

ISSN 0327-9286

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 20
N° 2
Diciembre 2012

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

Tesorera

María L. Oneto

Secretario

Gerardo D. Castro

Vocales

Marcela M. López Nigro

Patricia N. Quiroga

Mónica C. Napoli

Vocales Suplentes

Gabriela Fiorenza

María C. Travella

Marta D. Mudry

Comité Científico

Nelson Albiano

José A. Castro

Lucrecia Ferrari

Mirtha Nassetta

Marta M. Salseduc

Órgano 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, *FMed, UBA; MSAL de la Nación*

Comité de Redacción

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

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

Ricardo A. Fernández, *Hosp. Infantil Municipal, Cba; FMed, UCCor*

Susana I. García, *FMed, UBA; PRECOTOX, MSAL de la Nación*

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

Comité de apoyo

Jorge Zavatti, *Dto. de Control Ambiental, Aluar*

Vanessa Oliveira, *FMed, UBA; ProNCEZ, MSAL de la Nación*

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 C. Villaamil Lepori, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*

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

INDICE

(CONTENTS)

Artículos

Ocorrência de sintomas respiratórios em trabalhadores de oficinas de pintura automotiva na região do Vale do Rio dos Sinos, Rio Grande do Sul, Brasil <i>Dellaméa, Maria de Fátima F.; Siebel, Anna Maria; Machado de Souza, Rafael; Basso da Silva, Luciano; Teixeira, Paulo José Z.</i>	51
Estrés oxidativo en cefalópodos: I. Determinación de TBARS <i>Fassiano, Anabella Victoria; Ortiz, Nicolás; Ríos de Molina, María del Carmen</i>	57
Estudio comparativo de la frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos de tres especies ícticas <i>Pollo, Favio E.; Salas, Nancy E.; Mancini, Miguel A.; Martino, Adolfo L.</i>	62
Antioxidant effect of aqueous extract of propolis on hepatotoxicity induced by octylphenol in male rats <i>Saleh, Eman M.</i>	68
Resúmenes de tesis	
Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente de coral <i>Micrurus tener</i> <i>Bénard-Valle, Melisa</i>	82
Estudio de la glicoproteína P linfocitaria humana <i>Cortada, Catalina María</i>	84
Efecto de glutatión encapsulado en niosomas y glutatión libre en la intoxicación con acetaminofeno en gatos <i>Denzoin Vulcano, Laura A.</i>	85
Instrucciones para los autores	87

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

Ocorrência de sintomas respiratórios em trabalhadores de oficinas de pintura automotiva na região do Vale do Rio dos Sinos, Rio Grande do Sul, Brasil
Occurrence of respiratory symptoms in automotive shop workers from Vale do Rio dos Sinos, Rio Grande do Sul, Brazil

Dellaméa, Maria de Fátima F.¹; Siebel, Anna Maria¹; Machado de Souza, Rafael¹; Basso da Silva, Luciano^{2*}; Teixeira, Paulo José Z.^{2,3}

¹Universidade Feevale, RS 239, 2755. CEP 93352-000, Novo Hamburgo, RS, Brasil. Tel. +55 51 35868800, fax +55 51 35868836. ²Programa de Pós Graduação em Qualidade Ambiental, Universidade Feevale, Novo Hamburgo (RS), Brasil. ³Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre (RS), Brasil.

*lucianosilva@feevale.br

Recibido: 22 de marzo de 2012
Aceptado: 22 de agosto de 2012

Resumo. Pintores, em geral, estão expostos a uma grande variedade de substâncias químicas que podem induzir doenças respiratórias. O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de sintomas respiratórios, assim como estimar parâmetros de função pulmonar, em trabalhadores de oficinas automotivas na região do Vale do Rio dos Sinos, Rio Grande do Sul, Brasil. Foi realizado um estudo transversal com 20 trabalhadores do gênero masculino, no qual os dados foram obtidos através de entrevistas e espirometria. Foi observado que 90% dos trabalhadores apresentaram sintomas respiratórios de vias aéreas superiores e 35% exibiram manifestações de vias aéreas inferiores. Asma brônquica ocupacional foi observada em 15% dos trabalhadores, e rinite alérgica e rinite ocupacional em 10%. A presença de problemas respiratórios pode estar associada ao uso reduzido de equipamentos de proteção individual.

Palavras chave: Sintomas respiratórios; Função pulmonar; Pintores automotivos; Exposição ocupacional.

Abstract. Painters in general are exposed to a wide variety of hazardous substances and several of these chemicals may induce respiratory disease. The aim of this study was to investigate the occurrence of respiratory symptoms and lung function in automotive shop workers in the Vale do Rio dos Sinos, Rio Grande do Sul, Brazil. A cross sectional study was performed with 20 male workers, in which data were collected through interviews and spirometry. It was found that 90% of workers had respiratory symptoms of upper airway and 35% had lower airway manifestations. Occupational asthma was observed in 15% of workers and occupational rhinitis and allergic rhinitis in 10%. The presence of respiratory problems may be associated with reduced use of personal protective equipment.

Keywords: Respiratory symptoms; Lung function; Automotive painters; Occupational exposure.

INTRODUÇÃO

Pintores estão expostos a uma ampla variedade de substâncias que oferecem risco à saúde, como hidrocarbonetos aromáticos, hidrocarbonetos alifáticos, cetonas, álcoois e ésteres, os quais são componentes de tintas, thinners, catalisadores e outros materiais de pintura (Lee *et al.* 2003). A pintura automotiva também está entre as profissões que resultam em exposição a metais pesados, tais como chumbo, cádmio e cromo. Durante as atividades de pintura, componentes metálicos ficam dispersos e suspensos no ar por um período de tempo suficiente para serem inalados (Vitayavirasuk *et al.* 2005).

Os isocianatos são compostos com baixo peso molecular e alta reatividade amplamente utilizados na produção de vários produtos, incluindo tintas, resinas e selantes (Sparer *et al.* 2004). A exposição aos diisocianatos é causa conhecida de dificuldade respiratória, asma e diminuição da função pulmonar (Tornling *et al.* 1990; Randolph *et al.* 1997; Glindmeyer *et al.* 2004). No Brasil, oficinas de reparação de veículos automotores constituem um ramo de atividade caracterizado por organizar-se na forma de micro e pequenas empresas. Embora constitua atividade cujos trabalhadores estejam expostos a numerosos agentes agressores à saúde, trata-se de um ramo ainda muito pou-

co estudado (Binder *et al.* 2001). Recentemente, foi demonstrado que na região do Vale do Rio dos Sinos, no Estado do Rio Grande do Sul, os trabalhadores de oficinas automotivas apresentam taxas elevadas de danos ao DNA, indicando exposição ocupacional a substâncias químicas (Siebel e Basso da Silva 2010). O objetivo do presente trabalho é avaliar a ocorrência de sintomas respiratórios e a função pulmonar em trabalhadores de oficinas automotivas desta mesma região.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo do tipo observacional, de caráter exploratório, com delineamento transversal. O mesmo foi realizado com 20 trabalhadores do gênero masculino, os quais trabalhavam diretamente com substâncias químicas em quatro oficinas de pintura automotiva na cidade de Novo Hamburgo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A escolha dos locais deu-se de forma aleatória, em função do consentimento dos proprietários das oficinas para a realização do estudo. Nestas oficinas, foram convidados a participar os trabalhadores que estavam ocupacionalmente expostos a produtos químicos da pintura automotiva, os quais desempenhavam as funções de pintores, preparadores e coloristas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Feevale.

Após a leitura e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, procedia-se a aplicação de um questionário para colher informações sobre a presença de diversos sintomas respiratórios e as condições do ambiente de trabalho. O questionário para identificação dos sintomas respiratórios foi adaptado e estruturado a partir de um questionário validado e utilizado em outros dois estudos (Menezes *et al.* 2005; Costa *et al.* 2007). O questionário foi composto por 95 perguntas, entre as quais 81 fechadas e 14 abertas.

Para avaliar a função pulmonar destes indivíduos, foi realizado o exame de espirometria, com um aparelho MicroLab 3500 da Micro Medical. Antes de proceder ao exame, foi aplicado um questionário para detectar possíveis problemas que contraindicassem a sua realização. Quando não havia contraindicações, os indivíduos foram submetidos à espirometria, que consistia na colocação de um bucal descartável na boca, conectado ao aparelho e um clipe nasal, para que não ocorresse perda de ar pelo nariz. Foi solicitado ao indivíduo que realizas-

se uma inspiração profunda e uma expiração forçada e prolongada. Após três destas manobras, os maiores valores obtidos da capacidade vital forçada (CVF) e do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) foram escolhidos para a interpretação do teste. Quando alterações foram detectadas nesta primeira fase, procedeu-se à aplicação de 200 microgramas do broncodilatador fenoterol para a prova farmacodinâmica. Quinze minutos após a aplicação do broncodilatador três manobras semelhantes à descrita anteriormente foram repetidas, bem como a escolha dos maiores valores de CVF e VEF₁ obtidos.

Sob o enfoque mais amplo, os participantes foram classificados como portadores ou não de manifestações respiratórias das vias aéreas superiores e inferiores. Como portadores de sinais e sintomas específicos das vias aéreas superiores, foram classificados os indivíduos que apresentavam prurido nasal, secreção nasal, espirro e/ou obstrução nasal. Como portadores de sinais e sintomas das vias aéreas inferiores foram classificados os indivíduos referindo sibilos (chiado no peito), tosse, expectoração, dispneia, expectoração crônica, dispneia no trabalho, sibilos no trabalho, tosse crônica (três ou mais semanas de duração) e os diagnósticos clínicos de asma brônquica e rinite alérgica.

Um caso de asma brônquica foi definido pela presença de dispneia, tosse, sibilos ou opressão retroesternal recorrente, nos últimos anos, após quadro gripal ou não, especialmente quando o indivíduo estava de folga do trabalho, ou viajando, e apresentava história de asma na infância (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia 2004). A asma ocupacional foi definida mediante a presença destes sintomas, no período em que se encontrava trabalhando (Fernandes *et al.* 2006). A rinite alérgica foi definida na presença de prurido nasal, obstrução nasal e/ou secreção nasal, além da presença de espirros frequentes; e a rinite ocupacional foi definida na presença destes sintomas durante o período de trabalho (Ibiapina *et al.* 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os trabalhadores apresentaram uma média de idade de $32,4 \pm 13,5$ anos (variação de 19 a 45 anos), sendo 80% destes com escolaridade até o ensino fundamental. A prevalência de tabagismo foi de 40,0%. O tempo médio de exposição diária a substâncias

químicas foi de 9 horas, durante cinco dias por semana. Mais da metade (61%) do total de indivíduos declarou estar nesta atividade há mais de dez anos. Foi observado que o equipamento de proteção específico para o aparelho respiratório, como a máscara, era sempre usado por somente 15% dos 20 trabalhadores (40% utilizavam às vezes e 45% não utilizavam).

A presença de manifestações respiratórias de vias aéreas superiores (VAS) foi detectada em 18 trabalhadores investigados (90%), sendo a

obstrução nasal a mais comum (15 trabalhadores ou 75,0%), seguida de espirros em salva (67,4%), e secreção e prurido nasal (20,0%) (Figura 1). Aproximadamente 50% dos trabalhadores apresentaram obstrução nasal e espirro durante o trabalho. A obstrução nasal também foi o sintoma respiratório mais frequente em pintores automotivos na Tailândia (Vitayavirasuk *et al.* 2005). Em relação ao diagnóstico de doenças das VAS, dois trabalhadores (10,0%) apresentaram rinite ocupacional e dois apresentaram rinite alérgica.

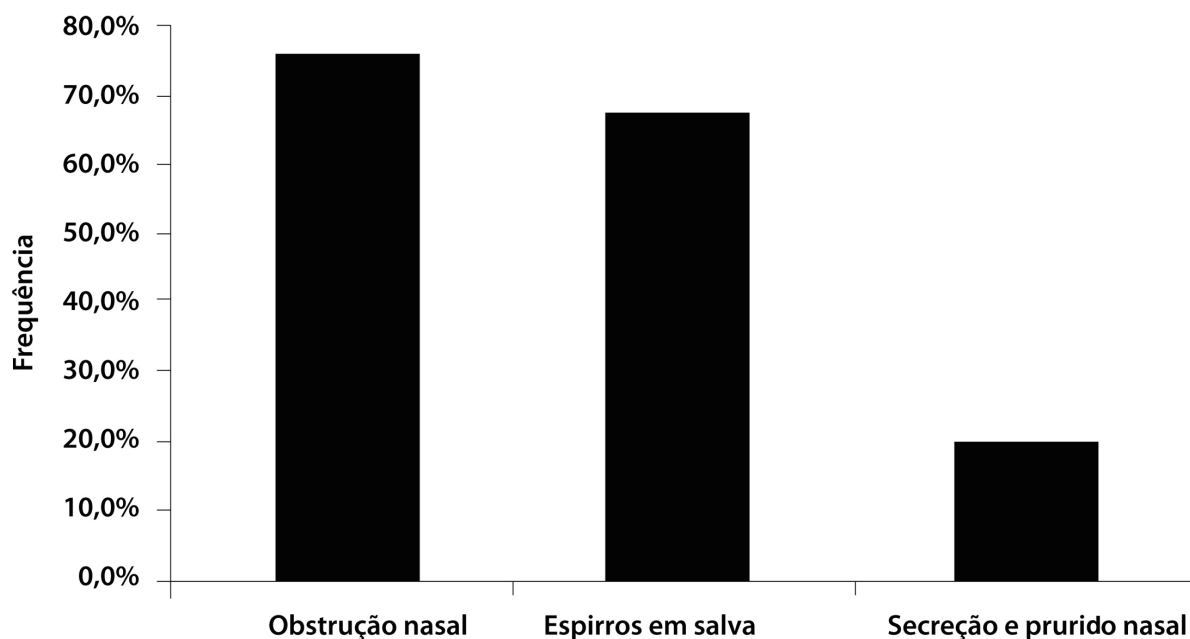


Figura 1. Frequência de manifestações respiratórias de vias aéreas superiores em trabalhadores de oficina automotiva (n=20).

Manifestações das vias aéreas inferiores (VAI) foram detectadas em sete trabalhadores (35,0%). Dentre as manifestações mais comuns nas VAI, observou-se a presença de expectoração, tosse e dispneia em, respectivamente, 30,0%, 20,0% e 5,0% dos trabalhadores (Figura 2). Com relação às manifestações das VAI no local de trabalho, seis trabalhadores (30,0%) relataram a presença mais frequente de expectoração e dois (10%) relataram a presença de tosse. A presença de sibilos não foi detectada e a dispneia pós-exposição, ou durante o trabalho, foi relatada por apenas um trabalhador (5,0%).

Em um estudo realizado na Noruega, não foi observada diferença significativa entre pintores automotivos e um grupo controle de indivíduos não expostos a substâncias químicas com relação à ocorrência de sintomas respiratórios agudos, incluído das vias aéreas superiores. Entretanto, deve ser ressaltado que as amostras de ar dos locais de trabalho indicaram baixo nível de exposição a solventes orgânicos e que todos os trabalhadores relataram o uso de equipamentos de proteção individual (Moen e Hollund 2000).

No presente estudo, asma brônquica foi diagnosticada em três trabalhadores (15,0%). Indi-

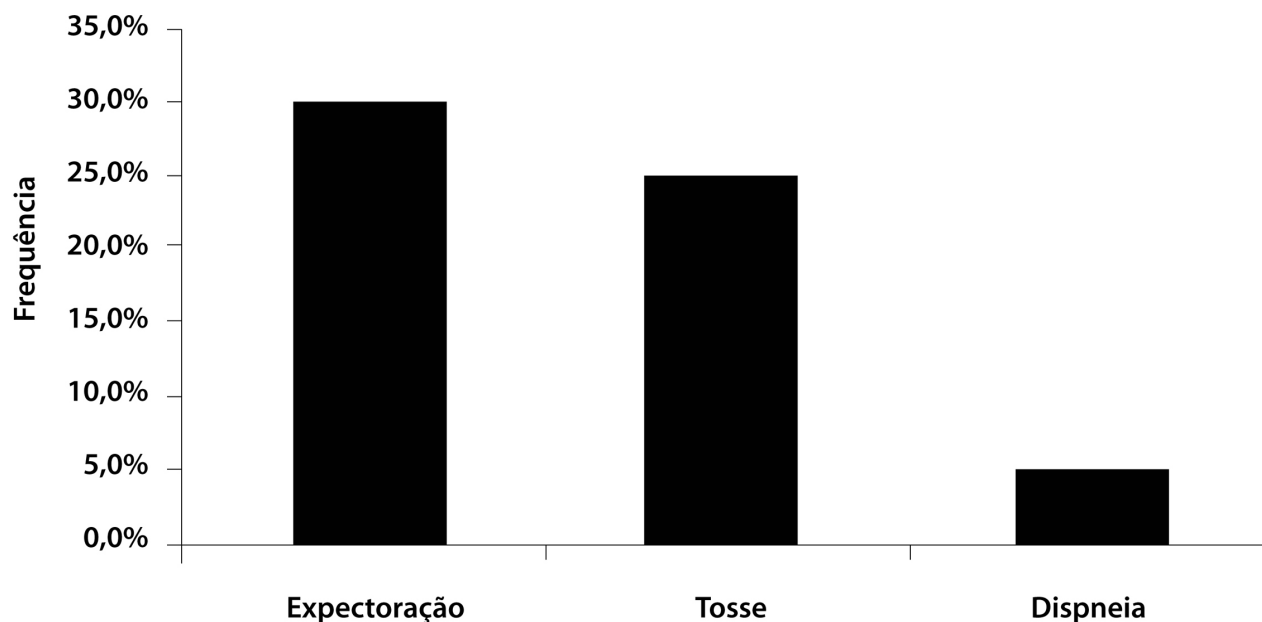


Figura 2. Frequência de manifestações respiratórias de vias aéreas inferiores em trabalhadores de oficina automotiva (n=20).

víduos expostos a compostos contendo diisocianatos, tais como os pintores, apresentam uma das maiores incidências de asma ocupacional em países industrializados, variando de 1% a 20% (Bernstein 1996, Karjalainen *et al.* 2000, Ameille *et al.* 2003).

A avaliação da função pulmonar demonstrou que as médias das variáveis espirométricas dos trabalhadores encontram-se dentro dos limites da normalidade (*Tabela 1*) e somente um indivíduo apresentou alteração, sendo diagnosticado um distúrbio ventilatório restritivo. Este achado espirométrico é diferente do esperado para os indivíduos portadores de asma ocupacional que, quando apresentam alterações funcionais espirométricas, estas são do tipo obstrutivo. Em um estudo com adolescentes aprendizes de pintor automotivo, foi demonstrado obstrução do fluxo aéreo com a queda do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1) (Eifan *et al.* 2005). Parker *et al.* (1991) observaram que a redução da função pulmonar em trabalhadores de oficinas de pintura automotiva estava associada ao tempo de trabalho e ao não uso de cabines de pintura. Em outro estudo, a redução da função pulmonar foi observada somente nos pintores automotivos que eram fumantes (Tornling *et al.* 1990). No presente estudo não fo-

ram observadas diferenças significativas entre fumantes e não fumantes tanto para a função pulmonar como para a presença de sintomas respiratórios.

Em relação a outros sintomas associados à exposição a produtos químicos, o mais frequente foi dor de cabeça (70%), seguido de irritação de garganta (30%) e irritação de pele (30%). Feldman *et al.* (1999) destacam que sintomas não específicos, como dor de cabeça e insônia, podem indicar exposição a substâncias tóxicas e risco aumentado de desenvolver efeitos mais persistentes.

No Brasil, as micro e pequenas empresas, entre as quais se encontram a maioria das oficinas de reparação de veículos automotores, são importantes do ponto de vista de geração de emprego e ocupação de mão de obra, mas raramente têm sido investigadas quanto às condições de saúde e segurança de seus trabalhadores. A escassez de estudos provavelmente relaciona-se à dificuldade de acesso a essas empresas, como acontece com micro e pequenas empresas de uma maneira geral (Binder *et al.* 2001).

Cabe destacar a importância de estudos com amostras maiores, para que a influência de variáveis como idade, tempo de exposição e tabagismo possa ser analisada com poder es-

Tabela 1. Variáveis de função pulmonar em trabalhadores de oficinas de pintura automotiva da Região do Vale do Rio dos Sinos, RS.

Variáveis	Média ± Desvio padrão
VEF ₁ L	3,78 ± 0,59
VEF ₁ % previsto	95,25 ± 11,38
CVF L	4,46 ± 0,56
CVF % previsto	96,75 ± 10,40
VEF ₁ / CVF	84,8 ± 6,55

tatístico adequado. Este conhecimento permitirá o desenvolvimento de estratégias públicas na prevenção, orientação e regulamentação mais efetiva desta atividade profissional. Considerando os dados do presente estudo em que 90% dos trabalhadores apresentaram algum sintoma respiratório e que apenas 15% relataram o uso constante de EPI, torna-se evidente a necessidade de capacitação contínua para estes trabalhadores. Neste sentido, o Ministério do Trabalho e Emprego e a legislação em vigor exigem que os empresários forneçam equipamentos de proteção e treinamento para os seus funcionários. Entretanto, apesar de o Serviço Social da Indústria (SESI) oferecer cursos de capacitação para os trabalhadores da indústria de reparação de veículos, um trabalho realizado no Estado de Roraima demonstrou que a grande maioria dos trabalhadores nunca participa de capacitação ou raramente as frequenta (Federação das Indústrias do Estado de Roraima 2007). Estes dados sugerem a necessidade de campanhas de conscientização dos trabalhadores sobre os perigos a que estão expostos e da importância da formação continuada.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Ameille J., Pauli G., Calastreng-Crinquand A., Vervloet D., Iwatsubo Y., Popin E., Bayeux-Dunglas M.C., Kopferschmitt-Kubler M.C. Reported incidence of occupational asthma in France, 1996–99: the ONAP programme. *Occup Environ Med.* 2003;60(2):136–141.
- Bernstein J.A. Overview of diisocyanate occupational asthma. *Toxicology.* 1996;111(1-3):181-189.
- Binder M.C.P., Wernick R., Penaloza E.R., Almeida I.M. Condições de Trabalho em Oficinas de Reparação de Veículos Automotores de Botucatu (São Paulo). Nota prévia. *Informe Epidemiológico do SUS.* 2001;10(2):67-79.
- Costa M., Teixeira P.J.Z., Freitas P.F. Manifestações respiratórias e doenças de vias aéreas: prevalência e fatores de risco em suinocultores de Braço do Norte, Santa Catarina. *J Bras Pneumol.* 2007;33(4):380-388.
- Eifan A.O.; Derman O.; Kanbur N.; Sekerel B.E.; Kutiuk T. Occupational asthma in apprentice adolescent car painters. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005;16(8):662- 668.
- Federação das Indústrias do Estado de Roraima. Perfil do trabalhador da indústria de reparação de veículos e acessórios do Estado de Roraima. [en línea]. 2007. [consulta: 8 junho 2012]. Disponible em: http://www.ielrr.org.br/imagens/novo_site/cartilhas/perfil_trabalhador_oficinas.doc
- Feldman R.G., Ratner M.H., Ptak T. Chronic toxic encephalopathy in a painter exposed to mixed solvents. *Environ Health Perspect.* 1999;107(5):417–422.
- Fernandes A.LG.; Stelmach R.; Algranti E. Asma Ocupacional. *J Bras Pneumol.* 2006; 32(Supl 1):S27–S34.
- Glindmeyer H.W., Lefante J.J. Jr., Rando R.J., Freyder L., Hnizdo E., Jones R.N. Spray-painting and chronic airways obstruction. *Am J Ind Med.* 2004;46(2):104-11.
- Ibiapina C.C.; Sarinho E.S.C.; Camargos P.A.M.; Andrade C.R.; Souza da Cruz Filho A.A. Rinite alérgica: aspectos epidemiológicos, diagnósticos e terapêuticos. *J Bras Pneumol.* 2008; 34(4):230-240.
- Karjalainen A., Kurppa K., Virtanen S., Keskinen H., Nordman H. Incidence of occupational asthma by occupation and industry in Finland. *Am J Ind Med.* 2000;37(5):451–458.
- Lee K.H., Ichiba M., Zhang J., Tomokuni K., Hong Y.C., Ha M., Kwon H.J., Koh S.B., Choi H.R., Lee K.H., Park C.G., Cho S.H., Hirvonen A., Strickland P.T., Vermeulen R., Hayes R.B., Kang D. Multiple biomarkers study in painters in a shipyard in Korea. *Mutat Res.* 2003;540(1):89-98.

Menezes A.M., Perez-Padilla R., Jardim J.R., Muino A., Lopez M.V., Valdivia G., Montes de Oca M., Talamo C., Hallal P.C., Victora C.G. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*. 2005;366(9500):1875-1881.

Moen B.E., Hollund B.E. Exposure to organic solvents among car painters in Bergen, Norway. *Ann Occup Hyg*. 2000;44(3):185-189.

Parker D.L., Waller K., Himrich B., Martinez A., Martin F. A cross-sectional study of pulmonary function in autobody repair workers. *Am J Public Health*. 1991;81(6):768-771.

Randolph B.W., Lalloo U.G., Gouws E., Colvin M.S. An evaluation of the respiratory health status of automotive spray-painters exposed to paints containing hexamethylene di-isocyanates in the greater Durban area. *S Afr Med J* 1997;87(3):318-323.

Siebel A.M., Basso da Silva L. Genotoxic da-

mage in auto body shop workers. *Toxicol Ind Health*. 2010;26(9):619-23.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diagnóstico clínico e funcional da asma brônquica. *Rev Assoc Med Bras*. 2004; 50(2):121-121.

Sparer J., Stowe M.H., Bello D., Liu Y., Gore R.J., Youngs F., Cullen M.R., Redlich C.A., Woskie S.R. Isocyanate exposures in autobody shop work: The SPRAY study. *J Occup Environ Hyg*. 2004;1(9):570-81.

Tornling G., Alexandersson R., Hedenstierna G., Plato N. Decreased lung function and exposure to diisocyanates (HDI and HDI- BT) in car repair painter: observation on re-examination 6 years after initial study. *Am J Ind Med*. 1990;17(3):299-310.

Vitayavirasuk B., Junhom S., Tantisaeranee P. Exposure to lead, cadmium and chromium among spray painters in automobile body repair shops. *J Occup Health*. 2005;47(6):518-522.

Estrés oxidativo en cefalópodos: I. Determinación de TBARS

Oxidative stress in cephalopods: I. TBARS determination

Fassiano, Anabella Victoria^{1*}; Ortiz, Nicolás^{2,3}; Ríos de Molina, María del Carmen^{1,3}

¹Laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo, Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA, Ciudad Universitaria pabellón II 4to. piso., Int. Güiraldes 2620 CP1428, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. ²Área de Biología y Manejo de Recursos Acuáticos, Centro Nacional Patagónico (CONICET), Bvd. Brown 2915, CP9120, Puerto Madryn, Argentina. ³CONICET, Av. Rivadavia 1917, CP1033, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*afassiano@qb.fcen.uba.ar

Recibido: 17 de mayo de 2012

Aceptado: 2 de septiembre de 2012

Resumen. El estrés oxidativo se produce cuando se genera un desbalance desfavorable entre las especies reactivas del oxígeno y las defensas antioxidantes, provocando daño oxidativo a macromoléculas. Varios estudios han resaltado la importancia del estrés oxidativo en el campo de la ecotoxicología, particularmente su relación con el impacto que generan los contaminantes que alcanzan los cuerpos de agua. El cuantificar los parámetros de estrés oxidativo ha permitido el uso de los mismos como herramienta de diagnóstico (biomarcadores), con capacidad predictiva del impacto de los contaminantes sobre los organismos. Uno de los índices más frecuentemente utilizados para estimar el daño oxidativo a lípidos es la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), producto final de la peroxidación lipídica. *Octopus tehuelchus* es un importante recurso pesquero en la costa patagónica, expuesto en algunas áreas a contaminación antrópica. Dado que el estudio de parámetros de estrés oxidativo aún no ha sido abordado en esta Clase de moluscos y que en muchos modelos biológicos, los contaminantes ambientales actúan generando estrés oxidativo, es clave encontrar sus blancos de acción, para empezar a caracterizar las alteraciones metabólicas y fisiológicas asociadas a su mecanismo de acción. El objetivo de este trabajo fue la puesta a punto del método de determinación de daño oxidativo a lípidos en distintos tejidos del pulpo *Octopus tehuelchus* desde modelos previamente ensayados en el laboratorio.

Palabras clave: Estrés oxidativo; Malondialdehído; *Octopus tehuelchus*; Cefalópodos.

Abstract. Oxidative stress occurs when there is an unfavorable imbalance between reactive oxygen species and antioxidant defenses, causing oxidative damage to macromolecules. Several studies have highlighted the importance of oxidative stress in the ecology field related to the impact generated by pollutants reaching water bodies. The quantification of oxidative stress parameters led to their use as diagnostic tools (biomarkers) with predictive capability of showing the impact of pollutants on organisms. One of the most frequently used indexes to estimate the oxidative damage to lipids is the determination of reactive thiobarbituric acid substances (TBARS) (final product of lipid peroxidation). *Octopus tehuelchus* is an important fishery resource in the Patagonian coast exposed to anthropogenic pollution. The study of oxidative stress parameters has not been yet tackled in this class of molluscs. Taking into account that, in many biological models, environmental pollutants generate oxidative stress, it is important to find their targets of action, to start to characterize metabolic and physiological alterations associated to their mechanisms of action. The aim of this work was to adjust the method of determination of oxidative damage to lipids in various tissues of the octopus, *Octopus tehuelchus*, from models previously tested in the laboratory.

Keywords: Oxidative stress; *Octopus tehuelchus*; Malondialdehyde; Cephalopods.

INTRODUCCIÓN

Vivir en un ambiente oxigenado implica estar expuesto a metabolitos intermedios en la vía de reducción de oxígeno, conocidos como especies reactivas del oxígeno (ERO). Estas moléculas, en ciertas condiciones, pueden resultar tóxicas y lesionar a los componentes celulares.

Existen varios trabajos publicados que relacionan la expectativa de vida de los organismos con el grado de daño oxidativo en su sistema, entre otros parámetros de estrés oxidativo (Orr y Sohal 1994; Sohal y col. 2002; Turrens 2003; Abele y Puntarulo 2004; Halliwell 2007; Monaghan y col. 2009). Asimismo, se sabe en la actualidad, que muchos factores ambientales

como la contaminación por metales pesados o pesticidas, pueden inducir estrés oxidativo (Watanabe y Suzuki 2002; Rocchetta 2006; Ochoa y González 2008; Sabatini y col. 2009a, 2009b).

Los factores ambientales pueden modificar la tasa metabólica de organismos y, consecuentemente, la tasa de producción de ERO. En los invertebrados marinos expuestos a contaminantes de origen antrópico puede aumentar la formación intracelular de ERO y pueden presentar modificaciones en la actividad de sus defensas antioxidantes, niveles de producción de ERO y su vulnerabilidad a éstas (Regoli 2000; Abele y Puntarulo 2004; Borković y col. 2005). Por otra parte, existen numerosas evidencias de que los animales acuáticos acumulan y transfieren distintos tipos de contaminantes, tales como metales y xenobióticos (Amiard 1988; Chaufan y col. 2006; Sabatini y col. 2009b). Los pulpos en particular, poseen una notable capacidad para almacenar grandes cantidades de metales pesados y otros contaminantes, siendo una importante ruta de transferencia hacia los predadores tope, incluido el hombre (Seixas y Pierce 2005; Raimundo y col. 2008).

El pulpito, *Octopus tehuelchus*, es un importante recurso pesquero en varias localidades rurales y urbanas de la costa patagónica (Ré y Ortiz 2008) en el que el estudio de parámetros de estrés oxidativo no ha sido, aún, abordado. Considerando que, en muchos modelos biológicos, los contaminantes ambientales actúan generando estrés oxidativo y que, como otros pulpos, *O. tehuelchus* sería un importante bioacumulador, es clave establecer los valores basales de los parámetros de estrés para encontrar los blancos de acción de los contaminantes y comenzar a caracterizar las alteraciones metabólicas y fisiológicas asociadas. Existen distintas determinaciones que dan indicios del grado de estrés oxidativo que sufren diversos organismos marinos (Sukhotin y col. 2002; Abele y Puntarulo 2004), entre ellos los cefalópodos decápodos (Zielinski y Pörter 2000). Uno de los índices más frecuentemente utilizados para estimar el daño oxidativo a lípidos es la determinación de la peroxidación lipídica mediante la técnica de TBARS (sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico). Como producto final de la peroxidación lipídica predomina el malondialdehído (MDA), principal sustrato de esta reacción. El MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido en caliente para dar un comple-

jo coloreado, cuyo máximo de absorción es a 535 nm (Ohkawa y col. 1978).

El objetivo de este trabajo fue la puesta a punto del método de determinación de daño oxidativo a lípidos en distintos tejidos del pulpo *O. tehuelchus* basándonos en otros modelos previamente ensayados en el laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

El área de muestreo fue una región de la costa atlántica de la provincia de Chubut, en las cercanías del Muelle Almirante Storni, en la zona portuaria Puerto Madryn, Golfo Nuevo (42° 45'S, 65° 01'O). En esta región se instalaron refugios artificiales en el piso submareal, a aproximadamente 10 metros de profundidad, que se controlaron periódicamente por buceo. Los ejemplares se capturaron en los meses de abril y mayo de 2009.

Los ejemplares fueron trasladados en agua de mar al Laboratorio de Peces y Mariscos de Interés Comercial (LAPEMAR) en el CENPAT-CONICET y, previo a la disección, se anestesiaron con alcohol al 5% en agua de mar, en acuerdo con las recomendaciones establecidas por Moltschaniwskyj y col. (2007). Se obtuvieron muestras de manto (M), glándulas oviductales (GO), glándula digestiva (GD), brazo (Br), sifón (Si), sistema nervioso (SN) y branquias (Bq). Estos tejidos fueron almacenados a -20°C hasta ser trasladados a Buenos Aires para realizar las mediciones bioquímicas en el Laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo (LEEM), del departamento de Química Biológica, FCEN-UBA.

Cada tejido fue homogeneizado mecánicamente con un rotor Precytec, en KCl 0,154 M (1:5, p/v) conteniendo inhibidores de proteasas (fluoruro de fenilmetil sulfonilo -PMSF- 0,5 mM y benzamidina 0,2 mM) según Chaufan y colaboradores (2006). De cada homogenato se fraccionó una alícuota (para hacer las determinaciones en homogenato total) y el resto se centrifugó a 11.000 x g por 20 minutos, obteniéndose un sobrenadante y un precipitado. Todos los preparados se utilizaron inmediatamente o se guardaron a -20°C hasta su uso.

Se trabajó sobre alícuotas de homogenato total, sobrenadante y sedimento de centrifugación de muestras de manto, glándulas oviductales, glándula digestiva, brazo, sifón, sistema nervioso y branquias. Se estimó el índice de peroxidación lipídica mediante la determinación de TBARS (Ohkawa y col. 1978), con ligeras modificaciones. A alícuotas de 50 ml

del homogenato total o del sobrenadante y al sedimento correspondiente (previamente re-suspendido en un volumen final de 50 ml en buffer de homogeneización) se les agregó 1 ml de reactivo compuesto por TBA 0,3% p/v, TCA 4% (p/v) y hidroxitolueno butilado (BHT) 0,01% (p/v). Se incubaron a 100°C durante 20 minutos. Luego se dejaron enfriar en hielo y se clarificaron los sobrenadantes por centrifugación a 10.000 x g por 10 min. Se leyó la absorbancia del sobrenadante a 535 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/visible.

La concentración de complejo coloreado se calculó mediante el empleo del coeficiente de extinción molar del complejo MDA-TBA en las condiciones de trabajo ($156 \text{ mmoles}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A fin de verificar en qué localización se lograba la mejor determinación de MDA (valores dentro del límite de detección de la técnica y menor dispersión de datos), se aplicó la técnica de TBARS sobre el homogenato total, el sobrenadante de 11.000 x g y sobre el sedimento de la misma centrifugación.

En la *Figura 1* se presentan los datos obtenidos en los distintos tejidos. Se observó que, en la mayoría de los casos (exceptuando el brazo), no hubo diferencias apreciables para la determinación realizada entre los valores obtenidos en el homogenato total y los valores obtenidos en el sobrenadante. Por otra parte, se observó que el valor obtenido para el sobrenadante y el homogenato total indicarían que, durante la homogeneización, el MDA se liberó a la fracción soluble y se recuperó totalmente con el sobrenadante de homogenato tras la centrifugación a 11.000 x g.

Medir una alícuota del homogenato total con precisión resultó dificultoso, dado que se trató una suspensión de alta densidad y no totalmente homogénea, por lo que, desde este punto de vista, resultó más conveniente utilizar el sobrenadante como material de partida para realizar determinaciones cuantitativas y lograr duplicados más precisos y exactos (*Tabla 1*). Esto se aplicó a todos los tejidos analizados, excepto el brazo, para el cual resultó mejor trabajar con el homogenato total, dado que los niveles obtenidos en esta fracción

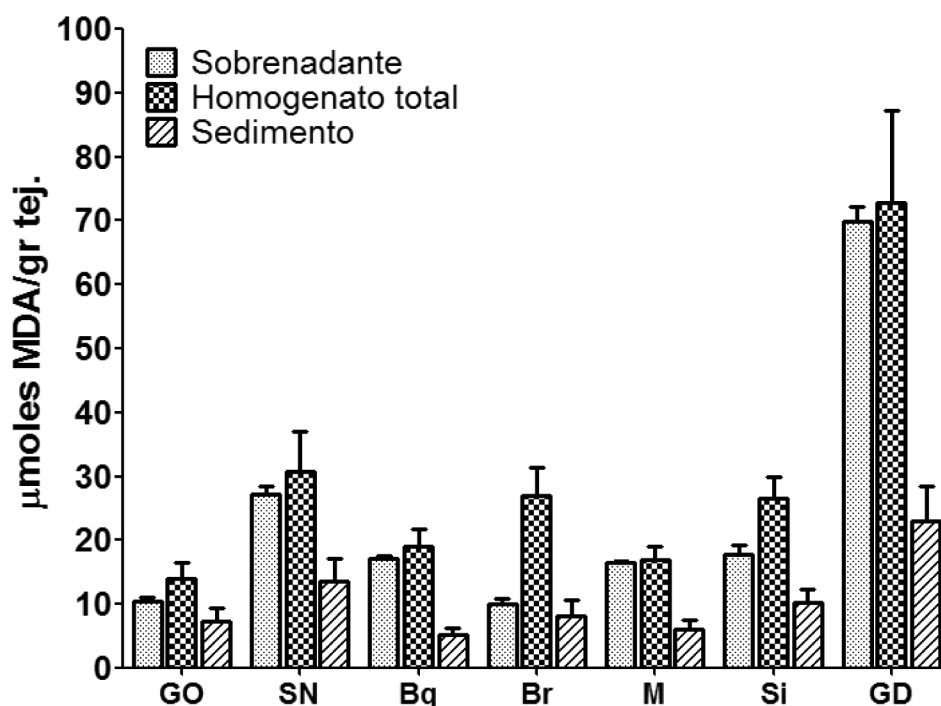


Figura 1. Contenido de MDA (μmoles de MDA/gr de tejido), en los distintos sistemas y órganos ensayados. GO: glándulas oviductales, SN: sistema nervioso, Bq: branquias, Br: brazo, M: manto, Si: sifón, GD: glándula digestiva. Los datos están expresados como la media \pm el desvío estándar.

Tabla 1. Contenido de MDA (μ moles de MDA/gr de tejido), en el homogenato total y en las fracciones obtenidas por centrifugación a 11.000 x g durante 20 minutos. Los datos están expresados como la media \pm el desvío estándar.

Tejido	Sobrenadante (μ moles MDA/gr tejido)	Homogenato total (μ moles MDA/gr tejido)	Precipitado (μ moles MDA/gr tejido)
GO	10,51 \pm 1,05	14,01 \pm 4,20	7,22 \pm 3,61
SN	27,22 \pm 2,18	30,77 \pm 10,77	13,61 \pm 6,12
Bq	17,06 \pm 0,85	19,07 \pm 4,77	5,21 \pm 1,82
Br	10,09 \pm 1,21	26,99 \pm 7,56	8,18 \pm 4,17
M	16,45 \pm 0,49	17,00 \pm 3,40	6,01 \pm 2,52
Si	17,75 \pm 2,66	26,48 \pm 5,83	10,15 \pm 3,66
GD	69,85 \pm 4,19	72,92 \pm 24,79	23,09 \pm 9,24

fueron mayores que los obtenidos para el sobrenadante. Esto pudo deberse a que el proceso de homogeneización no fue lo suficientemente efectivo para este tejido y que una parte significativa de los productos de peroxidación lipídica fue retenida en los fragmentos celulares, que luego de la centrifugación sedimentaron. En cuanto al tejido óptimo para la determinación de la peroxidación lipídica en *O. tehuelchus*, los resultados indicaron que los mayores valores para esta determinación se obtuvieron en glándula digestiva, seguido por el sistema nervioso, aunque en todos los tejidos analizados se obtuvieron valores medibles, revelando una gran sensibilidad de la técnica en este organismo. Esto permitió concluir que la técnica es aplicable para cualquiera de los tejidos analizados, partiendo de homogenato total para el caso del brazo o sobrenadante de homogenato en el resto de los tejidos.

A partir de las variables ensayadas en el presente trabajo, se propone que el sobrenadante de homogenato de 11.000 x g, de la glándula digestiva de *O. tehuelchus*, sería la muestra de elección sobre la cual realizar el bioensayo en futuras investigaciones.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Abele D., Puntarulo S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defense systems in polar and temperate marine inver-

tebrates and fish. *Comp Biochem Physiol A*. 2004;138(4):405-415.

Amiard J. Les mecanismes de transfer des elements metaliques dans la chaine alimentaires aboutissant `a l'huitre et `a la moule, mollusques filtreurs, formes chimiques de stockage, consequences ecotoxicologiques. *Oceanus*. 1988;14:283-287.

Borković S., Saponjic S., Pavlovic S., Blegojevic D., Milosevic S., Kovacevic T., Rodojicic R., Spasic M., Zikic R., Saicic Z. The activity of antioxidant defense in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic. *Sea Comp Biochem Physiol C*. 2005;141:366-374.

Chaufan G., Juárez A., Basak S., Ithuralde E., Sabatini S., Genovese G., Oneto M., Kesten E., Ríos de Molina M.C. Toxicity of hexachlorobenzene and its transference from microalgae (*Chlorella kessleri*) to crabs (*Chasmagnathus granulatus*). *Toxicology*. 2006;227:262-270.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc T*. 2007;35 (5):1147-1150.

Moltschanivskyj N.A., Hall K., Lipinski M.R., Marian J.E.A.R., Nishiguchi M., Sakai M., Shulman D.J., Sinclair B., Sinn D.L., Staudinger M., Gelderen R.V., Villanueva R., Warnke K. Ethical and welfare considerations when using cepha-

lopods as experimental animals. Rev Fish Biol Fisheries. 2007;17:455-476.

Monaghan P., Metcalf N., Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. Ecol Lett. 2009;12:75-92.

Ochoa D., González J. Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. Rev Med Vet Zootec. 2008;55:115-126.

Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1978;95(2):351-358.

Raimundo J., Vale C., Duarte R., Moura, I. Sub-cellular partitioning of Zn, Cu, Cd and Pb in the digestive gland of native *Octopus vulgaris* exposed to different metal concentrations (Portugal). Sci Total Environ. 2008;390:410-416.

Ré M., Ortiz N. Pesca del pulpito *Octopus tewelchus*. Pesquería de Cefalópodos. Atlas de Sensibilidad [en línea]. Ambiental del Mar y de la Costa. [actualizado en Mayo de 2008; consulta 29 de Junio de 2011]. Disponible en: <http://atlas.ambiente.gov.ar/>

Regoli F. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. Aquat Toxicol. 2000;50(4):351-361.

Rocchetta I. Estudios de estrés oxidativo y cambios de ultraestructura provocados por el cromo hexavalente en *Euglena gracilis* (Euglenophyta). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, 2006. www.bl.fcen.uba.ar

Rocchetta I., Ruiz L.B., Magaz G., Conforti V.T.D. Effects of hexavalent chromium in two strains of *Euglena gracilis*. B Environ Contam Tox. 2003;70(5):1045-1051.

Sabatini S.E., Chaufan G., Juárez A.B., Coalova I, Bianchi L., Eppis M.R., Ríos de Molina M.C. Dietary copper effects in the estuarine crab, *Neohelice (Chasmagnathus) granulata*, maintained at two different salinities. Comp Biochem Physiol C. 2009a;150:521-527.

Sabatini S.E., Juárez A.B., Eppis M.R., Bianchi L., Luquet C.M., Ríos de Molina M.C. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. Ecotox Environ Safe. 2009b;72:1200-1206.

Seixas S., Pierce G. Bioaccumulation of lead, calcium and strontium and their relationship in the octopus *Octopus vulgaris*. Water Air Soil Poll. 2005;163:137-152.

Sohal R. The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. Aging. 1993;5(1):3-17.

Sohal R., Mockett R., Orr W. Mechanisms of Aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. Free Radical Biol Med. 2002;33(5):575-586.

Sukhotin A., Abele D., Pörtner H.-O. Growth, metabolism and lipid peroxidation in *Mytilus edulis*: age and size effects. Mar Ecol Prog Ser. 2002;226:223-234.

Turrens J. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol. 2003;522(2):335-344.

Watanabe M., Suzuki T. Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in *Euglena gracilis*. Comp Biochem Physiol C. 2002;131(4):491-500.

Zielinski S., Pörtner H.-O. Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age? Comp Biochem Physiol B. 2000;125:147-160.

Estudio comparativo de la frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares en eritrocitos de tres especies ícticas

Comparative studies of the frequency of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of three species fishes

Pollo, Favio E.¹; Salas, Nancy E.¹; Mancini, Miguel A.²; Martino, Adolfo L.¹

¹Ecología, Dpto de Cs Naturales, Fac Cs Exa Fco-Qca y Nat. ²Acuicultura, Fac Agro-Vet. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta Nacional N° 36 - Km 601, (X5804BYA) Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

faviopollo@gmail.com

Recibido: 18 de junio de 2012

Aceptado: 4 de septiembre de 2012

Resumen. Los ecosistemas acuáticos cercanos a las zonas urbanas sufren un deterioro constante ocasionado por diversos factores físico-químicos relacionados con la actividad antrópica, representando un riesgo para los organismos que los habitan, en especial los peces. Estos efectos pueden ser biomonitoreados mediante técnicas de amplia utilización, como el Test de Micronúcleos (Mn) y el de Anormalidades nucleares (AN), entre otros. El objetivo de este trabajo fue verificar y comparar la frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares en tres especies ícticas colectadas en un lago urbano, *Cyprinus carpio*, *Astyanax eigenmanniorum* y *Cheirodon interruptus*. Luego de la captura y anestesia de los peces, se extrajo de cada individuo una muestra de sangre y se registró el peso y la longitud total. Las muestras fueron fijadas y luego teñidas con Giemsa al 10%, posteriormente se las analizó con microscopio (1000X) y se les tomaron fotografías con cámara digital. Se calculó, además, el índice de condición corporal (K) para cada uno de los ejemplares capturados. Se aplicó un análisis de correlación de rangos de Spearman (rs) entre frecuencia de Mn y AN vs K para cada especie. La prueba de Kruskal-Wallis se aplicó para evaluar diferencias de Mn y AN entre las especies. Los resultados no mostraron una correlación estadísticamente significativa ($P > 0,05$) entre las frecuencias de Mn y AN vs K. Las frecuencias de Mn entre las diferentes especies no arrojaron diferencias significativas ($P > 0,05$), mientras que las AN sí ($P < 0,05$). *Astyanax eigenmanniorum* fue la especie que mayor sensibilidad presentó. Las diferencias preliminares de AN entre las especies utilizadas, convierten a *A. eigenmanniorum* en una especie "centinela" y posible biomonitor de agentes xenobióticos.

Palabras clave: Micronúcleos; Anormalidades nucleares; Peces; Xenobióticos.

Abstract. Aquatic ecosystems near urban areas suffer a steady deterioration caused by physical and chemical factors related to human activity, representing a danger to organisms that inhabit them, especially the fish. These effects may be biomonitored by widely used techniques, such as the Micronucleus Test (Mn) and Nuclear Abnormalities (NA), among others. The aim of this study was to verify and compare the frequency of micronuclei and nuclear abnormalities in three fish species collected in an urban lake, *Cyprinus carpio*, *Astyanax eigenmanniorum* and *Cheirodon interruptus*. After the capture and anesthesia of the fish, weight and length were registered, and a blood sample was obtained from each individual. The samples were fixed and stained with 10% Giemsa, subsequently they were analyzed with the microscope (1000X) and photographed with a digital camera. The body condition index (K) was calculated for each fish caught. A correlation analysis Spearman rank (rs) between frequency of Mn and NA vs. K was performed for each species. The Kruskal-Wallis test was applied to assess differences in Mn and NA between species. The results showed no statistically significant correlation ($P > 0.05$) between the frequencies of Mn and NA vs K. The frequencies of Mn between different species yielded no significant differences ($P > 0.05$), whereas NA ($P < 0.05$) did. *A. eigenmanniorum* was the most sensitive species. NA preliminary differences between the species used, convert *A. eigenmanniorum* in a sort of "sentinel specie" and a possible biomonitor of xenobiotic agents.

Keywords: Micronuclei; Nuclear abnormalities; Fish; Xenobiotics.

INTRODUCCIÓN

El rápido crecimiento de la población humana, la industrialización, y la urbanización son las principales causas asociadas a la contaminación del agua, la cual pone en peligro a los ecosistemas acuáticos continentales (Vázquez

Silva y col. 2006). En general, estos ecosistemas mantienen una gran diversidad de organismos, por lo que los impactos, como la introducción de xenobióticos inducen cambios en la estructura de las comunidades, la dinámica de las poblaciones y las funciones

biológica de los organismos, afectando su ciclo de vida, crecimiento y condición reproductiva (López 2008).

Como respuesta a esta problemática, ha surgido la necesidad de realizar monitoreos de los recursos biológicos con el propósito de detectar cambios significativos en la flora y en la fauna (Margalef 1974).

Durante los últimos años, se han intensificado los estudios destinados a detectar los impactos sobre los ecosistemas acuáticos provocados por la contaminación derivada de las actividades humanas. En la última década, el uso y desarrollo de biomarcadores ha cobrado un gran interés a la hora de evaluar el riesgo de una sustancia o mezcla de sustancias químicas potencialmente tóxicas. Particularmente, los biomarcadores de efecto son buenos parámetros indicativos de la presencia de sustancias exógenas o cambios biológicos como respuestas a distintos xenobióticos (Palma Acuña 2005; Hurtado Alarcón y col. 2007). Entre los marcadores más utilizados se encuentran el Ensayo Cometa, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos (Klobučar y col. 2010).

Muchos grupos de organismos han sido propuestos como indicadores de la calidad am-

biental en ecosistemas acuáticos. Sin embargo, las comunidades de peces se han convertido en bioindicadoras para los programas de monitoreo biológico, por cubrir muchos eslabones de la cadena alimenticia, por acumular sustancias tóxicas y reaccionar a bajas concentraciones de xenobióticos (Torres Bugarín y col. 2007).

El objetivo de este trabajo fue verificar y comparar la frecuencia de Micronúcleos (Mn) y Anormalidades Nucleares (AN) en tres especies ícticas colectadas en un ambiente urbano.

MATERIAL Y MÉTODOS

El lago urbano Villa Dálcar (S 33° 07' - W 64° 20') se encuentra ubicado al oeste de la ciudad de Río Cuarto, Córdoba, Argentina (Figura 1). Es un lago artificial de múltiples usos que mantiene su volumen de agua por bombeo y escorrentías de las zonas próximas. El lago tiene una superficie aproximada de 7 ha y una profundidad máxima superior a los 3 metros. Este ambiente ha registrado en los últimos años episodios de mortandades de peces de diferentes especies, algunos de los cuales de acuerdo a su magnitud y características, fueron asociados a la presencia de sustancias tóxicas (Mancini y col. 2011).

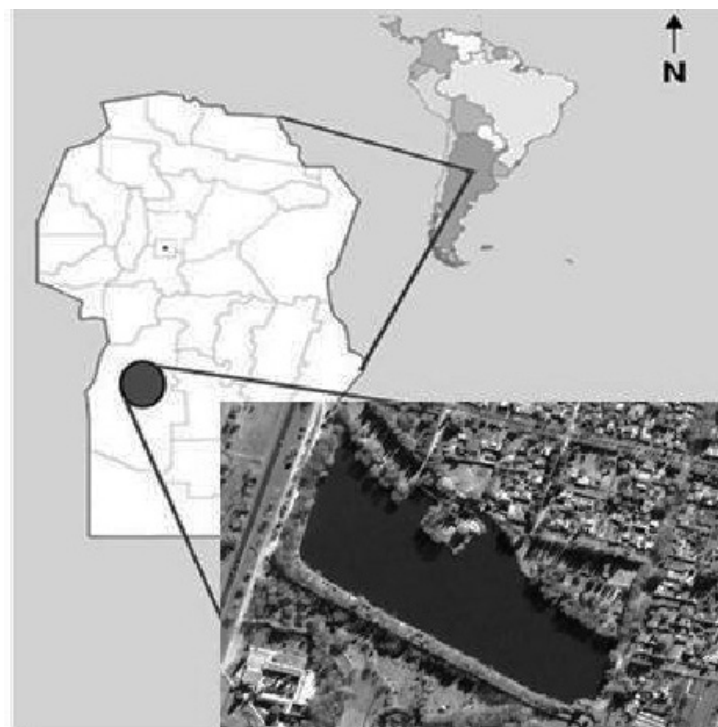


Figura 1. Ubicación geográfica del sitio en la provincia de Córdoba.

Durante los años 2009 y 2010 se realizaron tres colectas. Se obtuvieron un total de 73 peces pertenecientes a las siguientes especies: carpa (*Cyprinus carpio*), mojarra (*Astyanax eigenmanniorum*) y mojarrita (*Cheirodon interruptus*). Los peces fueron procesados en forma inmediata a su captura en el campo, donde se anestesiaron con metomidato incorporado directamente en el agua a una concentración de 5 mg/l (Stoskopf 1993). Se registró la longitud total por medio de un ictiómetro con precisión de 1 mm y el peso total húmedo con una balanza digital Ohaus Scout II con una precisión de 0,1 g. Las muestras de sangre se tomaron mediante un corte en el pedúnculo caudal (Torres Bugarín y col. 2007), posteriormente se realizaron los frotis sobre portaobjetos limpios previamente codificados.

Las muestras fueron fijadas con metanol por 20 minutos, luego se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente se procedió a la tinción con Giemsa al 10% durante 25 minutos (Junín y col. 2008). La lectura de la frecuencia de aparición de Mn y AN se cuantificó para 4000 eritrocitos por individuo, utilizando un microscopio Zeiss Axiophot-Axiolab con objetivo de 100 X de inmersión en aceite. Se tomaron fotografías con cámara digital AxioCam HRc Zeiss con la utilización de software Axio Vision 4.3.

Los Mn fueron identificados según los criterios sugeridos por Schmid (1975) y Fenech (2000), mientras que para las AN se siguieron las clasificaciones realizadas por diferentes autores (Çavaş y Ergene-Gözükara 2005; da Silva Souza y Fontanetti 2006; Ergene y col. 2007; Zafalon Silva y Bobrowski 2008; Cogua y Duque 2009).

Con las medidas morfométricas, se calculó el índice de condición corporal (K) en cada uno

de los ejemplares capturados, por medio de la siguiente fórmula:

$K = (P)^* (1000)/L^3$ donde P = peso total y L = longitud total (Royce 1996). Posteriormente, se aplicó un análisis de correlación de rangos de Spearman (r_s) entre frecuencia de Mn, AN vs K para cada especie. La prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis se utilizó para evaluar diferencias de Mn y AN entre las tres especies. Para el análisis de los datos se utilizó el programa Statgraphics v. 5.0.

RESULTADOS

En la *Tabla 1* se resume la frecuencia de Mn y AN de cada especie con su correspondiente desvío estándar. Mientras que en la *Tabla 2* se presentan los valores promedios para cada especie de la longitud total, peso e índice de condición. En la *Figura 2* se muestran las distintas AN registradas en sangre periférica de las tres especies estudiadas.

A través de la prueba de Kruskal-Wallis, se observó que los valores de eritrocitos micronucleados no mostraron diferencias significativas entre las especies ícticas ($P > 0,05$). Por el contrario, las AN sí exhibieron diferencias significativas entre especies, utilizando la misma técnica estadística ($H = 28,99$; $P < 0,05$), donde *A. eigenmanniorum* fue la especie más afectada.

No se encontró correlación entre la frecuencia de Mn y el índice de condición corporal para *C. carpio* ($r_s = 0,05$; $P > 0,05$) y *C. interruptus* ($r_s = 0,07$; $P > 0,05$). Para *A. eigenmanniorum* la correlación fue de $r_s = 0,36$, pero no significativa ($P > 0,05$). En el caso de la frecuencia de AN los valores fueron, *C. carpio* ($r_s = 0,35$; $P > 0,05$), *C. interruptus* ($r_s = 0,12$; $P > 0,05$) y *A. eigenmanniorum* ($r_s = 0,15$; $P > 0,05$), como se observa tampoco fue estadísticamente significativa.

Tabla 1. Frecuencia media, desvío estándar de micronúcleos y anomalías nucleares de las especies estudiadas.

Especies	n	Micronúcleos (Mn)	Anormalidades Nucleares (AN)
		%	%
<i>C. carpio</i>	26	0,05 ± 0,12	2,12 ± 1,88
<i>C. interruptus</i>	21	0,04 ± 0,09	5,62 ± 6,32
<i>A. eigenmanniorum</i>	26	0,07 ± 0,22	8,77 ± 7,46

n = Tamaño de la muestra, % Frecuencia en mil.

Tabla 2. Longitud, peso e índice de condición corporal promedio para cada una de las especies estudiadas

Especie	LT \pm DE	P \pm DE	K \pm DE
<i>Cyprinus carpio</i>	5,56 \pm 1,42	3,03 \pm 1,88	1,53 \pm 0,18
<i>Cheirodon interruptus</i>	5,38 \pm 0,26	2,00 \pm 0,36	1,28 \pm 0,10
<i>Astyanax eigenmanniorum</i>	5,72 \pm 0,36	2,47 \pm 0,50	1,31 \pm 0,17

LT= longitud total (cm), P= peso (gr), K= índice de condición corporal y DE= desvío estándar.

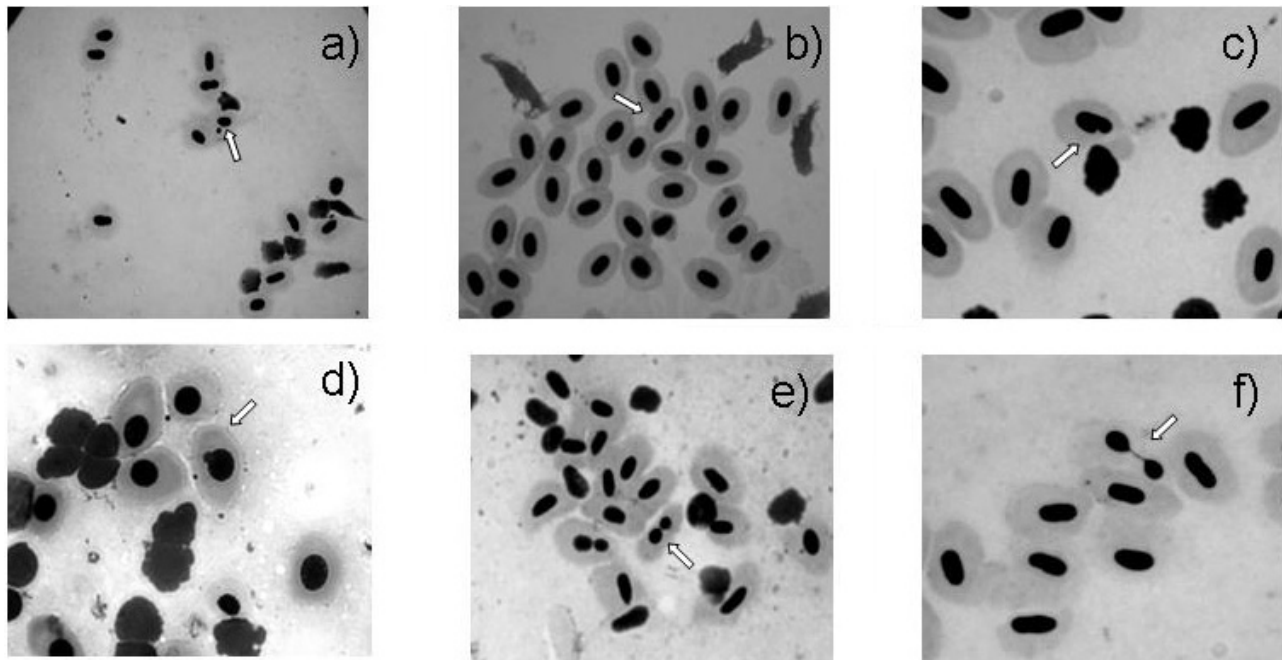


Figura 2. Eritrocitos de sangre periférica de *Cyprinus carpio*, *Cheirodon interruptus*, *Astyanax eigenmanniorum*, a) Eritrocito con micronúcleo, b) Eritrocito globular, c) Eritrocito escotado, d) Eritrocito brotado, e) Eritrocito binucleado y f) Eritrocito con puente núcleo plasmático.

DISCUSIÓN

La cuantificación *in situ* de Mn y AN en eritrocitos de peces ha demostrado ser un adecuado biomarcador en la evaluación del impacto de xenobióticos en ecosistemas acuáticos (Junín y col. 2008; Palacios Betancur y col. 2009). Sin embargo, algunos autores han señalado la importancia de la elección adecuada de la especie (Hurtado Alarcón y col. 2007; Torres Bugarin y col. 2007; Klobučar y col. 2010). Las tres especies en estudio presentaron formación de Mn y AN, observándose la mayor frecuencia en *A. eigenmanniorum* y la menor en *C. carpio*. Esto puede tener cierta relación con la rusticidad de esta última especie (Mancini y Grosman 2008) y el pequeño tamaño de los

ejemplares analizados.

En el caso de los Mn, estos tuvieron una frecuencia de aparición muy baja en las tres especies. Comparando nuestros resultados con los reportados por otros autores, los valores en todos los casos fueron mucho mayores a los obtenidos en este trabajo (Gustavino y col. 2001; Zhu y col. 2004; Arkhipchuk y Garanko 2005; Çavas y col. 2005; Ossana y col. 2009). En cuanto a la frecuencia de las AN, estas presentaron siempre valores mayores que los Mn en las tres especies, resultados que coinciden con los de otros autores (Zafalon Silva y Bobrowski 2008). Dado que el mecanismo de formación de estas anomalías no es muy claro, solo se registran sus valores (Ramsdorf

2007; Rocha y col. 2010).

La correlación entre el índice de condición corporal y la frecuencia de Mn y AN en las tres especies, no mostró relación estadísticamente significativa, lo que estaría evidenciando que el número de Mn y AN no se asocia, en principio, con la condición corporal de los peces, fenómeno que también ha sido observado en otras especies (Palacios Betancur y col. 2009). Las frecuencias observadas podrían estar relacionadas con el transporte de sustancias por escorrentías de las zonas aledañas que ingresan luego de abundantes precipitaciones o por la concentración de las mismas, ya que en la actualidad no ingresa agua superficial en forma periódica, manteniendo actualmente su volumen por bombeo y escorrentías producto de las lluvias.

De las tres especies estudiadas, *A. eigenmanniorum* exhibió una mayor sensibilidad frente a la potencial presencia de agentes xenobióticos. Estos resultados coinciden con los de Ramsdorf (2007), quien reporta al género *Astyanax* como un buen biomonitor de calidad ambiental. En el mismo sentido, *A. eigenmanniorum* fue, dentro de la ictiofauna del lago Villa Dálcar, la especie que registró mayor cantidad de ejemplares muertos en un cuadro de intoxicación registrado en el año 2009 (Mancini y col. 2011).

Las diferencias preliminares de AN entre las especies utilizadas en este estudio, sumado a la facilidad de captura, hábitos alimenticios y a la gran diversidad de hábitats que esta especie presenta en la región sur de América, convierten a *A. eigenmanniorum* en una especie "centinela" y posible biomonitor de agentes xenobióticos. Por último, se recomienda la realización de bioensayos con xenobióticos identificados para corroborar la posibilidad de utilizar a *A. eigenmanniorum* en estudios de mayor precisión.

Agradecimientos: a los encargados del cuidado del lago Villa Dálcar. Este trabajo fue realizado con el financiamiento de los programas 18/C350 y 18/A277 de la Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT) de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Arkhipchuk V., Garanko N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus on in vivo fish cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2005;62:42-52.

Çavaş T., Ergene-Gözükara S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in

Oreochromis niloticus following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*. 2005;74:264-271.

Çavaş T., Garanko N., Arkhipchuk V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. *Food and Chemical Toxicology*. 2005;43:569-574.

Cogua P., Duque G. Anormalidades nucleares en eritrocitos causadas por mercurio en peces (mojarra) de la Bahía de Buenaventura, Pacífico Colombiano. *Biologist (Lima)*. 2009;7: 1-2.

da Silva Souza T., Fontanetti C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alteration in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research* 605. 2006;87-93.

Ergene S., Çavaş T., Çelik A., Köleli N., Kaya F., Karahan A. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*. 2007;16:385-391.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 2000;455:81-95.

Gustavino B., Scornajenghi K.A., Minissi S., Ciccotti E. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicines. *Mutation Research*. 2001;494:151-159.

Hurtado Alarcón J., Solarte D., Victor A., López Ortiz J.B., Montoya Herrera F.L. Prueba de micronúcleos en eritrocitos de sabaletas (*Brycon henni* E.) presentes en el Río Porce y en el ensamble Porce II, Antioquia. *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola [en línea]*. 2007. [consulta 28 de noviembre de 2011];3:[238-245]. Disponible en: <http://akane.udenar.edu.co/siweb/acuicola/revista/revista.html>

Junín M., Rodríguez Mendoza N., Heras M., Braga L. Valoración preliminar de la utilización de bioindicadores de contaminación en alguna especie de peces del delta del río Paraná, Argentina. *Ciencias Ambientales*. 2008;1:17-24.

Klobučar Göran I.V., Štambuk A., Pavlica M., Sertié Piré M., Kutuzovic Hackenberger B., Hylland K. Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology*. 2010;19:77-84.

López V.H. Ríos mediterráneos, aproximación a la evaluación del estado ecológico y planificación para la conservación a través de los peces. Tesis Doctoral. Universidad de Huelva, 2008.

Mancini M., Grosman F. El pejerrey de las lagunas pampeanas. Análisis de casos tendientes a una gestión integral de las pesquerías. Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto y Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 2008.

Mancini M., S. Crichigno, M. Ortiz, J.G. Haro. Lagos urbanos: importancia, dinamismo y multiplicidad de usos. El caso del lago Villa Dálcar (Córdoba, Argentina). *Biología Acuática* 2011: en prensa.

Margalef R. *Ecología*. Ed. Omega. Barcelona, 1977.

Ossana N.A., Eissa B.L., Salibián A. Bioconcentración y genotoxicidad del cadmio subletal en la carpa común (*Cyprinus carpio*). *Biologist* (Lima). 2009;7:1-2.

Palacio Betancur I., Palacio Baena J.A., Carguero Guerrero M. Micronuclei test application to wild tropical ichthyic species common in two lentic environments of the low zones in Colombia. *Actual Biol*. 2009;31:67-77.

Palma Acuña S. Ensayo de micronúcleos en eritrocitos de *Oncorhynchus mykiss* como herramienta para evaluar la exposición a pesticidas potencialmente genotóxicos en el río Traiguen. Tesis presentada a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Temuco Para Optar al Grado de Licenciatura en Recursos Naturales. 2005.

Ramsdorf W. Utilização de duas espécies de astyanax (*Astyanax sp b e a. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (fazenda cangüiri – ufpr). Tesis de Maestría. Universidad Federal de Párana. Curitiba, 2007.

Rocha C.A.M., Almeida V.H.C., Silva Pinheiro R.H.S., Cunha L.A. Micronuclei and other nuclear abnormalities in *A. tetramerus*. *UAKARI*. 2010;6:57-66.

Royce W.F. Introduction to the practice of fishery science. Ed Academic Press, United States of America, 1996.

Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Research*. 1975;31:9-15.

Stoskopft M. Anaesthesia. En: *Aquaculture for veterinarians*. L. Brown editor NortChicago, 1993. p 161-167.

Torres Bugarin O., Zabala Aguirre J., Gómez Rubio P., Buelna Osben H., Zúñiga González G., García Ulloa Gómez M. Especies de peces con potencial como bioindicadoras de genotoxicidad en el lago "La Alberca", Michoacán, México. *Hidrobiologica*. 2007;17:75-81.

Vázquez Silva G., Castro Mejía G., González Mora I., Pérez Rodríguez R., Castro Barrera T. Bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del agua. *ContactoS*. 2006;60:41-48.

Zafalon Silva B., Bobrowski V.L. Anormalidades nucleares eritrocitárias como biomarcador da qualidade da água do arroio padre doutor. XVII Congreso de Iniciação Científica, X Encontro de Pós Graduação [en línea]. 2008. [consulta 15 de octubre de 2011]. Disponible en: http://www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CB/CB_01519.pdf

Zhu Y., Wang J., Bai Y., Zhang R. Cadmium, chromium, and copper induce polychromatocyte micronuclei in carp (*Cyprinus Carpio L.*). *Environmental Contamination and Toxicology*. 2004;72:78-86.

**Antioxidant effect of aqueous extract of propolis on hepatotoxicity induced
by octylphenol in male rats**
**Efecto antioxidante del extracto acuoso de propóleos sobre la hepatotoxicidad inducida
por el octilfenol en ratas macho**

Saleh, Eman M.

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Ain Shams University, Abbassia, Cairo, Egypt 11566. Phone number: +202 26828641, Mobile: +2 (0100) 1648959, Fax: +202 26853561

e_ahmed@sci.asu.edu.eg

Recibido: 10 de mayo de 2012
Aceptado: 26 de agosto de 2012

Abstract. 4-tertiary-octylphenol (4-tert-OP) is an alkylphenol that affects human health by stimulating free radical production. Aqueous propolis extract is a natural product rich in flavonoids that have antioxidant activity. This study was designed to investigate the ability of aqueous propolis extract to reduce the hepatotoxicity induced by 4-tert-OP in male rats. Animals were assigned to 5 groups and treated for 6 weeks. Group 1: control; group 2: 100 mg 4-tert-OP/kg b.wt./day; group 3: 100 mg aqueous propolis extract /kg b.wt./day; group 4: 100mg 4-tert-OP/kg b.wt./day plus 100 mg aqueous propolis extract /kg b.wt./day; group 5: 100 mg 4-tert-OP/kg b.wt./day for 6 weeks followed by 100 mg aqueous propolis extract /kg b.wt./day for 6 weeks. Group 4-tert-OP significantly elevated AST, ALT, ALP, GGT, bilirubin, creatinine, urea, total lipids, total cholesterol, triglycerides, LDL-C and MDA with a significant decrease in total proteins, albumin, globulin, HDL-C, total antioxidant capacity, SOD, CAT and GST compared to control group. Administration of aqueous propolis extract either alone or combined with 4-tert-OP ameliorated the hepatotoxicity induced by 4-tert-OP. DNA fragmentation supported the deleterious effect of 4-tert-OP and the ameliorative effect of propolis on liver cellular proteins and enzymes. Histopathological findings revealed the hepatotoxicity induced by 4-tert-OP and the protective effect of aqueous propolis extract. In conclusion, aqueous propolis extract could reduce the damage and toxicity effects on liver cells induced by 4-tert-OP.

Keywords: 4-tertiary-octylphenol (4-tert-OP); Aqueous propolis extract; Hepatotoxicity; Antioxidant enzymes.

Resumen. El 4-terc-octilfenol (4-terc-OP) es un alquilfenol que afecta a la salud humana mediante la estimulación de la producción de radicales libres. El extracto acuoso de propóleos es un producto natural rico en flavonoides que tienen actividad antioxidante. Este estudio fue diseñado para investigar la capacidad del extracto de propóleos de reducir la hepatotoxicidad inducida por el 4-terc-OP en ratas macho. Los animales fueron asignados a 5 grupos y tratados durante 6 semanas. Grupo 1: control; grupo 2: 100 mg de 4-terc-OP/kg/día; grupo 3: 100 mg de extracto de propóleos/kg/día; grupo 4: 100 mg de 4-terc-OP/kg/día más 100 mg de extracto de propóleos/kg/día, grupo 5: 100 mg de 4-terc-OP/kg/día durante 6 semanas, seguidos de 100 mg de extracto de propóleos/kg/día durante 6 semanas. El grupo 4-terc-OP mostró niveles significativamente elevados de AST, ALT, ALP, GGT, bilirrubina, creatinina, urea, lípidos totales, colesterol total, triglicéridos, LDL-C y MDA, con una disminución significativa de proteínas totales, albúmina, globulina, HDL-C, la capacidad antioxidante total, SOD, CAT y GST, en comparación con el grupo control. La administración de extracto de propóleos, ya sea solo o combinado con 4-terc-OP redujo la hepatotoxicidad inducida por 4-terc-OP. Los estudios de fragmentación del ADN apoyan el efecto deletéreo observado por el tratamiento con 4-terc-OP y el efecto protector del extracto de propóleos, sobre las proteínas y las enzimas celulares hepáticas. Los resultados histopatológicos revelaron la hepatotoxicidad por 4-terc-OP y efecto protector inducido por el extracto de propóleos. En conclusión, el extracto de propóleos podría reducir el daño hepático y los efectos celulares de toxicidad en las células del hígado inducidos por 4-terc-OP.

INTRODUCTION

Many reports suggest that different types of man-made chemicals have become widespread as environmental contaminants affecting the health of human and wildlife populations (Longnecker *et al.* 2000). Xenosteroids are a large and structurally diverse group of chemicals that affect human health. The sug-

gested mechanism of action of xenosteroids involves binding to estrogen and androgen receptors (Bulayeva and Watson 2004) but many recent studies explained the effect of these chemicals on different organs and systems (Karafakioglu and Aslan 2010). Two xenoestrogens that are currently produced in large volumes are alkylphenols (APs) and bisphenol A

(BPA). Alkylphenols, such as nonylphenol (NP) and 4-tertiary-octylphenol (4-tert-OP) have been found in sewage effluent, groundwater and drinking water (Céspedes *et al.* 2008). Exposure to 4-tert-OP may occur from contact with personal care products, detergents, water, and food containing 4-tert-OP (Calafat *et al.* 2008).

Normal cellular function depends on a balance between the reactive oxygen species (ROS) produced and the antioxidant defense mechanisms available for the cell. This equilibrium is hampered by the ROS upsurge that culminates in oxidative stress (Fidan and Dundar 2008). ROS arise as by-products of normal cellular metabolism or as a consequence of exposure to certain chemicals (Krieger and Loch-Carusio 2001). These electrophilic metabolites or radicals can readily interact with essential biomolecules, including DNA, proteins and lipids, leading to oxidative modification, hence, structural and functional alterations (Fernandez *et al.* 2003).

Propolis is considered as one of the most promising natural products presenting not only therapeutic action, but also a preventive one (Galvao *et al.* 2007). It contains more than 300 compounds from different groups. It contains mostly a mixture of polyphenols, flavonoids (major ingredients), phenolic acids and their esters, caffeic acid and their esters, phenolic aldehydes and ketones; moreover, proteins, amino acids, vitamins (A, B1, B2, B3 and biotin), minerals (calcium, phosphorous, magnesium, manganese, iron, zinc, silicon, potassium, cobalt and copper). Flavonoids and esters of phenolic acids in propolis have been recognized as antiseptic, cytostatic, antimicrobial, antibiotic, antiviral, antifungal, antibacterial and hepatoprotective (Najafi *et al.* 2007). General medicinal uses of propolis have also been described; they include treatment of cardiovascular, blood system and respiratory disorders, and cancer (Kimoto *et al.* 1999), digestive tract disorders and immune system support (Ansorge *et al.* 2003) and dermatological disorders (Hausen *et al.* 1992). Propolis has been shown to stimulate various enzyme systems, cell metabolism, circulation and collagen formation (El-Kott and Owayss 2008). Most of these effects have been related to the antioxidant and free radical scavenging properties of propolis (Wang *et al.* 2004). The aqueous propolis extract contains about 90% of carbohydrates and 80% of total flavonoids

found in crude propolis. In aqueous propolis extract, most of flavonoids, terpenes, vitamins, amino acids, caffeic acid phenyl esters and other water-soluble compounds were released and remain free of wax and resin (Najafi *et al.* 2007). Recently, this nontoxic natural product was reported to show multiple pharmacological effects represented as antiviral, antibacterial, antifungal, anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties (Kumazawa *et al.* 2004).

Octylphenol has been demonstrated to stimulate free radical production, resulting in oxidative deterioration of lipids, proteins and DNA, and initiating various pathological conditions in humans and animals. Moreover, it has been shown that, both *in vivo* and in cultured hepatocytes, in parallel to liver damage, octylphenol may also determine a recognizable fragmentation of nuclear DNA and karyolysis (Kim *et al.* 2006). On the other hand, propolis may be useful for ameliorating toxic effects of different substances (Aso *et al.* 2004).

Therefore, the present study was conducted to investigate: (1) the biochemical alterations, oxidative stress and DNA fragmentation induced in liver from male albino rats treated with 4-tert-OP, (2) the role of propolis as a natural curative antioxidant product in alleviating that negative effect of 4-tert-OP, and (3) the effect of propolis alone on the tested biochemical parameters, as a protective supplement.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Octylphenol was purchased from Sigma-Aldrich Company (Los Angeles, USA). Crude propolis was obtained from honey bee (*Apis mellifera carnica*) colonies situated at the apiary of Faculty of Agriculture at Fayoum, Egypt. All other chemicals used in the experiment were of analytical grade.

Preparation of 4-tert-OP

4-tert-OP was suspended in corn oil, sonicated for 60 seconds and kept in refrigerator during the experiment period. The resulting suspension was administered to animals by gavage at doses of 100 mg/kg b.wt. (Barles and Aydogan 2008).

Preparation of aqueous propolis extract

Propolis was kept dry and frozen (-40°C) until used. Propolis samples were mixed with distilled water, heated gently and filtered through

Whatman No:1 filter paper. Propolis was freshly prepared and administered to animals by gavage at dose of 100 mg/kg b.wt. (El-Khayat *et al.* 2009).

Animals

Fifty adult male Swiss albino rats of the same age (6 weeks) and weighing 120-150 g were used throughout this study. Animals were obtained from the Egyptian Holding Company for Biological Products and Vaccines, Cairo, Egypt. Animals were maintained under standard conditions of ventilation, temperature ($25\pm 2^\circ\text{C}$), humidity (60-70%) and light/dark condition (12/12h). The rats were housed in stainless steel cages and provided with free access to food and drinking water *ad libitum*. After two weeks of acclimatization, animals were divided into 5 groups (n=10 each). Rats were orally administered their respective doses by gavage every day throughout the study. The local committee approved the design of the experiments, and the protocol complied with the guidelines of the National Institutes of Health (NIH, USA).

Experimental design

Animals were divided into 5 groups of 10 animals each. Group 1 (control group); rats were orally administered with corn oil once per day for 6 weeks and for 12 weeks. Group 2 (4-tert-OP group); rats were orally administered with 4-tert-OP (100 mg/kg b.wt.) for 6 weeks. Group 3 (Propolis group); rats were daily administered with aqueous propolis extract (100 mg/kg b.wt.) for 6 weeks. Group 4; rats were orally administered with a combination of 4-tert-OP (100 mg/kg b.wt.) and aqueous propolis extract (100 mg/kg b.wt.) for 6 weeks. Group 5; rats were orally administered with 4-tert-OP (100 mg/kg b.wt.) for 6 weeks followed by a combination of 4-tert-OP (100 mg/kg b.wt.) and aqueous propolis extract (100 mg/kg b.wt.) for another 6 weeks.

Biochemical analysis

At the end of the experiment, animals were sacrificed using ether anesthesia and decapitation after a 24 hours fasting period from the final administration. Blood samples were collected, left to clot and then centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. Serum was stored at -80°C for evaluating the biochemical parameters. Another blood samples were collected immediately on heparin to obtain plasma samples. Tubes

with heparinized blood were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes and stored at -80°C .

Liver tissue

Antioxidant parameters

Liver tissue was minced and homogenized (10% w/v) in tris-sucrose buffer (50mM Tris-HCl, 0.25M sucrose, pH 7.2-7.4) by using a tissue homogenizer (Mechanika precyzyjna Warszawa MPW-309, Poland). The homogenate was centrifuged at 5000 rpm for 20 minutes at 4°C , and the supernatant was used for determination of biochemical parameters, assay of different antioxidant enzymes and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).

Histopathological studies

Liver were immediately excised, washed using chilled saline solution, blotted, weighed and processed for biochemical studies. A small piece of each was immediately fixed in 10% formalin. These formalin-fixed tissues were embedded in paraffin, sectioned (5mm), stained with hematoxylin and eosin (H&E), and examined under a light microscope for histopathological assessment.

Blood parameters

Serum was used to estimate the following liver enzymes, alanine transaminase (ALT; EC 2.6.1.2) and aspartate transaminase (AST; EC 2.6.1.1) (Reitman and Frankel 1957), alkaline phosphatase (ALP; EC 3.1.3.1) (Bessey *et al.* 1946) and gamma glutamyl transferase (GGT; EC 2.3.2.2) (Rosalki 1975) using BioMed kit (Hannover, Germany). Total and direct bilirubin determinations (Pearlman and Lee 1974) were performed by using Diamond Diagnostics kit (Hannover, Germany). Serum and liver total protein contents (Lowry *et al.* 1951), albumin concentration (Doumas *et al.* 1971), urea and creatinine (Henry 1974; Patton and Crouch 1977), total lipids (Knight *et al.* 1972), total cholesterol (Allain *et al.* 1974), triglycerides (Fossati and Prencipe 1982) and HDL-cholesterol (Castelli *et al.* 1977) were quantified using BioMed kit (Hannover, Germany). Finally, serum LDL-cholesterol was calculated using the equation of [total cholesterol-(triglycerides/5)-HDL-cholesterol]. Total antioxidant capacity was measured in plasma using the commercial Biodiagnostic Company Kit according to the previously described method (Koracevic *et al.* 2001). Hepatic malondialdehyde (MDA) level was estimated

(Esterbauer and Cheeseman 1990) in terms of thiobarbituric acid reactive substances formation. The activity of glutathione S-transferase (GST; EC 2.5.1.18) was measured according to the method of Habig *et al.* (1974). The activity of catalase enzyme (CAT; EC 1.11.1.6) in tissue supernatant was measured according to the method of Xu *et al.* (1997). Total (Cu-Zn and Mn) superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) was assayed according to a previous described method (Minami and Yoshikawa 1979).

DNA fragmentation

Liver samples were collected immediately after sacrificing the animals. The damage of DNA was tested by using the diphenylamine assay according to Gibb *et al.* (1997).

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation (S.D.) of ten replicate determinations. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) to assess significant differences among different groups (Sokal and Rohlf, 1969). The results are considered to be significant when $P < 0.05$. All statisti-

cal analyses were performed using SPSS software program version 16 (SPSS[®] Inc., USA).

RESULTS

No mortality was seen in animals during the study. The dose of propolis did not initiate any side effects for the animals, whereas many side effects were observed in animals treated with 4-tert-OP such as yellowish body hair, loosing of body weight, general weakness (completely loss of activity), abdominal edema and enlargement of testes.

Blood parameters

The data summarized in *Figure 1* indicates that, AST, ALT, ALP and GGT activities were significantly increased ($P < 0.05$) in rats receiving 4-tert-OP either alone (group 2) or in combination with aqueous propolis extract (groups 4 and 5) when compared with the control group (group 1). However, the same parameters in rats receiving aqueous propolis extract alone (group 3) were significantly lower ($P < 0.05$) than the control group. Control group of 12 weeks presented the same characteristics of the 6 weeks control group.

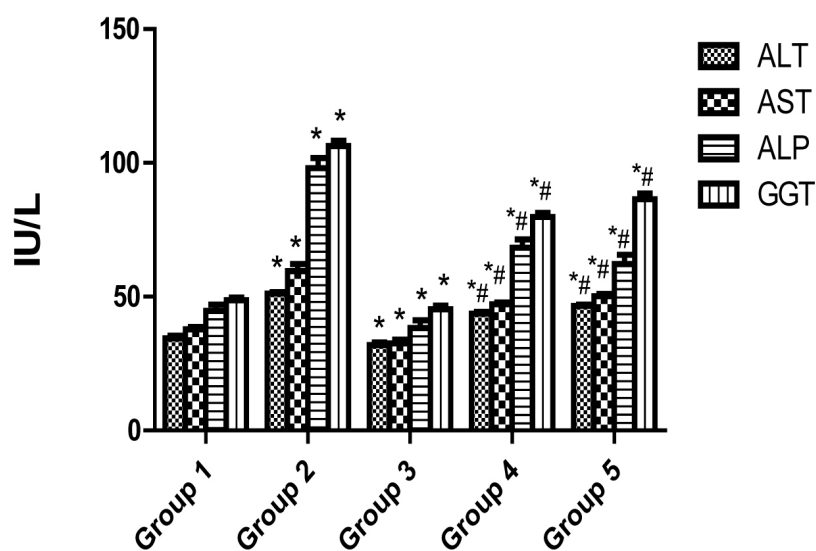


Figure 1. Changes in the activities of serum ALT (IU/l), AST (IU/l), ALP (IU/l) and GGT (IU/l) of male albino rats treated with 4-tert-OP (group 2), aqueous propolis extract (group 3) and combination of both (groups 4 and 5).

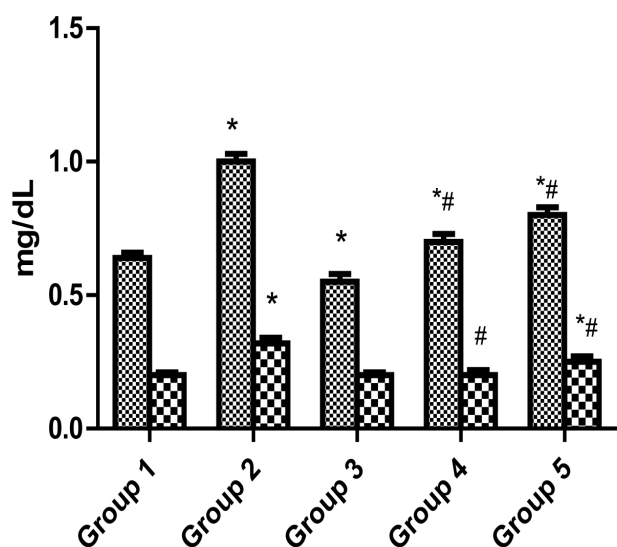
Values are expressed as means \pm SD; n=10 for each treatment group.

Significant difference from the control group at * $P < 0.05$.

Significant difference from the octylphenol group at # $P < 0.05$.

Figure 2 shows the significant increase ($P<0.05$) in total bilirubin level in groups treated with 4-tert-OP either alone or combined with aqueous propolis extract compared to control group. Meanwhile, there was a significant decrease ($P<0.05$) in the level of the same parameter in propolis group compared to the control group. In addition, in Figure 2, it is demonstrated the positive effect of aqueous propolis extract in groups 4 and 5, as detected by the significant decrease ($P<0.05$) in the level of bilirubin of those groups compared to the 4-tert-OP group. On the other hand, no significant changes were detected in the level of direct bilirubin of propolis group although there was a significant increase ($P<0.05$) in the same parameter of 4-tert-OP group compared to control group. In groups 4 and 5, a sig-

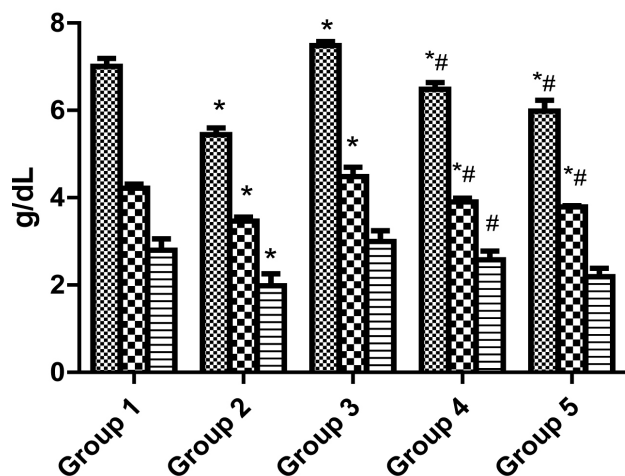
nificant decrease was detected in direct bilirubin level compared to 4-tert-OP group. Total proteins content and albumin were significantly decreased ($P<0.05$) only in rats receiving 4-tert-OP alone when compared to the control group. However, the same parameters were significantly increased ($P<0.05$) and significantly decreased ($P<0.001$) when compared to rats receiving aqueous propolis extract alone (group 3) or rats receiving a combination of both 4-tert-OP and aqueous propolis extract (groups 4 and 5) in relation to control group, respectively. In addition, aqueous propolis extract treatment significantly attenuated the 4-tert-OP-mediated decrease in serum total proteins, albumin and globulin concentrations as shown in Figure 3.



█ Total Bilirubin
 █ Direct Bilirubin

Figure 2. Concentration of total and direct bilirubin (mg/dl) of male albino rats treated with 4-tert-OP (group 2), aqueous propolis extract (group 3) and combination of both (groups 4 and 5).

Values are expressed as means±SD; n=10 for each treatment group. Significant difference from the control group at * $P<0.05$. Significant difference from the octylphenol group at # $P<0.05$.



█ Total Proteins
 █ Albumin
 █ Globulins

Figure 3. Serum level of total proteins (g/dl), albumin (g/dl) and globulin (g/dl) of male albino rats treated with 4-tert-OP (group 2), aqueous propolis extract (group 3) and combination of both (groups 4 and 5).

Values are expressed as means±SD; n=10 for each treatment group. Significant difference from the control group at * $P<0.05$. Significant difference from the octylphenol group at # $P<0.05$.

Further, 4-tert-OP treatment led to a significant increase ($P<0.05$) in the creatinine and urea levels, while aqueous propolis extract showed a significant recovery in these parameters ($P<0.05$) by reducing their concentrations in serum. Treatment with 4-tert-OP plus aqueous propolis extract significantly alleviated the undesirable increased levels of creatinine and urea when compared to with 4-tert-OP-treated animals (Table 1). Total serum lipids, total cholesterol, triglycerides and LDL-C levels were significantly in-

creased ($P<0.05$) while HDL-C was significantly lowered ($P<0.05$) in 4-tert-OP group when compared to the normal control rats (Table 2). Aqueous propolis extract could significantly ($P<0.05$) modulate the lipid contents in rats by decreasing total lipids, total cholesterol, triglycerides and LDL-C levels with significantly favorable increase ($P<0.05$) in HDL-C level. In addition, propolis extract reversed the alterations induced by 4-tert-OP in all lipid contents as shown from the results of groups 4 and 5 (Table 2).

Table 1. Serum level of creatinine (mg/dl) and urea (mg/dl) of male albino rats treated with 4-tert-OP (group 2), aqueous propolis extract (group 3) and combination of both (groups 4 and 5).

Group Parameter	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
Creatinine	0.57±0.02	0.81±0.03*	0.54±0.02*	0.69±0.03*#	0.74±0.03*#
Urea	22.48±0.17	30.18±0.46*	20.94±0.46*	26.64±0.54*#	28.23±0.32*#

Values are expressed as meansSD; n=10 for each treatment group.
Significant difference from the control group at * $P<0.05$.
Significant difference from the octylphenol group at # $P<0.05$.

Table 2. Changes in the concentrations of serum total lipids (mg/dl), total cholesterol (mg/dl), triglycerides (mg/dl), HDL (mg/dl) and LDL (mg/dl) of male albino rats treated with 4-tert-OP (group 2), aqueous propolis extract (group 3) and combination of both (groups 4 and 5).

Group Parameter	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
Total lipids	436.57±3.03	838.83±6.76*	400.275±10.50*	548.91±12.03*#	514.75±11.42*#
Total cholesterol	119.46±1.69	174.64±0.60*	99.31±1.16*	138.60±1.21*#	121.72±1.65#
Triglycerides	89.44±1.64	129.42±1.91*	50.20±2.42*	104.06±1.82*#	94.91±1.98*#
HDL	37.80±0.80	16.71±0.82*	55.34±0.90*	31.60±0.95*#	34.79±0.85*#
LDL	63.77±1.77	132.10±1.69*	34.00±0.90*	86.19±2.11*#	67.96±1.86*#

Values are expressed as meansSD; n=10 for each treatment group.
Significant difference from the control group at * $P<0.05$.
Significant difference from the octylphenol group at # $P<0.05$.

Hepatic oxidative stress

Plasma total antioxidant enzymes concentration and GST, SOD and CAT activities were significantly decreased ($P<0.05$) in 4-tert-OP group compared to control group. However, the concentrations and activities of total antioxidant enzymes, GST, SOD and CAT were significantly increased ($P<0.05$) when aqueous propolis extract was administered in both, groups 4 and 5, compared to 4-tert-OP group. Administration of aqueous propolis extract alone induced a significant increase in total antioxidant capacity, GST, SOD

and CAT compared to control group (Table 3). Animals treated with 4-tert-OP had a significant increase ($P<0.05$) in the level of MDA concentration compared to control group (Table 3). Simultaneous treatment with aqueous propolis extract (groups 4 and 5) significantly abolished the enhancing effect of 4-tert-OP on hepatic lipid peroxidation, fact that was expressed as a lower level of MDA in hepatocytes ($P<0.05$). In group 3, treated with aqueous propolis extract only, no effect on lipid peroxidation in the liver was observed (Table 3).

Table 3. Changes in the levels of plasma total antioxidant capacity (mM/L) and liver MDA (n mole/g tissue), SOD (units/g tissue), CAT (mole/min/g tissue), and GST (units/g tissue) of male albino rat treated with 4-tert-OP (group 2), aqueous propolis extract (group 3) and combination of both (groups 4 and 5).

Group Parameter	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
Total antioxidant capacity	1.09±0.06	0.59±0.03*	1.19±0.02*	0.83±0.01**	0.76±0.02**
MDA	158.81±11.23	658.96±20.46*	138.56±7.92	227.86±8.56**	352.24±7.89**
SOD	59.43±1.30	23.77±2.39*	65.70±3.19*	40.23±1.75**	31.91±1.62**
CAT	0.77±0.02	0.41±0.01*	0.91±0.01*	0.61±0.01**	0.51±0.01**
GST	2.04±0.11	1.06±0.06*	2.44±0.10*	1.80±0.08**	1.49±0.11**

Values are expressed as means±SD; n=10 for each treatment group.
Significant difference from the control group at * $P<0.05$.
Significant difference from the octylphenol group at # $P<0.05$.

DNA fragmentation

The results of the diphenylamine assay (Figure 4) showed that DNA of liver cells from 4-tert-OP treated animals was significantly degraded ($P<0.05$), compared to control group. Groups

4 and 5 showed a significant improvement ($P<0.05$) in the level of DNA fragmentation of liver cells, compared to 4-tert-OP treated group.

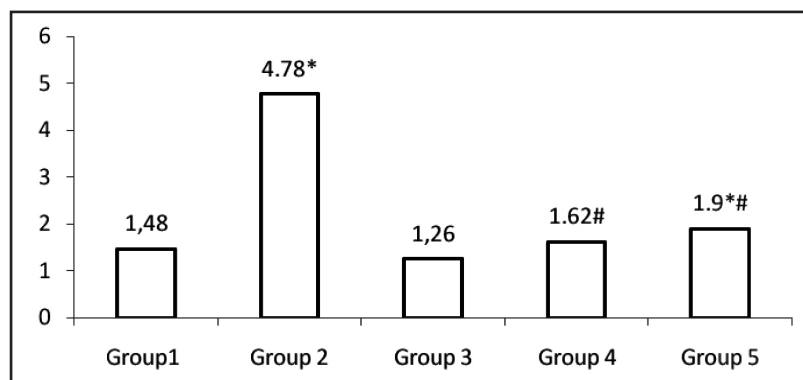


Figure 4. DNA fragmentation as a measure of soluble DNA released from apoptotic nuclei into the cytoplasm of male albino rat treated with 4-tert-OP, aqueous propolis extract and combination of both.

Values are expressed as means±SD; n=10 for each treatment group.
Significant difference from the control group at * $p<0.05$.
Significant difference from the octylphenol group at # $p<0.05$.

Histopathology

Histopathological examination of liver of control group revealed normal hepatic architecture, cellular and nuclear configurations (Figure 5). Histopathological alterations observed in 4-tert-OP treated group were variable. Liver section of rats treated with 4-tert-OP showed sinusoidal dilatation and atrophy of hepatocytes (Figure 6A) and multifocal areas of coagulative necrosis (Figure 6B). Sections of liver from rats treated with aqueous propolis extract alone, showed to be similar

to the control group sections (Figure 7). Livers from rats treated with 4-tert-OP plus aqueous propolis extract did not reveal any necrosis area and regained their normal structure (Figure 8A&B). Liver section from rats treated with 4-tert-OP followed by aqueous propolis extract showed moderate dilatation of portal blood vessels and vacuolar degeneration of hepatocytes (Figure 9A) and multifocal areas of minute aggregations of lymphocytes scattered here and there in the hepatic parenchyma (Figure 9B).

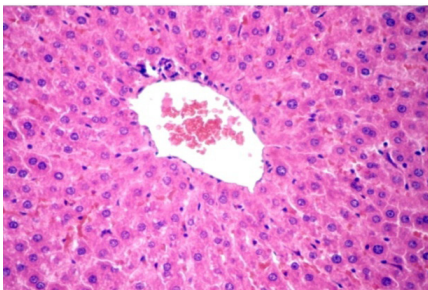


Figure 5. Photomicrograph of control liver section showing normal hepatic architecture. H&E stain (400x).

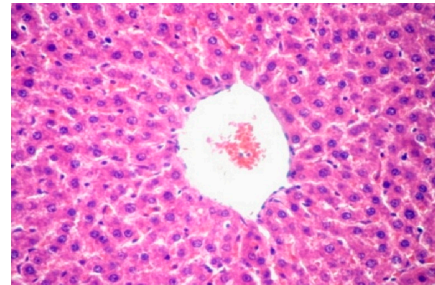


Figure 7. Photomicrograph of liver section of rats treated with aqueous propolis extract showing almost normal hepatic structure. H&E stain (400x).

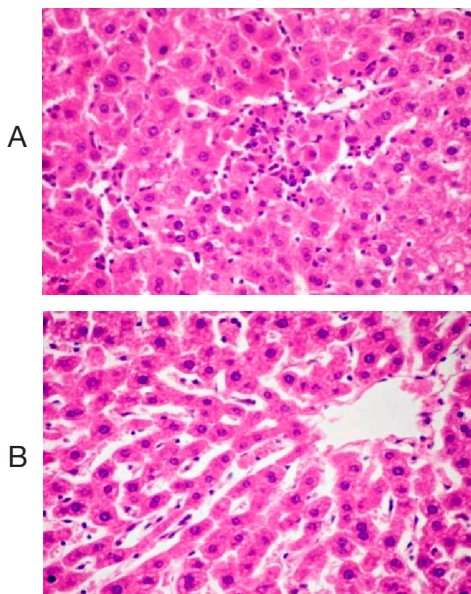


Figure 6. Photomicrograph of liver section of rats treated with 4-tert-OP showing sinusoidal dilatation and atrophy of hepatocytes (A) and multifocal areas of coagulative necrosis (B). H&E stain (400x).

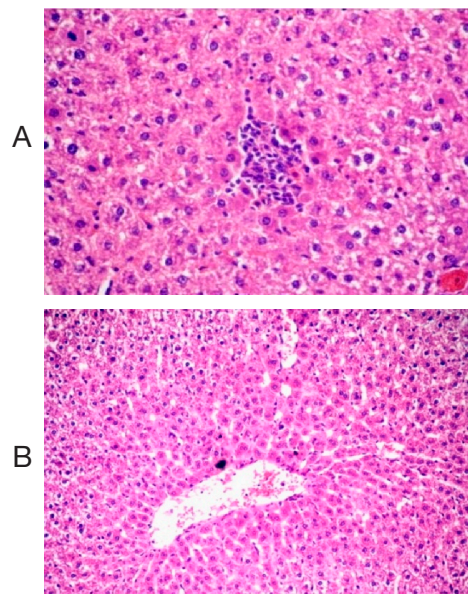


Figure 8. Photomicrograph of liver section of rats treated with 4-tert-OP plus aqueous propolis extract showing central veins were mildly dilated with mild peripheral vacuolar degeneration of hepatocytes and Kupffer cell activation (A) and minute foci of mononuclear cell infiltrate were found scattered in the hepatic parenchyma (B). No areas of necrosis were observed in the livers of such group. H&E stain (400x).

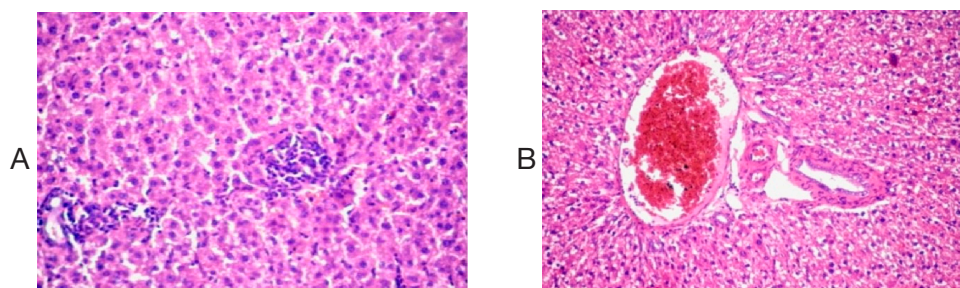


Figure 9. Photomicrograph of liver section of rats treated with 4-tert-OP followed by aqueous propolis extract showing moderate dilatation of portal blood vessels and vacuolar degeneration of hepatocytes (A) and multifocal areas of minute aggregations of lymphocytes scattered here and there in the hepatic parenchyma (B). H&E stain (400x).

DISCUSSION

The multi-generation studies in rats showed toxic effects of xenoestrogens not only on reproductive organs but also on non-reproductive targets such as kidney and liver (Nagao *et al.* 2001). The present study was performed to investigate the toxic effects of 4-tert-OP on liver and the ameliorating effect of aqueous propolis extract as a natural product able to reduce the induced oxidative damage in hepatocytes of male albino rats. Although few compounds have been tested for the detoxification of 4-tert-OP, there is no previous study carried out with propolis (Korkmaz *et al.* 2010). The adverse effects of a large number of xenoestrogens depend on their production of free radicals which initiate the process of lipid peroxidation in the cell membrane. It has been suggested that therapeutic activities of propolis depend mainly on the presence of flavonoids. These flavonoids are known for their strong scavenging effect on free radicals and may also be able to suppress the formation of free radicals by binding to heavy metal ions which are known to catalyze many processes leading to the generation of free radicals (Cavallini *et al.* 1978). The aqueous propolis extract was shown to have a protective effect on hepatocytes against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced injury *in vitro* (Mahran *et al.* 1996) and *in vivo* (El-Khatib *et al.* 2002).

The current results showed a pronounced decrease in the activities of serum ALT, AST, ALP and GGT after oral treatment with aqueous propolis extract in both group 4 and 5 compared to 4-tert-OP group. These results indicate hepato-protection induced by propolis. This protective effect may be due to the antioxidant effect of propolis which was previously confirmed (Almaraz-Abarca *et al.* 2007).

Another study (Kolankaya *et al.* 2002) reported that the treatment with propolis significantly prevented the release of transaminases and significantly enhanced protein towards control, suggesting its hepatoprotective potential. The induction of AST, ALT and ALP reflects liver injury associated with necrosis, whereas GGT points to hepatic cholestasis (Rodriguez-Garay 2003). As shown from the present results, elevated levels of these liver enzymes plus total and direct bilirubin in blood circulation were observed in 4-tert-OP group compared to control group indicating hepatic injury. This is in agreement to previous results, showing that increased bilirubin levels indicated diffused harm to the liver (El-Kott and Owayss 2008). The rise in both AST and ALT levels is one of the most familiar indicators of hepatocellular damage. These observations are similar to the previously reported data (Barles and Aydogan 2008) which indicated that the exposure of male and female rats to 4-tert-OP induced potential toxic effects on liver, kidney and spleen tissues. The present data also indicated that treatment with aqueous propolis extract alone decreased the activities of AST, ALT, ALP and GGT enzymes and total bilirubin in serum compared to control group.

The present study indicated hepatocellular toxicity in 4-tert-OP treated rats as evidenced by decreased levels of protein content compared to control animals. These results are in agreement with other studies (Lotfy 2006). The anabolic effect of propolis was suggested by the increased level of serum total proteins and globulin contents in propolis treated group compared to control. This effect of propolis is in agreement with other study (Nirala *et al.* 2008) which stated that propolis significantly improved the total proteins content of the

liver and kidney and showed more profound therapeutic effects. Cellular recovery was also evident through the improvement in total proteins, albumin and globulin contents in both group 4 and 5 compared to 4-tert-OP group. This is in agreement to previous results that showed intracellular glutathione regulated protein turnover after treatment with propolis (Demasi and Davies 2003).

In this study, nephrotoxicity was manifested by inhibition of kidney function as indicated by increased serum creatinine and urea levels in 4-tert-OP group compared to control group. These results are supported by similar findings (Ferreira-Leach and Hill 2001). 4-tert-OP acts essentially in the proximal renal tubules, inhibiting the enzyme phosphoenol-pyruvate carboxylase, and it alters the structural and functional renal ability to metabolize calcium (Betina 1989). Significant reduction of serum urea and creatinine levels was noticed after administration of aqueous propolis extract in both group 4 and 5 compared to 4-tert-OP group. These results may indicate that propolis can attenuate renal damage by decreasing the concentrations of urea and creatinine as previously reported (Abo-salem *et al.* 2009) on STZ-induced diabetic rats. This effect is probably due to the antioxidant protective effect of propolis which could have accumulated in the cells of the proximal convoluted tubule of the kidney where propolis was reported to be collected and secreted (Sun *et al.* 2000). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a biological active component of propolis was found to improve renal function tests in a rat model with lithium-induced renal tubular damage and oxidative stress (Oktem *et al.* 2005).

In the current study, a marked increase in the concentrations of serum total lipids, total cholesterol, triglycerides, LDL-C with a decrease in the level of HDL-C was found in the 4-tert-OP treated group compared with control group, which may reflect the impairment of liver function, particularly on lipid metabolism. Different studies indicated that propolis alleviated too high blood lipids, high total cholesterol and arteriosclerosis (Castaldo and Capasso 2002). This result is in agreement to the present data in both group 4 and 5 compared to 4-tert-OP group and represents the powerful influence of propolis to reduce the risk of hyperlipidemia as a result of some toxicant. Several studies are in agreement with the present study (Nirala *et al.* 2008) which proved the modulating effect

of propolis on total cholesterol and triglycerides levels with a significant increase in total proteins content after beryllium toxicity and the improvement of serum level of HDL-C by propolis in a dose-dependent manner.

Malondialdehyde (MDA), the stable end product of lipid peroxidation, was elevated suggesting the generation of free radicals in the metabolism of 4-tert-OP. Since, membrane phospholipids are major targets of oxidative damage, lipid peroxidation is often the first parameter analyzed for proving the involvement of free radical damage. Lipid peroxidation produces a progressive loss of cell membrane integrity, impairment in membrane transport function and disruption of cellular ion homeostasis (Bano and Bhatt 2007). Previous studies suggested that the toxicity of 4-tert-OP may be the result of three major effects: inhibition of ATP synthesis, inhibition of protein synthesis and enhanced lipid peroxidation (Marquardt and Frohlich 1992). In the present study, aqueous propolis extract attenuated the 4-tert-OP induced MDA formation possibly due to its intrinsic antioxidant properties, thus aqueous propolis extract may prevent peroxidative changes in liver tissue. This observation demonstrates the scavenging effect of propolis on free radicals produced by liver in response to 4-tert-OP toxicity. These results are in agreement with another study (Abdel-Wahhab *et al.* 2005), in which the protecting effect of propolis on ochratoxin A toxicity was demonstrated.

Improvement of lipid profile, MDA and SOD activity in mice by propolis treatment was demonstrated (Luan *et al.* 2000). Furthermore, propolis was found to modulate antioxidant enzymes and decrease lipid peroxidation processes in plasma, liver, lungs, and brain of mice in a dose- and tissue-dependent manner (Shinohara *et al.* 2002). Propolis is a rich source of essential elements, including Zn²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ and Ca²⁺ (Haro *et al.* 2002), that might also be responsible for reactivating antioxidant enzymes by providing optimum trace elements.

The present study showed significant improvement in SOD activity after treatment with aqueous propolis extract. This improvement can play an important role in the cellular defense against the oxidative stress induced by 4-tert-OP. Previous study (Benguedouar *et al.* 2008) proved the decreasing of superoxide anion radicals and inhibition of the lipid

peroxidation in animals receiving 100 mg/kg propolis extract. In the present study, the increase of antioxidant enzyme activities such as SOD, CAT and GST may be considered as a protective mechanism against free radical production and lipid peroxidation. The results also showed that SOD, CAT and GST activities significantly decreased in rat blood by 4-tert-OP intoxication compared to control animals. It is possible that the observed insufficiency in antioxidant power could be due to direct modification of the antioxidant defenses by 4-tert-OP.

The dramatic effects of 4-tert-OP on protein level and the activity of liver enzymes and antioxidant enzymes are supported by the results on DNA fragmentation. The liver DNA in 4-tert-OP treated animals was found to be greatly degraded compared to control animals, which may explain the deleterious effect of 4-tert-OP on the level of cellular proteins and enzymes. This result is in agreement with previous results of Kim *et al.* (2006). The ameliorative effect of aqueous propolis extract on DNA fragmentation and cell apoptosis was confirmed by the results of group 4 and 5 compared to 4-tert-OP group, and this result is supported by similar findings of Aso *et al.* (2004).

CONCLUSION

The present study demonstrates that 4-tert-OP induced oxidative stress in rat blood by decreasing the activities of antioxidant enzymes and protein content with an increase in liver enzymes activities. Propolis could improve liver function and serum lipid profile, and diminish the generation of free radicals by inducing antioxidant defense mechanism, hence, minimizing the damage of cell membranes. In addition, it had an anabolic effect. These results are confirmed by measuring the level of DNA fragmentation. These results were observed when aqueous propolis extract was administered alone compared to control group and also in combination with 4-tert-OP compared to 4-tert-OP group either in group 4 and 5. Based on these promising findings, it might be anticipated that propolis treatment may be beneficial in the severely hepatotoxic ailments. Consequently, propolis could be used as a potential antioxidant against 4-tert-OP intoxication as it restore the normal liver functions.

ACKNOWLEDGMENTS

The author thanks Biochemistry Department, Ain Shams Univer-

sity-Faculty of Science for laboratory facilities and instrumental support of this work. I also thank Professor Elshazly M.O. (professor of Pathology-Faculty of veterinary medicine-Cairo University) for his help in histopathologic examination.

REFERENCES

Abdel-Wahhab M.A., Abdel-Galil M.M., El-Lithey M. Melatonin counteracts oxidative stress in rats fed an ochratoxin A contaminated diet. *J. Pineal Res.* 2005;38:130-135.

Abo-salem O., El-edel R.H., Harisa G.E., El-halawany N., Ghonaim M.M. Experimental diabetic nephropathy can be prevented by propolis: effect on metabolic disturbances and renal oxidative parameters. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2009;22(2):205-210.

Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S., Richmond W., Fu P.C. Enzymatic determination of the total serum cholesterol. *J. Clin. Chem.* 1974;20:470-475.

Almaraz-Abarca N., Campos M.G., Avila-Reyes J.A. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2007;20:119-124.

Ansorge S., Reinhold D., Lendeckel U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences.* 2003;58(7-8):580-589.

Aso K., Kanno S., Tadano T., Satoh S., Ishikawa M. Inhibitory Effect of Propolis on the Growth of Human Leukemia U937. *Biol. Pharm. Bull.* 2004;27(5):727-730.

Bano M., Bhatt D.K. Neuroprotective role of a novel combination of certain antioxidants on lindane (γ -HCH) induced toxicity in cerebrum of mice. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 2007;3(6):664-669.

Barles N., Aydogan M. Histopathological effects of maternal 4-tert-octylphenol exposure on liver, kidney and spleen of rats at adulthood. *Archives of toxicology.* 2008;83(4):341-349.

Benguedouar L., Boussenane H.N., Kebsa W., Alyane M., Rouibah H., Lahouel M. Efficiency

of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2008;46:112-119.

Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 1946;164:321-329.

Betina V. *Mycotoxins-chemical, biological and environmental aspects*. Amsterdam (NL): Elsevier. 1989;325-421.

Bulayeva N.N., Watson C.S. Xenoestrogen-induced ERK-1 and ERK-2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Environmental Health Perspectives*. 2004;112(15):1481-1487.

Céspedes R., Lacorte S., Ginebreda A., Barceló D. Occurrence and fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter River (Catalonia, NE Spain). *Environmental Pollution*. 2008;153(2):384-392.

Calafat A.M., Ye X., Wong L.Y., Reidy J.A., Needham L.L. Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*. 2008;116(1):39-44.

Castaldo S., Capasso F. Propolis an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002;73:1-6.

Castelli W.P., Doyle J.T., Gordon T., Hames C.G., Hjortland M.C., Hulley S.B., Kagan A., Zukel W.J. HDL Cholesterol and Other Lipids in Coronary Heart Disease: The cooperative Lipoprotein Phenotyping Study. *Circulation*. 1977;55(5):767-772.

Cavallini L., Bindoli A., Siliprandi N. Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids. *Pharmac. Res. Commun.* 1978;10:133-136.

Demasi M., Davies K.J. Proteasome inhibitors induce intracellular protein aggregation and cell death by an oxygen dependent mechanism. *FEBS Letters*. 2003;542:89–94.

Doumas B.T., Watson W.A., Biggs H.G. Albu-

min standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta*. 1971;31:87-96.

El-Khatib A.S., Agha A.M., Mahran L.G., Khayyal M.T. Prophylactic Effect of Aqueous Propolis Extract against Acute Experimental Hepatotoxicity in vivo. *Z. Naturforsch.* 2002;57c:379-385.

El-Khayat Z., Ezzat A.R., Arbid M.S., Rasheed W.I., Elias T.R. Potential effects of bee honey and propolis against the toxicity of ochratoxin a in rats. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2009;2(4):1-8.

El-Kott A.F., Owayss A.A. Protective effects of propolis against the amitraz hepatotoxicity in mice. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 2008;3(5):402-408.

Esterbauer H., Cheeseman K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymology*. 1990;186:407-421.

Fernandez V., Massa L., Quinones L., Simon-Giavarotti K.A., Giavarotti L., D'Almeida V., Azzalis L.A., Junqueira V.B., Videla L.A. Effects of gamma-hexachlorocyclohexane and L-3,3',5-triiodothyronine on rat liver cytochrome P450E1-dependent activity and content in relation to microsomal superoxide radical generation. *Biological Research* 2003;36(3-4):359-365.

Ferreira-Leach A.M., Hill E.M. Bioconcentration and distribution of 4-tert-octylphenol residues in tissues of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Environ. Res.* 2001;51:75-89.

Fidan A.F., Dundar Y. The effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* on DNA damage, protein oxidation, lipid peroxidation and some biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Diabetes and its complications* 2008;22(5):348-356.

Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *J. Clin. Chem.* 1982;28(10):2077-2080.

Galvao J., Abreu J.A., Cruz T., Machado G.A.S., Niraldo P., Daugsch A., Moraes C.S.,

Fort P., Park Y.K. Biological therapy using propolis as nutritional supplement in cancer treatment. *International Journal of Cancer Research*. 2007;3(1):43-53.

Gibb R.I., Taylor D.D., Wan T., O'Connor D.M., Doeriog D.L., GerHel-Taylor T. Apoptosis as a measure of chemosensitivity to cisplatin and taxol therapy in ovarian cancer cell lines. *Gynecology. Oncol.* 1997;65:13-22.

Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974;249:7130-7139.

Haro A., Lopez-Aliaga I., Lisbona F., Barrionuevo M., Alferez M.J.M., Campos M.S. Beneficial effect of pollen and/or propolis on the metabolism of iron, calcium, phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2002;48:5715-5722.

Hausen B.M., Evers P., Stuwe H.T., Konig W.A., Wollenweber E. Propolis allergy (IV) Studies with further sensitizers from propolis and constituents common to propolis, poplar buds and balsam of Peru. *Contact Dermatitis*. 1992;26(1):34-44.

Henry R.J. *Clinical chemistry: principles and techniques*. 2nd edition, Harper and Row, New York, USA, 1974.

Karafakioglu Y.S., Aslan R. Taurine prevents nonylphenol-induced oxidative stress in rats. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2010;9(1):37-43.

Kim S.K., Kim B.K., Shim J.H., Gil J.E., Yoon Y.D., Kim J.H. Nonylphenol and octylphenol-induced apoptosis in human embryonic stem cells is related to Fas-Fas ligand pathway. *Toxicological Sciences*. 2006;94(2):310-321.

Kimoto N., Hirose M., Kawabe M., Satoh T., Miyataka H., Shirai T. Post-initiation effects of a super critical extract of propolis in a rat two-stage carcinogenesis model in female F344 rats. *Cancer Lett.* 1999;147:221-227.

Knight J.A., Anderson S., Rawle J.M. Chemical basis of the sulfo-phosphovanillin reaction for the estimation of total serum lipids. *J. Clin.*

Chem. 1972;18(3):199-202.

Kolankaya D., Selmanoglu G., Sorkun K., Salih B. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chem.* 2002;78:213-217.

Koracevic D., Koracevic G., Djordjevic V., Andrejevic S., Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J. Clin. Pathol.* 2001;54:356-361.

Korkmaz A., Ahbab M.A., Kolankaya D., Barlas N. Influence of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced oxidative damages in liver of male rats. *Food Chem. Toxicol.* 2010;48(10):2865-2871.

Krieger T.R., Loch-Carusio R. Antioxidants prevent gamma-hexachlorocyclohexane-induced inhibition of rta myometrial gap functions and contractions. *Biology of Reproduction*. 2001;64(2):537-547.

Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 2004;84:329-339.

Longnecker M.P., Gladen B.C., Patterson D.G., Rogan W.J. Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in relation to thyroid hormone levels in neonates. *Epidemiology*. 2000;11:249-254.

Lotfy M. Biological activity of bee propolis in health and disease- a review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2006;7:22-31.

Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265-272.

Luan J., Wang N., Tian L. Study on the pharmacologic effect of propolis. *Zhong Yao Cai.* 2000;23(6):346-348.

Mahran L.G., El-Khatib A.S., Agha A.M., Khayyal M.T. The protective effect of aqueous propolis extract on isolated rat hepatocytes against carbon tetrachloride toxicity. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1996;22:309-316.

Marquardt R.R., Frohlich A.A. A Review of Recent Advances in Understanding Och-

ratoxicosis. *Journal of Animal Science*. 1992;70:3968-3988.

Minami M., Yoshikawa H. A simplified assay method of superoxide dismutase. *Clinica Acta*. 1979;92:337.

Nagao T., Yoshimura S., Saito Y., Nakagomi M., Usumi K., Ono H. Reproductive effects in male and female rats from neonatal exposure to p-octylphenol. *Reprod. Toxicol*. 2001;15:683-692.

Najafi M.F., Vahedy F., Seyyedini M., Jomehzadeh H.R., Bozary K. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. *Cytotechnology* 2007;54(1):49-56.

Nirala S.K., Bhadauria M., Mathur R., Mathur A. Influence of α -tocopherol, propolis and piperine on therapeutic potential of tiferron against beryllium induced toxic manifestations. *Journal of Applied Toxicology*. 2008;28: 44-54.

Oktem F., Ozguner F., Sulak O., Olgar S., Akturk O., Yilmaz H., Altuntas I. Lithium-induced renal toxicity in rats: protection by a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Mol. Cell. Biochem*. 2005;277(1-2):109-115.

Patton C.J., Crouch S.R. Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Anal. Chem*. 1977;49:464-469.

Pearlman F.C., Lee R.T. Detection and measurement of total bilirubin in serum, with use of surfactants as solubilizing agents. *Clin. Chem*. 1974;20:447-453.

Reitman S., Frankel S. Colorimetric determination of GOT and GPT activity. *Amer. J. Clin. Pathol*. 1957;28:56-63.

Rodriguez-Garay E.A. Cholestasis: human disease and experimental animal models. *Ann. Hepatol*. 2003;2:150-158.

Rosalki S.B. Gamma-glutamyltranspeptidase. In: *Advances in clinical chemistry*. Bodanski, O., and Latner, A. L. (eds.), Vol. 17, New York, London: Academic Press, 1975. p: 53-107.

Shinohara R., Ohta Y., Hayashi T., Ikeno T. Evaluation of antilipid peroxidative action of propolis ethanol extract. *Phytother Res*. 2002;16(4):340-347.

Sokal R.R., Rohlf F.J. *The principles and practice of statistics in biological research*. 1st edn. Freeman, W.H. and company, San Francisco, USA, 1969.

Sun F., Hayami S., Haruna S., Ogiri Y., Tanaka K., Yamada Y. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamin C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2000;48(5):1462-1465.

Wang B-J., Lien Y-H., Yu Z-R. Supercritical fluid extractive fractionation: study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chemistry*. 2004;86:237-243.

Xu J.B., Yuan X.F., Lang P.Z. Determination of catalase activity and catalase inhibition by ultraviolet spectrophotometry. *Chinese Environ. Chem*. 1997;16:73-76.

RESÚMENES DE TESIS

Caracterización bioquímica del veneno de la serpiente de coral *Micrurus tener*

Bénard-Valle, Melisa

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

mel@ibt.unam.mx

Las serpientes de coral son el grupo de elápidos más diversificado en el continente americano y pueden ser encontradas en prácticamente todos los hábitats desde el sur de E.U.A. hasta Argentina. Debido en parte a sus hábitos semifosoriales y a su naturaleza poco agresiva, estas serpientes ocasionan menos del 5% de los accidentes ofídicos que ocurren en América. Independientemente de su baja incidencia, estos envenenamientos ocasionan cuadros clínicos marcadamente neurotóxicos cuya severidad varía de leves a muy graves e incluso fatales. La investigación de la composición de estos venenos y la caracterización de sus componentes tóxicos es de vital importancia en la comprensión de la fisiopatología de los envenenamientos y por lo tanto el desarrollo de tratamientos adecuados.

El objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar los componentes más relevantes del veneno de *Micrurus tener* involucrados en los procesos de envenenamiento en ratones así como en sus presas naturales. Éste contribuirá a ampliar el conocimiento actual respecto a la bioquímica de los venenos de serpientes de coral. Además, proporcionará nuevas herramientas para el estudio de estas toxinas desde un punto de vista funcional y toxicológico.

La estrategia experimental consistió en 3 etapas. En la primera se llevó a cabo el análisis del veneno completo mediante un ensayo tituló-métrico de actividad de fosfolipasa A₂ (PLA₂) sobre yema de huevo y electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Posteriormente, se determinó la dosis letal media (DL₅₀) y se realizaron observaciones de la signología en ratones y serpientes (género *Conopsis*) al inyectar el veneno por vía intravenosa y subcutánea.

Para iniciar la segunda etapa, el veneno fue separado por RP-HPLC y cada una de las fracciones obtenidas fue sometida a los mismos ensayos que el veneno completo además

de una determinación de masas moleculares mediante espectrometría de masas (ESI-MS). A partir de la información obtenida en las primeras dos etapas del proyecto, fueron seleccionadas las fracciones para realizar la tercera etapa. Ésta consistió en la determinación de la afinidad de cada fracción por el receptor nicotínico de acetilcolina muscular adulto (nAChR $\alpha\beta\epsilon\gamma$) murino mediante ensayos electrofisiológicos en los que se expresaron los receptores en ovocitos maduros de *Xenopus laevis*. Para realizar las mediciones se utilizó la técnica de *Voltage Clamp* de dos electrodos.

Se determinó en el veneno completo de *M. tener* una actividad de PLA₂ de 113,2 U/mg, la cual es acorde con la actividad observada en experimentos similares para otros venenos de coralillos norteamericanos. En cuanto a sus efectos *in vivo*, se determinó en ratones una DL₅₀ i.v. de 1,2 $\mu\text{g/g}$ y una DL₅₀ subcutánea (s.c.) de 4,4 $\mu\text{g/g}$ mientras que la DL₅₀ s.c. en reptiles fue de 12,1 $\mu\text{g/g}$. Posteriormente, se decidió obtener una dosis paralizante media (DP₅₀) definida como la dosis capaz de ocasionar una parálisis flácida generalizada al 50% de una población inyectada por vía subcutánea. No se observaron diferencias significativas al comparar la DP₅₀ s.c. en ratones (4,7 $\mu\text{g/g}$) con la DP₅₀ s.c. en reptiles (4,1 $\mu\text{g/g}$) por lo que no es posible suponer la existencia de especificidad del veneno por alguno de los modelos de estudio. Por otro lado, estas observaciones permiten concluir que el principal efecto ocasionado por el veneno es la parálisis flácida y la muerte de los ejemplares es consecuencia de ésta.

Al pasar el veneno por una columna C18 (RP-HPLC) se obtuvieron 32 fracciones, cada una de las cuales presentaba entre 2 y 8 componentes de masas moleculares distintas. Se identificaron cinco familias: a) compuestos de bases nitrogenadas; b) péptidos de bajo peso molecular (1 a 5 KDa); c) componentes α -neurotóxicos; d) fosfolipasas A₂ activas y e) proteínas de ma-

por peso molecular (17 a 22 KDa).

El grupo de componentes α -neurotóxicos representa cerca del 40% del veneno total y lo conforman moléculas con peso molecular entre 6 y 8 KDa. Entre éstas, sólo una fracción (F12) ocasionó parálisis flácida y muerte tanto en el modelo murino como en el reptil. Por otro lado, la fracción 6 ocasionó parálisis flácida y muerte en el modelo murino, sin embargo no tuvo ningún efecto en serpientes. Finalmente, las fracciones 10, 11, 13 y 15 ocasionan algún grado de parálisis (desde debilidad hasta parálisis flácida generalizada y muerte) en las serpientes mientras que no tienen ningún efecto observable en ratones. En los experimentos electrofisiológicos se observó que seis de las fracciones probadas (F6, F8, F10, F11, F12 y F13) tienen efecto bloqueador del nAChR $\alpha\beta\epsilon\gamma$ murino con una dosis inhibitoria media entre 24 nM (F6) y 496,6 nM (F11).

La familia de fosfolipasas A_2 activas está conformada principalmente por componentes de peso molecular entre 13 y 14 KDa y representa alrededor del 39% del total del veneno. En todas ellas se detectó actividad fosfolipasa A_2 . En cuanto a sus efectos *in vivo*, las fracciones 20a, 22 y 23 probaron ser letales en el mode-

lo murino y ocasionar algún grado de parálisis en serpientes. No se observó efecto alguno en ninguno de los modelos animales con el resto de las fracciones probadas.

El veneno de *Micrurus tener* está constituido por una mezcla compleja de componentes. Entre éstos, los más relevantes durante el envenenamiento en ratones son α -neurotoxinas y fosfolipasas A_2 . No se observó mayor letalidad del veneno completo al ser inyectado en serpientes respecto a aquella observada tras su inyección a ratones. El principal efecto ejercido por el veneno en ambos modelos animales es la parálisis flácida.

Respecto a las fracciones del veneno, solamente cinco mostraron ser letales para ratones. Se identificaron 6 fracciones con capacidad bloqueadora del nAChR murino. Se observaron 4 fracciones que ocasionan parálisis flácida en serpientes y sin embargo no tienen ningún efecto en ratones, lo cual puede ser evidencia de especificidad por los nAChR de reptiles.

Apoyo económico: Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México. Instituto Bioclon, México.

Tesis para optar al título de Maestra en Ciencias Bioquímicas.

Director: Dr. Alejandro Alagón Cano

Estudio de la glicoproteína P linfocitaria humana

Cortada, Catalina María

Laboratorio de Citogenética Humana y Genética Toxicológica – CIGETOX, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, CP 1113, CABA, 5950-8691
eldecata@yahoo.com.ar

La glicoproteína P es una bomba de eflujo de expresión ubicua y de múltiple especificidad de sustrato que ha sido implicada en la respuesta a fármacos y diversas patologías. Se determinó su actividad mediante el ensayo de eflujo de rodamina 123 en linfocitos de sangre periférica. En individuos sanos, su actividad presentó niveles alto, medio y bajo; no se encontró asociación con la edad, aunque en las mujeres resultó menor que en los varones. En dos patologías, VIH y colitis ulcerosa, la actividad resultó mayor que en la población sana. En particular en la colitis ulcerosa, el aumento de la misma se correlacionó con la actividad de la enfermedad y la resistencia al tratamiento.

En definitiva, en la población sana el grupo de

individuos con alta actividad y las mujeres con baja actividad de glicoproteína P resultan poblaciones de riesgo a sub y sobreexposición, respectivamente, a sustratos del transportador. En condiciones patológicas, posiblemente la glicoproteína P se vea inducida en respuesta a la polifarmacia, llegando a generar resistencia; el ensayo de eflujo resulta una herramienta útil en la identificación de este mecanismo. La información aportada apunta al desarrollo de tratamientos farmacológicos personalizados que consideren el efecto de este transportador.

Tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires, área Genética

Directora: Dra. Marta Carballo

Codirector: Dr. Modesto Rubio

Efecto de glutatión encapsulado en niosomas y glutatión libre en la intoxicación con acetaminofeno en gatos

Denzoin Vulcano, Laura A.

Área de Patología General y Área de Toxicología. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. Paraje Arroyo Seco, Tandil, Argentina

laura@vet.unicen.edu.ar

El gato doméstico, *Felis catus*, es un hipercarnívoro que se alimenta exclusivamente de proteína animal. Existe una relación directa entre la dieta y la evolución de las enzimas participantes en los procesos metabólicos por lo cual esta especie presenta deficiencias para los procesos de biotransformación resaltando como los más evidentes la glucuronoconjugación, metilación, hidroxilación, sulfoconjugación y conjugación con glutatión. Un ejemplo de estas particularidades es la lenta glucuronoconjugación del acetaminofeno en el gato doméstico, ya que la isoenzima UDP glucuronosiltransferasa 1A6 (UGT1A6) no se expresa en el hígado felino como resultado de múltiples mutaciones inactivantes sobre el gen que la codifica, dando lugar a un defecto de especie para el metabolismo de drogas.

En la mayoría de las especies, el acetaminofeno es metabolizado predominantemente por conjugación por ácido glucurónico y conjugación por sulfato. Un porcentaje de acetaminofeno es oxidado por el citocromo P-450 produciendo N-acetil p-benzoquinonaimina que se conjuga con GSH (glutatión) y es eliminado por orina como conjugados del ácido mercaptúrico. Los gatos tienen una limitada capacidad para metabolizar el acetaminofeno por glucuronoconjugación. El resultado es una elevada presentación de acetaminofeno a la vía oxidativa de citocromo P-450 que induce la formación del metabolito electrofílico, altamente reactivo, N-acetil p-benzoquinonaimina (NAPQI). Este metabolito, posee características electrofílicas que le permiten establecer aductos con las macromoléculas celulares provocando daño hepático y formación de metahemoglobina, la cual se produce en el gato por la abundancia de grupos tioles de la hemoglobina felina que la hace particularmente sensible al daño oxidativo.

El GSH es una molécula central en la homeostasis celular y una de sus funciones es la detoxificación de sustancias electrofílicas, entre ellos el metabolito reactivo NAPQI. Su uso para

el tratamiento de la intoxicación con acetaminofeno se encuentra limitado por su corta vida libre en plasma una vez que es administrado por vía endovenosa. La encapsulación del compuesto en nanovesículas de surfactante no iónico (NIOSOMAS), representa una alternativa para proteger la molécula de degradación plasmática y para favorecer su acumulación en hígado, permitiendo la inactivación del metabolito NAPQI.

En esta tesis se establecieron los valores fisiológicos de GSH, GSSG (glutatión oxidado) y GSht (glutatión total) en plasma, eritrocito e hígado que no estaban establecidos para el gato. Los valores encontrados en plasma (μM) fueron $4,50 \pm 0,98$ (GSH); $23,86 \pm 3,85$ (GSht) y $9,68 \pm 3,89$ (GSSG). En eritrocito, los valores (mM) fueron de $1,54 \pm 0,46$ (GSH); $2,87 \pm 0,88$ (GSht) y $0,66 \pm 0,36$ (GSSG). Para el hígado los valores (nM/mg de proteína) encontrados fueron de $34,58 \pm 15,10$ (GSH); $57,66 \pm 25,20$ (GSht) y $11,54 \pm 8,45$ (GSSG). El dato más significativo es que GSSG está presente en concentraciones más elevadas que GSH en plasma, contrariamente a lo que ocurre en otras especies, poniendo en evidencia que fisiológicamente en el gato existe una rápida oxidación de GSH a GSSG en el plasma como posteriormente se determinó en los ensayos realizados *in vitro*.

Se desarrolló una metodología para la encapsulación de GSH en NIOSOMAS. Estas vesículas se forman por la agregación de las moléculas de surfactante no iónico en un medio acuoso: las moléculas anfifílicas se orientan formando una bicapa que tiende a cerrarse sobre sí misma formando vesículas. La formación de las vesículas no es espontánea y requiere del agregado de energía en la forma de agitación o calor. Se ensayaron tres metodologías y diferentes proporciones de los componentes estructurales de las vesículas. Se obtuvieron vesículas con una relación Span 60/Colesterol/DCP, 67,5: 27,5:5 por el método de agitación sonicación que presentaron un porcentaje de atrapamiento

del 49,9% que fue considerado apto para los ensayos *in vivo*. Estas vesículas presentaron un tamaño de 422 nm. Los ensayos en animales de laboratorio mostraron buena tolerancia a la perfusión endovenosa.

Los estudios de farmacocinética de GSH libre (200 mg/kg y 13,66 mg/kg en cloruro de sodio al 0,9%) y GSH niosomal (13,66 mg/kg en cloruro de sodio al 0,9%) permitieron conocer el comportamiento plasmático-metabólico de estos compuestos. La dosis de GSH niosomal presentó una vida media de 58 minutos, duplicando la vida media de la misma dosis administrada en forma libre, como así también la vida media de la dosis de 200 mg/kg, permitiendo mantener niveles plasmáticos por encima del valor basal durante más tiempo. La dosis niosomal administrada vía intravenosa provocó un incremento significativo de la concentración de GSH en hígado y eritrocito con respecto a ambas dosis de la forma libre. El tratamiento con GSH a 200 mg/kg aumentó la concentración de GSH eritrocitario y hepático y permitió alcanzar concentraciones terapéuticas en plasma.

Se evaluó la respuesta de tres tratamientos GSH libre (200 mg/kg), GSH niosomal (13,66 mg/kg) y aminoácidos (180 mg/kg de N-acetilcisteína y 280 mg/kg de metionina) en animales intoxicados con acetaminofeno (Dosis tóxica: 150 mg/kg). Tanto el tratamiento con GSH libre (200 mg/kg) como el tratamiento con GSH niosomal en dosis de 13,66 mg/kg fueron efectivos para disminuir la hepatotoxicidad y la toxicidad hemática en gatos. Si bien ambas formulacio-

nes fueron efectivas, el grupo tratado con GSH (200 mg/kg) tuvo una menor formación de metahemoglobina y se estableció una mayor concentración de GSH en plasma, lo cual hace a este tratamiento más efectivo para la disminución de la metahemoglobina. El mecanismo de acción de GSH puede ser explicado por un doble efecto, por un lado inactivando NAPQI formada en las primeras horas de la intoxicación o fase metabólica y por otro lado, un efecto sobre la inactivación de las especies reactivas mitocondriales formadas en la fase postmetabólica de la intoxicación y que son las responsables de la amplificación del daño hepatocelular. El tratamiento con GSH niosomal agrega a estos efectos hepatoprotectores mencionados anteriormente un tercer efecto producto de la acumulación de las vesículas en las células Kupffer activadas por productos liberados durante la muerte de los hepatocitos. Producto de esta activación se produce la liberación de especies reactivas y óxido nítrico. GSH acumulado en estas células inactivaría estas especies reactivas lo cual explicaría el mayor efecto hepatoprotector de la formulación niosomal. Surge entonces el desarrollo potencial de una terapia combinada con niosomas y GSH libre, superadora de las terapias actualmente usadas.

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

Director: Alejandro L. Soraci

Codirectora: M. Ofelia Tapia

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

El envío de manuscritos se realizará a través del Portal de Publicaciones Científicas y Técnicas (PPCT) del Centro Argentino de Información Científica y Tecnológica (CAICYT). En la página web del PPCT-CAICYT <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ata> se encuentran las instrucciones para los autores.

La recepción de manuscritos a través de la cuenta envios.acta.ata@gmail.com se mantendrá hasta el 30 de diciembre de 2013 y luego se reemplazará por el sistema en línea.

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

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

b. Página en internet

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

c. Parte de una página de internet

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

Para la correcta citación de posibles referencias bibliográficas que pudiesen no citarse en este instructivo, consultar el estilo propuesto por el Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas en “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” disponible en: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

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

Submission of manuscripts will be made

through the Portal de Publicaciones Científicas y Técnicas (PPCT) of the Centro Argentino de Información Científica y Tecnológica (CAICYT). Instructions for authors will be found at the Acta-PPCT-CAICYT web page <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ata>

Manuscript reception at the email account `envios.acta.ata@gmail.com` will remain in effect until December 30th, 2013, then it will be replaced by the on line system.

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

O envio de manuscritos será realizado através do Portal de Publicações Científicas e Técnicas (PPCT) do Centro Argentino de Informação Científica e Tecnológica (CAICYT). Na página web do PPCT-CAICYT <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ata> estão apresentadas as instruções para autores.

A recepção de trabalhos através da conta envios.acta.ata@gmail.com será mantida até a data de 30 de dezembro de 2013. Após esta data a forma de envio será substituída pelo sistema online.

No caso de envio eletrônico, indicar no assunto: trabalho para *Acta* e no corpo da mensagem indicar o título do trabalho e os nomes e sobrenomes de todos os autores. Anexar o trabalho (arquivo de Word 2003 ou superior) digitado segundo instruções para autores detalhadas abaixo. Junto com o envio do trabalho deverá ser enviada uma carta ao Diretor em formato Word, com os nomes de todos os autores solicitando a consideração do artigo para publicação. Na carta deverá constar claramente que:

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

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

Aspectos gerais na preparação do trabalho como artigo original:

Os trabalhos devem ser digitados em processador de texto (Microsoft Word versão 2003 ou superior), **com espaço duplo** (inclusive resumos, referências e tabelas) com tamanho mínimo de letra Arial 12. As páginas deverão ser numeradas desde a capa. As letras em **negrito** ou *itálico* serão usadas somente quando corresponder.

Na primeira página deverá estar indicado: título do trabalho (maiúscula), nomes e 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 correspondentes. Os avisos para esclarecimentos de rodapé deverão ser realizados empregando números arábicos entre parênteses e super-índice. Somente as bordas externas da primeira e última linhas e a separação entre os títulos das colunas e os dados deverão ser marcados com linha contínua. Não marcar as bordas das colunas. Assegurar-se de que cada tabela seja citada no texto.

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

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

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

As epígrafes das figuras deverão ser apresentadas exclusivamente em folha à parte, ordenadas e numeradas, e deverão expressar especificamente o que mostra a figura.

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

Unidades de medida. As medidas de longitude, tamanho, peso e volume deverão ser

expressas em unidades métricas (metro, quilograma, litro) ou seus múltiplos decimais. As temperaturas serão expressas em graus Celsius e as pressões arteriais em milímetros de mercúrio. Todos os valores de parâmetros hematológicos e bioquímicos deverão ser apresentados em unidades do sistema métrico decimal, de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI). Não obstante, os editores poderão solicitar que, antes de publicar o artigo, os autores agreguem unidades alternativas ou diferentes das do SI.

Nomenclatura. No caso de substâncias químicas será tomada como referência prioritária as normas da IUPAC. Os organismos serão denominados conforme as normas internacionais, indicando sem abreviaturas o gênero e a espécie em itálico.

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

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

Bibliografia. As citações bibliográficas deverão estar indicadas no texto por meio do sobrenome

de/os autor/es (até dois autores) e o ano de publicação, tudo entre parênteses, separados por ponto-e-vírgula, e no caso de mais de uma citação, deve-se começar pela mais antiga à mais atual. No caso de mais de dois autores, serão indicados o sobrenome do primeiro autor seguido de *et al.* e o ano da publicação.

Exemplos:

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

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

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

Exemplos:

1. Artigo padrão em publicação periódica

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

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [on-line]. 2002 Jun. [consulta 12 de Agosto 2002];102(6):[1 p.]. Disponível em: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htmArticle>.

b. Página de internet

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

c. Parte de uma página de internet

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

Para a correta citação de possíveis referências bibliográficas que puderam não estar citadas neste documento, consultar o estilo proposto pelo Comitê Internacional de Diretores de Revistas Médicas em “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.