina Weber Editor, PAN Germany for Pesticide Action Network International, 1/2009. Hamburg, January 16th; 2009. p. 12-13. [consulta 29 de mayo de 2011]; Disponible en: http://www.rapaluruaguay.org/agrotoxicos/Prensa/PAN_HHP-List_090116.pdf.

National Institute of Standards and Technology (NIST). Mass Spectral Libraries software V2.1. Perkin Elmer Inc.; 2006.

Sato S. Coumarin Rodenticides. En: Suzuki O., Watanabe K. Drugs and Poisons in Humans: A Handbook of Practical Analysis. Berlin. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2005. p. 599-608.

WHO/PCS/DS/96.88. WHO/FAO Data Sheet on Pesticides No. 88; July 1996. [consulta 29 de mayo de 2011]; 2.0 Toxicology And risks. Disponible en: http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest88_e.htm.

RESÚMENES DE TESIS

Evaluación del potencial tóxico del proteinato débil de plata

Quiroga, Patricia N.

Cátedra de Toxicología y química Legal. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Junín 956, 7°, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1113ADD)

pquiroga@ffyb.uba.ar

La plata (Ag) es un elemento que está presente naturalmente en la corteza terrestre como plata libre esparcida entre material rocoso, en depósitos minerales y tiene múltiples aplicaciones como tal o en aleaciones, por lo cual las actividades antrópicas constituyen una importante fuente de contaminación medioambiental. En tal sentido son de fundamental importancia, entre otras fuentes, las emisiones provenientes de fundiciones, la actividad minera, la quema de combustibles fósiles, la manufactura del cemento, del tratamiento de aguas residuales y de la fabricación y descarte de artículos que provienen de la industria fotográfica y de componentes eléctricos.

A fines de la década del 90 la ruptura de un "dique de cola" mediante el cual se retenían los residuos de materiales provenientes de la explotación de minas argentíferas en Bolivia, trajo aparejada la liberación de plata en el cauce de agua del río Pilcomayo. Estudios realizados en la Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA, sobre el contenido de plata en diferentes tejidos de peces autóctonos del mencionado río comprobaron su presencia en las diferentes especies icticas.

Las comunidades autóctonas que habitan en las márgenes del Pilcomayo tienen en dichos peces una importante fuente alimenticia, la que sería una vía de ingreso al organismo humano de la plata unida a proteínas.

Resulta, en consecuencia, de gran interés evaluar la toxicidad in vivo de la plata en combinación proteica. Por lo tanto se decidió estudiar en un modelo experimental la posible intoxicación con Ag en una combinación orgánica. El objetivo general de la presente tesis fue generar conocimiento sobre la toxicidad por vía oral de la Ag presente en el proteinato débil de plata (PDAg).

Debido a la poca bibliografía referente a dosis tóxicas de plata unida a proteínas se comenzó evaluando la toxicidad oral aguda en ratas

Wistar del PDAg disuelto en 1ml de agua, realizando la administración con una sonda gástrica en una única dosis de 2 g/kg. Ese valor se encuentra en el orden del utilizado en el test límite establecido por la OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Al grupo control se le suministró con el mismo procedimiento 1ml de agua de red.

Todos los animales tratados con esa dosis única de PDAg sobrevivieron y al igual que el grupo control no presentaron signos visibles de toxicidad durante los 14 días que duró el ensayo. En la cuantificación de Ag realizada por absorción atómica se encontraron diferentes concentraciones del metal en los tejidos estudiados: riñón, bazo, hígado, músculo psoas, hipocampo, cerebelo y cuerpo estriado, registrándose el valor más elevado en riñón. La absorción desde el tracto gastrointestinal sugeriría que atraviesa la barrera hematoencefálica. El estudio histopatológico puso de manifiesto lesiones en el riñón (hemorragia focal y vacuolización) y en el hígado (macro y microvacuolas difusas).

Con el fin de evaluar el efecto de la administración crónica del PDAg ($T_{\pi Ag}$) y compararlo con el producido por otra sal de plata (nitrato de plata $T_{NO_3 Ag}$), se administraron los compuestos argénticos, en pesos equivalentes a 222 mg Ag/ kg/ día, mediante el agua de bebida durante 6 meses. La dosis empleada se corresponde con el LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) del nitrato de plata consignado para ratas por ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). El grupo control (C) recibió agua durante los seis meses.

En este experimento fueron estudiadas la evolución ponderal, la actividad motora espontánea (AME), las alteraciones histopatológicas, la concentración de plata total en diferentes órganos y los siguientes parámetros bioquímicos: uremia, creatininemia, fosfatemia, fosfatasa alcalina, aspartatoaminotransferasa, ala-

ninoaminotransferasa, gamma-glutamyl transpeptidasa y lactato deshidrogenasa.

Los resultados del registro de peso corporal de los diferentes grupos demostraron una disminución significativa $P < 0,01$ en el grupo T_{NO_3Ag} comparado con el $T_{\pi Ag}$ o el C y que el grupo $T_{\pi Ag}$ en ningún momento de la experiencia mostró diferencias de peso corporal respecto del C.

Los estudios de "campo abierto" en los que se registro la AME al mes, a los tres y seis meses de tratamiento mostraron que no se produjeron modificaciones en el patrón de actividad motora espontánea en ninguno de los grupos.

La plata proveniente de las sales argénticas se acumuló en distintos órganos. Las diferencias más importantes se encontraron en la cantidad acumulada, que fue menor en los animales $T_{\pi Ag}$, siendo en este grupo el riñón el órgano donde la concentración fue más elevada. La histopatología renal mostró daño vascular capilar, con dilatación venular, alteración de la pared vascular, aumento de la celularidad perivascular y zona con hemorragia focal.

Los parámetros bioquímicos estudiados no

pusieron de manifiesto alteraciones funcionales renales o hepáticas.

En respuesta a la hipótesis de trabajo, y en base a los resultados emergentes de los estudios experimentales, este trabajo de tesis postula que en las ratas Wistar la toxicidad del PDAg y del nitrato de plata es diferente siendo menor la del PDAg.

El PDAg produce lesiones histológicas en el riñón -órgano donde más se acumula- tanto con la alta dosis empleada en el estudio agudo como luego de la exposición a largo plazo a una dosis menor. Esas observaciones son reportadas, a nuestro entender, por primera vez para ese compuesto (PDAg) y el hallazgo implica un adelanto en el conocimiento de la toxicidad de los compuestos de plata. Este trabajo de tesis plantea la necesidad de investigaciones futuras que permitan conocer la fisiopatología molecular de los cambios morfológicos encontrados y sus posibles alteraciones funcionales.

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

Director: Dr. Otmaro E. Roses

Co-Director: Dr. Juan C. Perazzo Rossini

Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce

Vera, María Solange

Laboratorio de Limnología, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Int. Güiraldes 2160, (C1428EHA), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina & Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

msolangevera@ege.fcen.uba.ar

El glifosato (N-(fosfometil) glicina) es el herbicida organofosforado de aplicación post-emergente -sistémico y no selectivo- más importante y más ampliamente utilizado en todo el mundo. Su principal mecanismo de acción en plantas y varios microorganismos es inhibir la actividad de la 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintetasa, una enzima de la vía metabólica del shikimato para la biosíntesis de corismato, precursor de una amplia variedad de metabolitos aromáticos de las plantas. El glifosato provoca de esta manera la inhibición de la síntesis de aminoácidos aromáticos, la reducción de la síntesis de proteínas y otras moléculas que en última instancia llevan a la planta a una muerte celular prematura. Desde la introducción en el año 1996 de los cultivos genéticamente modificados tolerantes al glifosato, el área cultivada en el mundo, pasó de 1,7 millones a 133 millones de ha y el consumo se ha incrementado de la misma manera. Actualmente se utilizan en el mundo 2000 millones de litros de glifosato por año y la República Argentina posee el 8,5% de este consumo.

El objetivo general de esta tesis doctoral fue analizar el efecto del herbicida glifosato y algunos de sus formulados comerciales en el perifiton de agua dulce, en su interacción con otras comunidades microbianas desde un punto de vista integrado y ecológico a escalas comunidad y ecosistema. Para ello, se realizaron experimentos al aire libre utilizando mesocosmos, simulando cuerpos de agua someros y permanentes, y utilizando microcosmos en condiciones controladas de laboratorio y al aire libre, aparentando charcos temporarios como los que pueden formarse luego de una lluvia dentro de los campos de cultivo. A escala comunidad se estudió el perifiton en laboratorio, analizando comparativamente los posibles cambios en su estructura

por adición de una sola dosis de glifosato grado técnico y el formulado Glifosato Atanor®. A escala ecosistema se estudió el efecto de una única aplicación de algunos formulados de glifosato, Roundup® y Glifosato Atanor®, sobre el perifiton y otras comunidades acuáticas microbianas (fitoplancton, bacterioplancton y zooplancton) analizando tanto su estructura y funcionalidad como las interacciones entre estas comunidades y con el medio abiótico circundante. Los sistemas tratados con herbicida registraron un incremento significativo del fósforo total. En el caso del Roundup®, el aumento del fósforo se debió al aporte dado directamente por el glifosato, sin embargo en el caso del Glifosato Atanor® el gran incremento del fósforo total no fue totalmente explicado por la adición del glifosato del formulado. El excedente de fósforo provendría de los aditivos del Glifosato Atanor®, lo que pone en evidencia la imperiosa necesidad de que figure específicamente la composición química del formulado completo en el marbete de los formulados comerciales. Se registró mortandad de diatomeas e incremento de cianobacterias perifíticas, retraso en la colonización del perifiton y aumento de bacterias y picocianobacterias planctónicas en presencia del pesticida. También se observaron impactos directos e indirectos del herbicida en el zooplancton. Los efectos sobre las variables de masa perifíticas resultaron opuestos entre los mesocosmos tratados con Roundup® y los microcosmos adicionados tanto con Glifosato Atanor® como con el ingrediente activo. Se observó un efecto a largo plazo en los cuerpos de agua con el pasaje de aguas claras a turbias por efecto del herbicida, resultando el cambio mucho más rápido en reservorios de volumen reducido. Nuestros resultados demuestran que el glifosato y sus formulados alteran significativamente la estructura y funcionamiento del

perifiton, de las otras comunidades microbianas y la calidad del agua en general, favoreciendo la eutroficación y la tendencia a que los cuerpos de agua dulce cambien de tipología, pasando de claros a turbios. El efecto es directo sobre las comunidades autótrofas y se extiende a través de las tramas tróficas. Como conclusión general de la tesis doctoral se determinó que el glifosato no es inocuo para el ambiente y por lo tanto, los cuerpos de agua naturales se hallan en riesgo de ser afectados

directamente por su toxicidad como por los efectos indirectos que genera en las comunidades biológicas. Si tenemos en cuenta la aplicación intensiva y recurrente de altas cantidades de formulados de glifosato, tanto en la República Argentina como en toda la región de América Latina, el ambiente corre peligro de ser afectado de forma drástica.

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas.

Director: Haydeé N. Pizarro.

Agradecimientos a los revisores 2009-2011

La calidad de los artículos publicados en Acta Toxicológica Argentina es posible gracias a la cooperación y dedicación de numerosos profesionales prestigiosos. El Comité de Redacción quiere brindar un merecido reconocimiento a todos aquellos que han dedicado desinteresadamente su tiempo a revisar, evaluar y comentar los manuscritos enviados a esta revista.

Agradecemos la participación de los siguientes revisores:

Adolfo de Roodt
Adriana Ridolfi
Alejandro Carbajal Saucedo
Alicia Ronco
Bibiana Kaiser Dutra
Carlos Damín
Cecilia Travella
Cristina Pérez Coll
Cristina Rubio
Daniel Castro
Edda Villaamil
Elena Matos
Fabiana Lo Nostro
Francisco Oscar de Siqueira França
Gina D'Suze
Gladis Magnarelli
Guendalina Turcato Oliveira
Guillermo Mentrut
Hugo Massaldi
Javier Barragán
Juan Carlos Giménez
Leda Gianuzzi
Lucrecia Ferrari
Luis Ferrari
Marcela González Cid
Marcela Regnando
María del Carmen Ríos de Molina
Marta Carballo
Moisés Knochen
Mónica Montagna
Otmaro Roses
Patricia Quiroga
Raúl Badini
Ricardo Fernández
Rodolfo Touzet
Rodrigo Da Cuña
Sandra Demichelis
Sergio Fusch
Sergio Saracco
Talita Sarah Mazzoni
Tomás Orduna
Valentina Olmos

ÍNDICE DE AUTORES 2008-2011

Autor	Volumen	Número	Página
Alayo, Marianella	19	1	19
Alfonso Castillo, Alfredo	16	2	34
Alvariño, Lorena	19	1	19
Avila Carreras, Natalia M.	16	1	14
Bénard-Valle, Melisa	18	1	30
Bianco, Gladys	16	1	14
Bonifacio, Juan	19	1	19
Borges de Carvalho, Genickson	18	2	54
Bovi Mitre, María G.	16	1	14
Cancela, Liliana M.	19	2	61
Casas Quiroga, Isabel C.	16	2	27
Chain Sergio	16	1	10
Cholich, Valeria	16	1	1
Contreras Zuñiga, Eduardo	16	1	5
Contreras Zuñiga, Eduardo	16	2	27
Cossío Torres, Patricia	19	1	5
Costa de Oliveira, Vanessa	19	2	55
De Romedi, Adriana	16	2	41
de Roodt, Adolfo R.	18	1	10
de Roodt, Adolfo R.	19	2	55
Díaz Bestard, Jorge	16	2	34
Díaz-Barriga Martínez, Fernando	19	1	5
Docampo, Cynthia P.	19	1	16
Dolab, Jorge A.	18	1	10
Domínguez Cortinas, Gabriela	19	1	5
Esmérito Betancourt, Juan	16	2	34
Estévez, Judith	18	1	10
Etiennot, Alberto	18	2	40
Evangelista de Duffard, Ana María	16	1	1
Farías, Silvia S.	16	1	14
Feldman, Gabriela	16	1	10
Fernández, María E.	19	1	16
Ferrari, Ana	17	1	8
Franco-Sánchez, Guadalupe	17	2	56
Gait, Nilda	17	2	41
García, Graciela	16	1	1
González, Inés	17	2	41
Gould, Eduardo G.	18	1	10
Gould, Jorge	18	1	10
Guerrero-Castilla, Angélica	18	18	21
Hansen, Cristian	17	2	41
Hernández Cruz, María T.	19	1	5
Hernández, Julieth	16	1	5
Herrera-Portugal, Crispín	17	2	56
Iannacone, José A.	19	1	19
Kumar, Abhishek	18	1	5
Lanari, Laura C.	19	25	55
Lascano, Cecilia I.	17	1	8
Laskowicz, Rodrigo D.	19	2	55

Autor	Volumen	Número	Página
Litwin, Silvana	18	1	10
Llebeilli, Ruth	17	2	41
Loewy, Ruth M.	17	1	1
Lucero, Patricia	16	2	41
Mamani, Nancy	19	1	19
Mariano, Mauro	19	1	19
Martínez Manrique, Clara E.	16	2	34
Martínez Riera, Nora	16	1	10
Martínez, Alejandra	16	1	1
Martínez, Samanta A.	19	2	61
Merini, Luciano J.	18	1	28
Miglio, María Cristina	19	1	19
Mishra, Diwakar	18	1	5
Moctezuma González, Claudia L.	19	1	42
Morales Villegas, Raúl	19	1	5
Nassetta, Mirtha	16	2	41
Navoni, Julio A.	17	2	48
Navoni, Julio A.	18	2	29
Odierna, Edgar	17	2	41
Olivera, Nancy M.	17	2	48
Olivera, Nancy M.	18	2	29
Olivero-Verbel, Jesús	18	1	21
Olmos, Valentina	17	1	20
Pardo Terga, Ana M.	16	2	34
Paredes, Christian	19	1	19
Pechen de D'Angelo, Ana M.	17	1	1
Peirano, Alberto	17	2	41
Pelayes Cruz, Marina	17	2	56
Pérez Solís, Blanca L.	17	2	56
Piazza, Augusto	18	2	40
Picollo, María I.	19	1	32
Prasad, ManiRam	18	1	5
Puente Zapata, Edgar	16	2	34
Quiroga, Patricia N.	17	1	20
Quiroga, Patricia N.	19	2	85
Regner, Pablo I.	19	2	55
Salas Martínez, Hilario	16	2	34
Salinas, Guillermo Pablo	19	2	80
Santo-Orihuela, Pablo L.	19	1	32
Sassone, Adriana H.	19	1	44
Savini, Mónica C.	17	1	1
Schlottfeldt Trujillo, Yolanda	17	2	56
Sedeño Soularit, Narvis	16	2	34
Soria, Norma	16	1	10
Sotomayor, Verónica	17	1	8
Srivastav, Ajai K.	18	1	5
Srivastav, Sunil K.	18	1	5
Stashenko, Elena	18	1	21
Suárez, Andrés	17	2	41
Tosi, Analía P.	17	1	1
Urbano de Araujo, Marcos A.	18	2	54

Autor	Volumen	Número	Página
Van Brussel, Evelyn	19	1	5
Venturino, Andrés	17	1	8
Vera, María S.	19	2	87
Villaamil Lepori, Edda C.	17	2	48
Villaamil Lepori, Edda C.	18	2	29
Virgolini, Miriam B.	19	2	61
Vitória de Moura, Maria F.	18	2	54
Zuluaga, Sandra X.	16	1	5
Zuluaga, Sandra X.	16	2	27

ÍNDICE DE TEMAS 2008-2011

Título	Volumen	Número	Página
Acute toxicity of <i>Euphorbia royleana</i> Boiss (Euphorbiaceae) latex on freshwater catfish, <i>Heteropneustes fossilis</i> (Siluriformes, Heteropneustidae)	18	1	5
Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en <i>Rhinella arenarum</i>	17	1	8
Bromadiolone: un caso judicial relacionado con la muerte de abejas	19	2	80
Buenas prácticas de aplicación en cultivos planos extensivos. Distancias a zonas urbanas. Criterios y soluciones	18	2	40
CHICOS Y PIBES, propuestas innovadoras para la atención de la salud ambiental infantil en América Latina	19	1	5
Comparación entre dos métodos de producción para la elaboración de antivenenos ofídicos	18	1	10
Contribution of general esterases to pyrethroid resistant <i>Triatoma infestans</i> (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia	19	1	32
Cuantificación de arsénico por inyección en flujo-generación de hidruros-espectrometría de absorción atómica (IF-GH-EAA) previa derivatización con L-cisteína. Validación y comparación intermetodológica utilizando dos técnicas de referencia	18	2	29
Daño al ADN en mujeres expuestas al humo de la leña en Chiapas, México	17	2	56
Determinação de metais classificados como de importância toxicológica no molusco bivalve <i>Anadara notabilis</i> (Röding, 1798) encontrado em Galinhos, Rio Grande do Norte, Brasil	18	2	54
Determinación de fluoruro en aguas de Rinconadillas (Provincia de Jujuy)	16	1	14
Envenenamiento de <i>Chelydra serpentina</i> (Reptilia, Testudines) por la picadura de <i>Tityus trivittatus</i> (Scorpiones, Buthidae)	19	2	55
Envenenamiento por múltiples picaduras de abejas y choque anafiláctico secundario: descripción de un caso clínico y revisión de la literatura	16	2	27
Escorpionismo: presentación de un posible caso grave ocurrido en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires	19	1	16
Estudio de las alteraciones bioquímicas, histopatológicas y ultraestructurales producidas por la administración oral a largo plazo de cotinina en ratas. Comparación con nicotina	19	1	44
Evaluación de la exposición ambiental a plaguicidas orgánicos persistentes en dos barrios de la Provincia de Córdoba	16	2	41
Evaluación de la toxicidad aguda oral e irritación sobre mucosa bucal de la solución CM-95 tratada magnéticamente	16	2	34
Evaluación de riesgo por plaguicidas sobre aguas superficiales de la región Norpatagónica Argentina	17	1	1
Evaluación del potencial tóxico del proteinato débil de plata	19	2	85
Evaluación del riesgo ambiental de carbofurano en bioensayos con organismos no blanco	19	1	19

Título	Volumen	Número	Página
Fitorremediación de herbicidas organoclorados: diseño de estrategias biotecnológicas para su aplicación en la producción agrícola	18	1	28
Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce	19	2	87
Implicancia terapéutica del estrés oxidativo como mecanismo de acción del plomo	19	2	61
Inmunomarcación de neuronas dopaminérgicas en cortes flotantes de hipotálamo de rata: preservación alternativa del tejido nervioso	16	1	1
Intoxicación por paraquat: descripción de un caso clínico	16	1	5
Investigación de cocaína y marihuana en meconio de neonatos atendidos en un hospital público. Primera experiencia realizada en la ciudad de Córdoba, Argentina	17	2	41
Microalbuminuria en ratas tratadas con plomo en bajas concentraciones	16	1	10
Optimización y validación metodológica de la cuantificación de arsénico por inyección en flujo- generación de hidruros- espectrometría de absorción atómica (IF-GH-EAA) previa derivatización con L-cisteína	17	2	48
Producción de un fragmento de anticuerpo recombinante quimérico anti-esfingomielinasa D contra la mordedura de la araña <i>Loxosceles</i>	19	1	42
Revisión de la toxicocinética y la toxicodinamia del ácido cianhídrico y los cianuros	17	1	20
Similitud bioquímica e inmunoquímica entre venenos de coralillos norteamericanos	18	1	30
Toxicity of the essential oil of the cytral chemotype of <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	18	1	21

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 responder.

Na primeira página deverá estar indicado: título do trabalho (maiúscula), nomes e sobrenomes completos de todos os autores; lugar de trabalho (nome da instituição e endereço postal), se 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** corres-

pondentes. 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 patients. *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.htm>Article.

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.