

ISSN 0327-9286

Acta
Toxicológica
Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 21
N° 1
Julio 2013

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*

Marta D. Mudry, *FCEyN, IEGEBA, UBA, CONICET*

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*

Fransisco 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

Genotoxicidad de mezclas de pesticidas: ¿algo más que la suma de las partes? <i>Coalova, Isis; Mencacci, Santiago; Fassiano, Anabella V.</i>	5
Afectación de las funciones cognitivas y motoras en niños residentes de zonas rurales de Jujuy y su relación con plaguicidas inhibidores de la colinesterasa. Un estudio piloto <i>Martos Mula, Ana J.; Saavedra, Olga N.; Wierna, Norma R.; Ruggeri, María A.; Tschambler, Javier A.; Ávila Carreras, Natalia M.; Bonillo, Mario C.; Bovi Mitre, María G.</i>	15
Anticoagulant and factor Xa like activities of <i>Tityus discrepans</i> scorpion venom <i>Brazón, Josmary; Guerrero, Belsy; D'Suze, Gina; Sevcik, Carlos; Arocha-Piñango, Carmen L.</i>	26
Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular <i>Martínez Flores, Karina; Souza Arroyo, Verónica*; Bucio Ortiz, Leticia; Gómez Quiroz, Luis Enrique; Gutiérrez Ruiz, María Concepción</i>	33
Citotoxicidade e atividade antiparasitária de <i>Lygodium venustum</i> SW <i>Morais-Braga, Maria Flaviana B.; Souza, Teógenes .M.; Santos, Karla K.A.; Andrade, Jacqueline C.; Guedes, Gláucia M.M.; Tintino, Saulo R.; Souza, Celestina E.S.; Costa, José G.M.; Saraiva, Antônio A.F.; Coutinho, Henrique.D.M.</i>	50
Resúmenes de tesis	
Biodisponibilidad y toxicidad de metales pesados en aguas naturales con características físico-químicas extremas. Bases para su monitoreo y remediación <i>Casares, María V.</i>	57
Instrucciones para los autores	59

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

Genotoxicidad de mezclas de pesticidas: ¿algo más que la suma de las partes? Pesticide mixtures genotoxicity: More than the sum of its parts?

Coalova, Isis^{1*}; Mencacci, Santiago²; Fassiano, Anabella V.^{1,3}

¹Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, 2° Pabellón, 4° piso, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CP 1428), Argentina. TE: 54-11-4576-3342, Fax: 54-11-4576-3342.

²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. ³Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET), Rivadavia 1917, Buenos Aires, Argentina.

*icoalova@qb.fcen.uba.ar

Recibido: 05 de mayo de 2012

Aceptado: 29 de octubre de 2012

Resumen. Un factor decisivo de la Revolución Verde ha sido el desarrollo y aplicación de plaguicidas para combatir una gran variedad de organismos considerados perjudiciales por el hombre, que afectan la productividad de los cultivos de interés agronómico. Sin embargo, el incremento sostenido del uso de pesticidas trajo aparejado un aumento de la presencia de los mismos en el ambiente, llegando a afectar a los ecosistemas y a la salud humana. La exposición de las poblaciones a plaguicidas, se da en forma de mezclas complejas, tanto por la aplicación de distintos plaguicidas en simultáneo como por la presencia de aditivos en las formulaciones comerciales.

Teniendo en cuenta la producción científica relacionada en los últimos años, el objetivo de este trabajo fue evaluar los avances sobre la genotoxicidad de pesticidas y sus mezclas, en concentraciones similares a las encontradas en el ambiente. Además, dada la complejidad de los estudios de monitoreo y la imposibilidad de establecer correlaciones directas, se propone reconocer la utilidad de los ensayos de corto plazo en niveles de evaluación de menor complejidad como una aproximación al contexto real.

Palabras clave: Genotoxicidad; Mezclas; Pesticidas; Monitoreo.

Abstract. A crucial factor of the Green Revolution has been the development and application of pesticides to prevent the potential harm of a variety of organisms that affect crop yields of agronomic interest. However, the sustained increase in the use of these compounds resulted in an enhancement of their presence in the environment, affecting ecosystems and human health. Populations are exposed to complex pesticide mixtures because they are usually combined and commercial formulations content several additives.

Considering the scientific output on the subject in recent years, the aim of this work is to evaluate advancement on the genotoxicity of pesticides and their mixtures at similar concentrations to those found in the environment. Moreover, given the complexity of monitoring studies and the lack of certainty to establish direct correlations, it is proposed to recognize the applicability of short-term tests of minor complexity as an approximation to the real context.

Keywords: Genotoxicity; Mixtures; Pesticides; Monitoring.

INTRODUCCION

Un factor decisivo de la Revolución Verde ha sido el desarrollo y aplicación de plaguicidas para combatir una gran variedad de organismos considerados perjudiciales por el hombre, que afectan la productividad de los cultivos de interés agronómico. Se entiende por "*plaguicida*" o "*pesticida*" cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, duran-

te la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos (Hayes 1974; Food and Agriculture Organization (FAO) y World Health Organization (WHO) 1997). Los plaguicidas pueden clasificarse según su constitución química, su polaridad, su principio activo y/o blanco de acción, entre otros aspectos. Según su

blanco de acción, son usualmente categorizados como herbicidas, insecticidas, fungicidas, acaricidas, raticidas, etc. También son clasificados según la familia química a la cual pertenecen, la cual está basada en la estructura química, el modo de acción y las propiedades físico-químicas. Existe una enorme diversidad de sustancias utilizadas como plaguicidas; la US *Environmental Protection Agency* (EPA) tiene registradas más de 1.500 sustancias activas en alrededor de 50.000 plaguicidas comerciales diferentes (González y col. 2008).

En la Argentina el volumen comercializado de plaguicidas refleja un incremento sostenido, habiendo aumentado un 92% entre los años 1998 y 2007 (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) 2011). Este incremento viene dado por la intensificación en la práctica de monocultivos y la aplicación continua de las mismas formulaciones, que llevan a la aparición de resistencias en los organismos que se pretenden controlar. De esta manera, y dada la ausencia de un plan estratégico que contemple estos eventos, los productores suelen incrementar tanto la cantidad de aplicaciones como las dosis de aplicación (Arias 2005). El incremento sostenido del uso de plaguicidas trae aparejado un aumento en la contaminación acuática, que constituye una de las formas predominantes de contaminación por estos productos, ya que las excesivas concentraciones de plaguicidas ingresan a los cuerpos de agua por escorrentía o percolación (Hoffman y col. 2003; Suter 2007). La llegada de estos compuestos a los cuerpos de agua, como también su depósito en sedimentos y volatilización, promueven su dispersión por el ambiente afectando a toda la biota. Por lo tanto, el hombre se encuentra expuesto a mezclas de distintos pesticidas en su lugar de residencia (a través de los alimentos) y en las zonas rurales. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas (World Health Organization 2012). Se han comprobado de manera fehaciente propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas en muchos de los más utilizados (International Agency For Research On Cancer (IARC) 1976, 1986, 1987, 1991)

Los plaguicidas se comercializan como formulaciones que contienen aditivos, tales como vehículos, emulsionantes, tensioactivos o adyuvantes que se agregan al ingrediente ac-

tivo para mejorar las propiedades físicas y químicas y facilitar la penetración al organismo blanco (Krogh y col. 2003). Para ahorrar tiempo y recursos, en un mismo tanque de aplicación se mezclan varios pesticidas con distintos principios activos, aditivos y para distintos organismos blanco, cuando las formulaciones están diseñadas para ser usadas individualmente disueltas en agua. En estas mezclas se desestiman las posibles interacciones no sólo entre los principios activos, sino también entre los aditivos de las distintas formulaciones. La exposición de las poblaciones a plaguicidas, se da en forma de mezclas complejas que son afectadas por distintos factores ambientales, siendo poco factible calcular el grado y la calidad de la exposición (Merletti y col. 1998).

Por lo tanto, en los últimos años ha aumentado la cantidad de trabajos de investigación que pretenden entender y evaluar las posibles consecuencias de la exposición a plaguicidas sobre el ambiente y principalmente sobre el ser humano (Alavanja y col. 2004; Reffstrup y col. 2010).

En particular, aquellos trabajos que utilizan biomarcadores de genotoxicidad han resultado buenos parámetros para analizar el potencial riesgo de una sustancia, ya que revelan el daño a la molécula fundamental de transmisión de la información de una generación a la siguiente, el ADN. Por lo tanto, se consideran buenos biomarcadores ya que permiten evaluar el riesgo de una sustancia potencialmente nociva y, además, su potencial carcinogénico (Mudry y Carballo 2006).

Teniendo en cuenta la producción científica relacionada, el objetivo de este trabajo fue evaluar los avances en los últimos años sobre la genotoxicidad de los pesticidas y sus mezclas en concentraciones similares a las encontradas por exposición ambiental. Además, dada la complejidad de los estudios de monitoreo y la imposibilidad de establecer correlaciones directas, se propone reconocer la utilidad de los ensayos de corto plazo, como son los ensayos de monitoreo, ensayos *in vitro* y ensayos *in vivo*, en niveles de evaluación de menor complejidad, como una aproximación al contexto real.

ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS Y AMBIENTALES

Se ha realizado una gran cantidad de trabajos que estudian distintos biomarcadores de genotoxicidad en poblaciones expuestas a

pesticidas. Dentro de los biomarcadores más utilizados se encuentra la frecuencia de micronúcleos (Mn), de aberraciones cromosómicas (AC), el índice de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y el ensayo Cometa (EC). Los sistemas celulares más utilizados en estos trabajos son los linfocitos de sangre periférica (LSP) y las células de la mucosa bucal ya que son de muy fácil acceso y los protocolos a utilizar están estandarizados. A continuación se presentan algunos de los trabajos publicados en los últimos años en la Argentina y otras partes del mundo.

En la provincia de Córdoba, Peralta y col. (2011) evaluaron el daño genético en pobladores de la ciudad de Marcos Juárez expuestos laboral o ambientalmente a plaguicidas. Para obtener una evaluación del potencial efecto de la exposición realizaron los ensayos de AC, Mn y EC en LSP. Sólo se encontraron diferencias significativas en el daño al ADN (EC) para pobladores expuestos ambientalmente respecto del grupo de referencia. Si bien los otros biomarcadores no presentaron diferencias estadísticas mostraron una tendencia a incrementarse con respecto a los grupos de referencia. Además, en este trabajo se encontró que aquellos individuos que pasan mayor tiempo dedicados a las aplicaciones de plaguicidas, tienen mayores valores de AC, Mn y EC que aquellos individuos que pasan menor tiempo dedicados a esta actividad, aunque dicha diferencia resultó ser significativa sólo para la frecuencia de Mn.

En otro trabajo realizado en la provincia de Santa Fe, se evaluaron alteraciones enzimáticas, modificaciones en el equilibrio oxidativo, daño genotóxico y capacidad del sistema de reparación mediante el EC en trabajadores frutihortícolas clasificados en aplicadores y no aplicadores. Este trabajo reveló que tanto los trabajadores en contacto directo como aquellos que se encontraban en contacto indirecto presentaban alteraciones en los parámetros analizados en relación a los grupos controles. Además, se analizó la influencia de los factores de confusión, como la edad, el sexo, el tabaquismo, el consumo de alcohol y la utilización del equipo de protección personal (EPP), en el daño genotóxico. Se pudo observar que sólo se encontraron diferencias significativas respecto del control en aquellos grupos que no utilizaban EPP (Simoniello y col. 2008; Simoniello y col. 2010). Este resultado refuerza la relación entre la exposición a plaguicidas y

el daño citotóxico y genotóxico.

Un estudio sobre 259 trabajadores agrícolas de distintas zonas de La Paz, Bolivia, evaluó el efecto genotóxico de la exposición ocupacional a pesticidas en LSP, a través de la frecuencia ICH, el índice de proliferación celular (PRI), la frecuencia de Mn, la presencia de AC y el daño al ADN medido con el EC. Se observó que los trabajadores agrícolas presentaron un aumento significativo en la frecuencia de ICH, Mn, AC e índice del EC en relación a los controles. Se realizó también un análisis de correlación entre exposición a plaguicidas y daño genotóxico, resultando que las personas expuestas a plaguicidas tenían 1,49 veces más probabilidad de sufrir daño genotóxico que los no expuestos (Ascarrunz y col. 2005). Otro estudio en otra zona de La Paz, realizado por Poma y col. (2010) mostró que una población de 118 agricultores, expuestos a plaguicidas organofosforados, piretroides o sus mezclas, sin EPP, tenían mayores índices de daño genotóxico que una población control de la misma zona. Esto se vio representado en un aumento del índice de daño al ADN en el EC de LSP y en un aumento en la frecuencia de Mn en células del epitelio bucal, que no se modificó por características individuales (sexo, edad, consumo de tabaco, etc.) de las personas estudiadas. También se puede resaltar de este estudio que aquellos trabajadores expuestos por más tiempo presentaron mayor daño genotóxico, en relación a los que utilizaron agroquímicos menos años o los que no los utilizaron nunca.

Por otro lado, estudios similares en dos comunidades de trabajadores rurales en Río Grande, Brasil, mostraron una relación directa entre la exposición a pesticidas y el daño al ADN (EC), independientemente del consumo de tabaco o la edad (Remor y col. 2009).

Este tipo de estudios no sólo se han llevado a cabo en Latinoamérica, sino que la problemática es de alcance mundial. Se han realizado estudios en otros países como en Croacia (Garaj-Vrhovac y Zeljezic 2001), India (Yadav y Kaushik 2002), Francia (Gallois y col. 2011), entre otros.

En los trabajos mencionados anteriormente y en otras revisiones bibliográficas (IARC 1991; Bolognesi 2003; Bull y col. 2006) se ha encontrado que existe una asociación positiva entre la exposición ocupacional a las mezclas de plaguicidas y la modificación de los biomarcadores de genotoxicidad. Esta asociación

refuerza la utilidad de los biomarcadores de genotoxicidad en los biomonitoreos de poblaciones humanas expuestas a mezclas de pesticidas.

Los datos obtenidos con estos biomarcadores evidencian que la genotoxicidad asociada a plaguicidas se da en poblaciones expuestas a altos niveles debido al uso intensivo, al mal uso o la falta de medios de control, como por ejemplo, la no utilización de EPP. Además, la mayoría de los biomarcadores estudiados en trabajadores expuestos indican una relación con la duración de la exposición y con su intensidad. A pesar de las asociaciones, no es posible atribuir los resultados observados directamente a un tipo de pesticida o a mezclas definidas, lo cual dificulta los aspectos regulatorios inherentes a las aplicaciones. Con este fin se realizan baterías de estudios en niveles de ensayo de menor complejidad que permitan comprender los efectos y mecanismos de acción de los compuestos individuales y las mezclas.

ESTUDIOS EN OTROS NIVELES

Además de los estudios epidemiológicos, existen estudios a otros niveles que evalúan el efecto genotóxico de pesticidas y sus mezclas.

Ensayos de monitoreo inicial

Dada la gran cantidad de compuestos químicos que sería necesario evaluar a fin de determinar si producen un daño químico, se ha propuesto una serie de ensayos de corto término entre los cuales se incluyen sistemas que permiten observar: mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas (translocación, dicentricismo, inversiones, deleciones terminales) y aneuploidía (número anormal de cromosomas). Dentro de estos tipos de ensayos y con preferencial atención al primer aspecto, se han desarrollado tests microbiológicos que permiten complementar otros ensayos (Mudry y Carballo 2006). Este tipo de ensayos han sido de gran utilidad en la evaluación de la toxicidad de pesticidas y mezclas de los mismos.

Por ejemplo, para investigar los efectos genotóxicos del metolcarb, un insecticida de la familia de los carbamatos, se utilizó el test de Ames en *Salmonella*, con y sin actividad metabólica (mezcla S9). Metolcarb resultó ser mutagénico en *S. typhimurium* TA98 sin S9 (Liman y col. 2010).

En otro trabajo se evaluó la genotoxicidad de 12 plaguicidas encontrados en alimentos (metil azinfos, clorotalonil, metil-clorpirifos, etil-

clorpirifos, cialotrin, cipermetrina, ciprodinil, fenazaquin, fludioxonil, indoxacabo, iprodiona y penconazol) y sus mezclas para evaluar las posibles interacciones. Se realizaron el test de Ames, en *Salmonella typhimurium* y el ensayo SOS Cromo Test en *Escherichia coli*. Para el caso del test de Ames, la mayoría de los pesticidas en forma individual presentaron efectos mutagénicos y las mezclas, efectos de interacción. Por otra parte, el SOS Cromo Test, no mostró variaciones para la mayoría de los pesticidas individuales y no fue significativo en las mezclas (Isidori y col. 2009).

Sin embargo, estudios realizados con plaguicidas encontrados aguas abajo del río Kotsuki, Japón, utilizando el test de Ames para medir mutagenicidad, mostraron que la contribución de los plaguicidas en la mutagenicidad del agua superficial resultó no significativa (Abiru y col. 2011). Otro trabajo que utilizó los valores de plaguicidas organoclorados encontrados en los sedimentos del lago Taihu, China, evaluó la mutagenicidad con el ensayo de *Salmonella* con y sin S9. Se observó efecto mutagénico de las mezclas, con variaciones entre regiones analizadas, pero no se encontró una correlación fuerte del tipo dosis-respuesta (Zhao y col. 2010).

A partir de estos resultados se puede ver que, si bien los ensayos de monitoreo aportan información del grado de genotoxicidad de los agentes, aunque los resultados son muy variables, sobre todo aquellos que estiman la mutagenicidad de matrices ambientales. Por lo tanto, resulta necesario complementar estos estudios con otros de niveles de complejidad superior.

Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* de genotoxicidad resultan de gran utilidad porque permiten detectar los efectos genotóxicos de diversos agentes en sistemas celulares humanos. Si bien en estos modelos no se tiene en cuenta la toxicocinética de las sustancias (absorción, distribución, metabolismo y excreción) es posible evaluar el potencial efecto de los agentes con una amplia batería de biomarcadores (Mudry y Carballo 2006).

Existen diversos estudios que evalúan la genotoxicidad de los pesticidas y sus mezclas en cultivos de células, tales como cultivos de LSP o líneas celulares establecidas de otros tejidos. Para estudiar el daño al ADN producido por mezclas de pesticidas a los que podría estar expuesto el ser humano, Das y col. (2007) estudiaron el efecto de tres mezclas equimola-

res de distintas clases de insecticidas: un organoclorado (endosulfan), un carbamato (carbofuran) y un organofosforado (monocrotofos). Para evaluar el efecto genotóxico utilizaron la técnica de AC (roturas de cromátides, fragmentos, gaps, aneuploidías y asociación de satélites) y la técnica de EC en LSP y mostraron que, si bien los compuestos por separado producían daño al ADN a altas concentraciones, se obtenía el mismo efecto cuando se utilizaban concentraciones más bajas de las mezclas. Otros estudios realizados en LSP tratados con un insecticida neonicotinoide (imidacloprid) y un fungicida (metalaxil), que son habitualmente aplicados en conjunto, mostraron un incremento de la frecuencia del ICH y de la frecuencia de Mn cuando los compuestos se aplicaron como una mezcla, lo cual podría indicar un posible efecto sinérgico entre ambos (Demsia y col. 2007). Sin embargo, en otros trabajos no se encontró incrementada la inducción de Mn en el mismo modelo expuestos a dosis ambientales de insecticidas organofosforados (metil azinfos, diazinon, dimetoato, metil pirimifos) y un fungicida carbamato (benomilo) (Bianchi-Santamaria y col. 1997). Otros ensayos en cultivos celulares de mamíferos se han realizado para conocer el efecto tóxico de las mezclas. Ensayos realizados en cultivos de timocitos demostraron que mezclas de tres insecticidas, lindano, malation y permetrina, de distinto modo de acción tienen mayor toxicidad que la suma de los efectos inducidos por los compuestos por separado (Olgun y col. 2004). Existen diversos estudios en líneas celulares de roedores, especialmente en la línea de células CHO (células de ovario de ratón chino), que estudian el efecto genotóxico de distintos plaguicidas (Lin y col. 1987; Wagner y col. 2005; Patel y col. 2007; González y col. 2009; Soloneski y Larramendy 2010), sin embargo, pocos estudios se han realizado en los últimos años para evaluar el efecto de las mezclas. Si bien los resultados obtenidos con este modelo se encuentran más alejados de los efectos producidos por las mezclas de pesticidas en el hombre, es de mucha utilidad para los ensayos de genotoxicidad y por lo tanto sería interesante aumentar las investigaciones que estudien el efecto de las mezclas en estas líneas celulares.

Ensayos *in vivo*

Los estudios de genotoxicidad *in vivo* proveen un marco fisiológico a la acción de distintos

agentes con potencial genotóxico. Éstos, entonces, permiten evaluar de forma controlada una respuesta sistémica al agente en cuestión, así como también discernir efectos provocados según la vía de ingreso del agente al organismo. Estos estudios aportan resultados un paso más cerca de las exposiciones reales humanas.

Dado el surgimiento de la soja resistente a glifosato (RR), en primer lugar, y luego de otros cultivos resistentes, el glifosato ha sido un herbicida en foco de estudios durante mucho tiempo. Se han planteado distintos estudios de genotoxicidad de una de las formulaciones más vendidas a nivel mundial, el Roundup®, en concentraciones de aplicación a campo. Estudios en eritrocitos de médula ósea de ratones macho mostraron que, al ser administrada por vía oral, esta formulación no indujo Mn o AC (Dimitrov y col. 2006). Sin embargo, al exponer renacuajos de rana toro, *Rana catesbeiana*, por vía dérmica, se observó un aumento significativo del daño al ADN, visualizado a través del EC, con una relación dosis respuesta (Clements y col. 1997). Asimismo, en huevos de caimán (*Caiman latirostris*) expuestos en condiciones controladas de laboratorio y en ensayos a campo, se observó una frecuencia de Mn aumentada así como un mayor índice de daño al ADN analizado por EC, lo que se acompañó por malformaciones y alteraciones metabólicas en los caimanes neonatos (Poletta y col. 2011). Por otra parte, estudios llevados a cabo en plantas mostraron que en el meristema de raíz de la planta *Crepis capillaris* no hubo inducción de Mn o AC (Dimitrov y col. 2006), mientras que en el modelo de meristema de raíz de *Allium cepa* se encontró un aumento en las alteraciones de la mitosis (Rank y col. 1993). Estos antecedentes indicarían que tanto el modo de exposición como la sensibilidad del sistema juegan un rol fundamental en la determinación de la genotoxicidad y que, como ya habían resaltado Dimitrov y col. (2006), los ensayos de plantas y animales son diferencialmente sensibles a algunos pesticidas, y estas diferencias pueden deberse al metabolismo de cada tipo celular. Este tipo de variaciones también se encontró en ensayos realizados en *Tradescantia* sp. expuesta al insecticida malation por distintas vías y en distintos estados (líquido/vapor) (Ma y col. 1983).

Por otra parte, Rank y col. (1993) también evaluaron la sal isopropilamina de glifosato (principio activo de la formulación Roundup) sin encontrar alteraciones en la mitosis de *Allium cepa*. Estudios sobre el herbicida Arse-

nal 250NA, cuyo principio activo es el imazapir, mostraron que la formulación y el principio activo no modificaron la frecuencia de Mn de médula ósea de ratón, ni provocaron fragmentación del ADN en *Allium cepa*. Sin embargo, sí se observó un aumento de cromosomas rezagados en *Allium cepa*, siendo significativo para la formulación a concentraciones más bajas que la del principio activo, además de una disminución en el índice mitótico sólo para la formulación (Koppe Grisolia y col. 2004). Otro caso es el del herbicida trifluralin y su formulación comercial Treflan para la que se observó una menor frecuencia de Mn inducida por la formulación que la inducida por el principio activo en el pez *Oreochromis niloticus*, (Könen y Çava 2008). El efecto de la atrazina y su formulación comercial Gesaprim se estudió en el pez *Carassius auratus L.* utilizando los tests de Mn y EC en eritrocitos de sangre periférica, encontrándose un aumento en la frecuencia de Mn y un mayor índice de daño al ADN (EC) sólo para Gesaprim (Cavas 2011). Cabe destacar que el análisis de los principios activos de formulaciones comerciales de pesticidas no es representativo de la situación real que se da a campo, ya que las formulaciones contienen aditivos que interaccionan con los principios activos, modificando su toxicidad y genotoxicidad, como ya se ha demostrado (IARC 1991). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la realidad del campo no se reduce a una única formulación y es por ello que se ha intensificado en los últimos años el estudio de la toxicidad de las mezclas. Se evaluó el efecto genotóxico de mezclas de plaguicidas usualmente utilizadas en el campo en huevos de caimán (*Caiman latirostris*). Los resultados mostraron que la mezcla de formulaciones de glifosato (Roundup), endosulfán (Galgofan) y cipermetrina (Atanor) presentaron mayores índices de genotoxicidad (frecuencia de Mn, daño al ADN por EC y malformaciones), acompañados de alteraciones metabólicas, que la aplicación de la formulación Roundup sola (Poletta y col. 2011). Estudios realizados en eritrocitos policromatófilos de médula ósea de ratón, tratados con un insecticida (imidacloprid) y un fungicida (metalaxil), habitualmente aplicados en conjunto, revelaron un aumento de la frecuencia de Mn al administrar los pesticidas por separado y un efecto sinérgico de los pesticidas administrados en conjunto (Demsia y col. 2007). Asimismo, una mezcla compleja de pesticidas (alaclor, metolacloro, atrazina, terbutilazina, diuron, fosetil de alumi-

nio, carbarilos y glifosato), preparada según lo detectado en aguas donde habita *Crassostrea gigas*, el molusco en estudio, mostró un aumento en el daño al ADN por aductos en hemocitos acompañado por un estado de estrés oxidativo marcado (Geret y col. 2011). La genotoxicidad de la combinación de los insecticidas deltametrina y tiacloprid fue estudiada en médula ósea de ratón a través del test de Mn, determinación del índice mitótico y AC. Los resultados arrojaron un aumento en la frecuencia de Mn así como en las AC, mayor que las formulaciones por separado, indicando una interacción aditiva/sinérgica (Şekeroğlu y col. 2011).

CONCLUSIONES

Todos estos resultados, en los distintos niveles de estudio, apoyan la importancia de realizar ensayos que evalúen el efecto genotóxico de las mezclas de pesticidas, ya que, por lo general, tienen efectos distintos a los de los compuestos por separado. La caracterización de las mezclas de pesticidas en las exposiciones ambientales resulta de vital importancia para lograr una reproducción en ensayos controlados, que reflejen la realidad lo mejor posible. Teniendo en cuenta la controversia encontrada en los estudios relacionados al efecto genotóxico de las mezclas, es evidente la necesidad de seguir investigando en esta área.

Si bien los análisis de mutagenicidad en organismos unicelulares (por ej. test de Ames) no son escalables para definir el potencial genotóxico de ciertos agentes en organismos de mayor complejidad, pueden ser aplicados para evaluar el perfil mutagénico de muestras complejas como un monitoreo inicial. Además, aportan información de los componentes individuales para clasificar mutágenos químicos. Estudios *in vitro* que analicen el efecto de distintos pesticidas en LSP en las concentraciones a las que el hombre está expuesto serían enriquecedores a la hora de analizar los efectos encontrados en los programas de biomonitorio en poblaciones que se encuentran expuestas de forma crónica.

Si bien los sistemas utilizados en estudios *in vivo* contemplan una respuesta sistémica, que involucra la toxicocinética del agente, los resultados obtenidos en otros organismos no son suficientes para determinar el efecto sobre el ser humano. Por lo tanto, es evidente la necesidad de armar baterías de ensayos que consideren varios niveles de distinta complejidad en distintos modelos y así poder tener una aproxi-

mación más certera de la capacidad genotóxica del agente sobre la población humana.

En Argentina la legislación prohíbe las aplicaciones a distancias menores a los 500 a 1500 metros de donde habitan comunidades, no obstante, no se contemplan las viviendas aisladas que persisten en las áreas rurales y que pueden ser alcanzadas por los plaguicidas (Ley Nacional de Plaguicidas N° 20.418; Sistema Nacional de Fiscalización de Agroquímicos y Biológicos, Resolución del SENASA 500/2003, bajo el marco de la Ley de Política Ambiental Nacional N° 25.675; Ley N° 10.699 de la Provincia de Buenos Aires; Ley N° 3378 de la Provincia de Chaco; Ley N° 5665 de la Provincia de Mendoza; Ley N° 6291 de la Provincia de Tucumán). De la misma manera, el transporte de los plaguicidas por aire, agua y suelo contribuye a la dispersión más allá de donde son aplicados. Asimismo, la legislación relativa al registro, comercialización, aplicación de plaguicidas es incompleta, permisiva y obsoleta. No existe participación del Ministerio de Salud en la aprobación del registro de los plaguicidas de uso agrícola. El problema sanitario derivado del uso de plaguicidas como consecuencia de un sub registro de las intoxicaciones no es atendido de forma suficiente en el sistema de salud nacional. También plaguicidas prohibidos o restringidos en los países de origen, son permitidos en la Argentina. Es el caso del fipronil e imidacloprid que fueron retirados del mercado en Alemania por su probado efecto contra la supervivencia de las abejas (Souza Casadinho 2007).

Estos defectos en la legislación y en el control, se suman a la deficiencia de medidas que contemplen los efectos de las mezclas de pesticidas. Es por ello que consideramos que es necesario incrementar la evidencia científica respecto a la toxicidad y genotoxicidad de las mezclas aplicadas en nuestro país. Esto permitirá ampliar la legislación, adecuándola a la problemática real y modificar los niveles permitidos de pesticidas y mezclas en el ambiente. Por otra parte, la realización de biomonitoreos que evidencien el grado de impacto por malas prácticas de los trabajadores, sirven de herramienta para ejercer el control, un aspecto fundamental del cumplimiento de la legislación.

Agradecemos: a la Dras Marta Mudry, Nancy Andreoli y Eliana Steinberg por incentivarlos a realizar esta revisión bibliográfica. También queremos reconocer el aporte de información de parte de la Dra. Gisela Poletta.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Aburi K., Takanashi H., Kishida M., Nakajima T., Ohki A. Mutagen formation potential (MFP) of Kotsuki River water and contribution of pesticides to MFP. *J Water Environ Technol.* 2011;9(4):349-357.

Alavanja M., Hoppin J., Kamel F. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu Rev Public Health.* 2004;25:155-197.

Arias, S. Transformaciones en la estructura agraria de la región pampeana causadas por el proceso de agriculturización de la década del 90. Tesis de grado. Facultad de Agronomía, UBA. 2005.

Ascarrunz M.E., Tirado N., González A.R., Cuti M., Cervantes R., Huici O., Jors E. Evaluación de riesgo genotóxico: biomonitorización de trabajadores agrícolas de Caranavi, Guanay, Palca y Mecapaca, expuestos a plaguicidas. *Cuadernos del Hospital de Clínicas.* 2005;50(2):27-37.

Bianchi-Santamaria A., Gobbi M., Cembran M., Arnaboldi A. Human lymphocyte micronucleus genotoxicity test with mixtures of phytochemicals in environmental concentrations. *Mutat Res.* 1997;388:27-32.

Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 2003;543:251-272.

Bull S., Fletcher K., Boobis A.R., Battershill J.M. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis.* 2006;21(2):93-103.

Cavas T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(6):1431-1435.

Clements C., Ralph S., Petras M. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet) assay. *Environ Mol Mutagen.* 1997;29:277-288.

Das P., Shaik A., Jamil K. Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on

human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol Ind Health.* 2007;23(8):449-458.

Demsia G., Vlastos D., Goumenou M., Matthopoulos D. P. Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. *Mutat Res.* 2007;634:32-39.

Dimitrov B.D., Gadeva P.G., Benova D.K., Bineva M.V. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. *Mutagenesis.* 2006;21(6):375-382.

Food and Agriculture Organization (FAO), Naciones Unidas y World Health Organization (WHO). *Codex Alimentarius Commission: Procedural Manual*, Roma, Italia. 1997.

Gallois J., Pottier D., Houssin M., Le Goff J., André V. DNA adduct variations in non-smoking crop farmers: Potential relationship with occupational exposure to pesticides? *Environ Toxicol Pharm.* 2011;32:1-9.

Garaj-Vrhovac V., Zeljezic D. Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology.* 2001;165:153-162.

Geret F., Burgeot T., Haure J., Gagnaire B., Renault T., Communal P.Y., Samain J.F. Effects of low-dose exposure to pesticide mixture on physiological responses of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environ Toxicol.* 2011;doi:10.1002/tox.20764.

González N., Soloneski S., Larramendy M. Dicamba-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary (CHO) cells is prevented by vitamin E. *J Hazard Mater.* 2009;163(1):337-343.

Gonzalez N.V., Molinari G., Solonesky S., Larramendy M.L. Genotoxicidad y citotoxicidad de pesticidas. Evaluación de los principios activos y formulaciones comerciales usadas en Argentina. *Theoria.* 2008;17(2):27-45.

Hayes W.J. *Toxicology of pesticides*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1975.

Hoffman D., Rattner B., Burton G., Cairns J. *Handbook of Ecotoxicology*. Second ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 2003.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some carbamates, thiocarbamates and carbazides. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, Lyon, 1976:282.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Some halogenated hydrocarbons and pesticide exposures. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, Lyon, 1986:434.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Lyon, 1987;1 a 42:440.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Occupational exposures in insecticide application and some pesticides. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, Lyon, 1991:612.

Isidori M., Caterino E., Criscuolo E., Fatigati V., Liguori G., Parrella A. Antimutagenic and antigenotoxic effects of vegetable matrices on the activity of pesticides. *Food Addit Contam.* 2009;26(7):1049-1062.

Könen S., Çavaş T. Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test. *Environ Mol Mutagen.* 2008;49:434-438.

Koppe Grisolia C., Rolim Bilich M., Menezes Formigli L. A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate. *Ecotox Environ Safe.* 2004;59:123-126.

Krogh K., Halling-Sorensen B., Mogensen B., Vejrup K. Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere.* 2003;50:871-901.

Ley 20.418. Reglamentación y definiciones de tolerancias y límites administrativos de residuos de plaguicidas en productos y subproductos animales y vegetales. *Ley Nacional 20.418*. Sanc. 18/05/1973; promul. 18/05/1973; publ. 22/06/1973.

Ley 10.699. Regula la utilización de productos químicos en la producción para la protección de salud humana. Ley Provincial 10.699 de la Provincia de Buenos Aires. Sanc. 21/10/1988; promul. 21/10/1988; publ. 17/11/1988.

Ley N° 3.378. Determina normas sobre el expendio, aplicación, transporte, almacenamiento, fraccionamiento, distribución y toda operación que implique manejo de biocidas, tanto en el ámbito urbano como en el rural. Ley Provincial 3.378 de la Provincia de Chaco. Sanc. 22/06/1988; promul. 05/07/1988; publ. 15/07/1988.

Ley 5.665. Régimen para la fabricación y comercialización de productos agroquímicos. Ley Provincial 5.665 de la Provincia de Mendoza. Sanc. 21/03/1991; promul. 21/03/1991; publ. 03/05/1991.

Ley 6.291. Normas Reglamentarias para el uso de agroquímicos. Ley Provincial 6.291 de la Provincia de Tucumán. Sanc. 21/10/1991; promul. 21/10/1988; publ. 05/12/1988.

Ley 25.675. Ley general de Política Ambiental. Ley Nacional 25.675. Sanc. 06/11/2002; promul. 27/11/2002; publ. 28/11/2002.

Liman R., Akyil D., Eren Y., Konuk M. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium* test. *Chemosphere*. 2010;80(9):1056-1061.

Lin M., Wu C., Wang T. Pesticide clastogenicity in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res*. 1987;188(3):241-250.

Ma T.-H., Anderson V. A., Harris M. M., Bare J. L. *Tradescantia*-micronucleus (trad-MCN) test on the genotoxicity of malathion. *Environ Mutagen*. 1983;5:127-137.

Merletti M., Solkolne, C. L., Vineis P. Enciclopedia de salud y seguridad del trabajo. Volumen I. Capítulo 28: Epidemiología y estadística. Herramientas y enfoques. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales Subdirección General de Publicaciones. Madrid, España, 1998.

Mudry M., Carballo M. Genética Toxicológica. Buenos Aires, Argentina: Ed. De Los 4 Vientos, 2006.

Olgun S. Gogal R. M.Jr., Adeshina F., Choudhury H., Misra H P. Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. *Toxicology*. 2004;196:181-195.

Patel S. Bajpayee M., Kumar Pandey A., Parmar D., Dhawan A. *In vitro* induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. *Toxicol in Vitro*. 2007;21(8):1409-1418.

Peralta L. Mañas F., Gentile N., Bosch B., Méndez A., Aiassa D. Evaluación del daño genético en pobladores de Marcos Juárez expuestos a plaguicidas: estudio de un caso en Córdoba, Argentina. *Diálogos*. 2011;2(1):7-26.

Poletta G. L., Kleinsorge E., Paonessa A., Mudry M.D., Larriera A., Siroski P. A. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris*. *Ecotox Environ Safe*. 2011;74:852-859.

Poma M.L., Tirado Bustillos N., Ascarrunz M.E. Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay. *Biofarbo*. 2010;18(2):31-43.

Rank J., Jensen A.-G., Skov B., Pedersen L.H., Jensen K. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. *Mutat Res*. 1993;300(1):29-36.

Reffstrup T.K., Larsen J.C., Meyer O. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regul Toxicol Pharm*. 2010;56:174-192.

Remor A.P., Totti C.C., Moreira D.A., Pimentel Dutra G., Dahlström Heuser V., Boeira J.M. Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ Int*. 2009;35:273-278.

Resolución 500/2003 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Creación del Sistema Nacional de Fiscalización de Agroquímicos y Biológicos: Objetivos

y Organización. Sanc. 22/08/2003.

Şekeroğlu V., Şekeroğlu Z.A., Kefelioğlu H. Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or thiacloprid on Wistar rat bone marrow cells. *Environ Toxicol.* 2011;doi: 10.1002/tox.20746.

Simoniello M.F., Kleinsorge E.C., Carballo M.A. Evaluación bioquímica de trabajadores rurales expuestos a pesticidas. *Medicina (Buenos Aires)*. 2010;70:489-498.

Simoniello M.F., Kleinsorge E.C., Scagnetti J.A., Grigolato R.A., Poletta G.L., Carballo M.A. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. *J Appl Toxicol.* 2008;28:957-965.

Sistema de Indicadores de desarrollo sostenible (SIDSA). Informe de SIDSA de la Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, 5ta ed. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Ministerio de Producción. 2010.

Soloneski S., Larramendy M.L. Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in chinese hamster ovary (CHO-K1) cells treated with the insecticide pirimicarb. *J Hazard Mater.* 2010;174(1-3):410-415.

Souza Casadinho J. La problemática del uso de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente: Estudio colaborativo multicéntrico. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina. 2007.

Suter G. *Ecological Risk Assessment*. Second ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 2007.

Wagner E.D., McMillan S.M., Plewa M.J. Cytotoxicity of organophosphorus ester (OP) insecticides and cytotoxic synergism of 2-acetoxyacetylaminofluorene (2AAAF) in chinese hamster ovary (CHO) cells. *B Environ Contam Toxicol.* 2005;75(2):329-334.

World Health Organization (WHO). *Health Topics: Pesticides*. 2012. [En línea] [actualizado al 2012; consulta 7 de Mayo de 2012]. Disponible en: <http://www.who.int/topics/pesticides/en/>

Yadav J., Kaushik V. Studies on the genotoxicity of an organophosphorous pesticide Baytex-1000. *Int J Health Geogr.* 2002;2(1):19-25.

Zhao Z., Zhanga L., Wua J., Fana C., Shanga J. Assessment of the potential mutagenicity of organochlorine pesticides (OCPs) in contaminated sediments from Taihu Lake, China. *Mutat Res.* 2010;696(1):62-68.

Afectación de las funciones cognitivas y motoras en niños residentes de zonas rurales de Jujuy y su relación con plaguicidas inhibidores de la colinesterasa.

Un estudio piloto

Impairment of cognitive and motor functions in children from rural areas of Jujuy, and its relationship with cholinesterase inhibitor pesticides. A pilot study

Martos Mula, Ana J.; Saavedra, Olga N.; Wierna, Norma R.; Ruggeri, María A.; Tschambler, Javier A.; Ávila Carreras, Natalia M.; Bonillo, Mario C.; Bovi Mitre, María G.*

Grupo INQA. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Jujuy. Alberdi 47. 4600. San Salvador de Jujuy. Jujuy. Argentina. Te/Fax 0388 4221579/4233014

*gbovi@imagine.com.ar

Recibido: 21 de marzo de 2012

Aceptado: 14 de noviembre de 2012

Resumen. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la exposición a plaguicidas en las funciones cognitivas y motoras de 42 niños de una zona rural con mayor probabilidad de exposición a plaguicidas organofosforados y carbámicos (Yuto, Jujuy). Los resultados de las pruebas realizadas para estudiar el efecto fueron comparados con los resultados obtenidos con 29 niños con menor exposición a plaguicidas (León, Jujuy).

A todos los participantes se les realizó historia clínica, evaluación médica, revisión de antecedentes, pruebas neuroconductuales, de motricidad gruesa y equilibrio, y medición de biomarcadores (colinesterasa plasmática y eritrocitaria). Se realizó una historia clínica neurológica estándar con las siguientes pruebas: Subtest de Dígitos y Símbolos, Subtest de Recuerdo de Dígitos, Subtest de Laberinto del WISC-III de Wechsler. En la prueba de Laberintos realizada en el presente estudio se observan diferencias entre las localidades y se comprobó una relación lineal inversa entre los años de residencia y la puntuación de la prueba. Se observó reducción en las actividades de acetilcolinesterasas en los niños pertenecientes a Yuto. No se observó una correlación significativa entre los niveles de actividad de las enzimas y el rendimiento en la prueba, para ninguna de las dos localidades.

Los resultados señalaron la probabilidad de que la exposición crónica a bajas dosis de plaguicidas pudiera estar dañando algunas funciones cognitivas y que esto dependería de la duración de la exposición. Por falta de correlación entre las actividades de las enzimas y los resultados adversos en las pruebas neuroconductuales de motricidad y de equilibrio, no fue evidente una asociación entre ambos.

Palabras clave: Niños; Organofosforados y carbamatos; Neurotoxicidad; Colinesterasas plasmática y eritrocitaria.

Abstract. Abstract. The aim of this research was to study the effects of these toxics on the cognitive and motor functions of a group of 42 children of a rural town with high percentage of exposure to organophosphate and carbamic pesticide (Yuto) and compare the results with a group of 29 children with low percentage of exposure to pesticides.

In both cases a research of the patients history was done, a medical revision and a full checkup including neurobehavioral tests, motor and balance tests and biomarkers levels (plasma pseudocholinesterase and erythrocyte cholinesterase). The behavioral assessment was performed by a standard neurological clinic history, a digital and symbol subtest, a digital memory, a maze test, intelligence test WISC-III of Wechsler and gross motor and balance tests.

In the group from Yuto, Pearson correlations were done between the years of residency and the neurobehavioral tests and the linear correlation between the years of residency and the acetylcholinesterase activities.

In the maze test results there were differences between the two towns and it was proved an inverse lineal relation between the years of residency and the tests scores. It was also observed a reduction in the acetylcholinesterase activities both erythrocyte and plasma in the children from Yuto. Nevertheless there were not significant correlations between the levels of enzyme activities and the performance in the tests for neither of the towns.

The results achieved did not point out that chronic exposure to low-dose pesticides can produce cognitive malfunctions, such as psychomotor problems. The lack of correlations between the activities of the acetylcholinesterase enzyme and the negative results of the neurobehavioral motor and balance tests couldn't be associated.

Keywords: Children; Organophosphates and carbamates; Neurotoxicity; Plasmatic and erythrocyte cholinesterases.

INTRODUCCION

Muchos estudios han corroborados que la exposición a plaguicidas puede producir daños en el sistema nervioso (Baldi y col. 2001; 2003; Farahat y col. 2003; Kamel y col. 2003; Salvi y col. 2003; Miranda y col. 2004; Kamel y col. 2004; Barret 2007; Eskenazi y col. 2007). Estas sustancias pueden producir problemas neuroconductuales claros, o bien síntomas subclínicos que tienen su base en problemas a nivel cerebral (Grandjean y col. 2006).

La mayoría de los estudios hechos sobre la toxicidad de los plaguicidas se refiere a la exposición aguda a dichos tóxicos, habiendo poca tendencia a investigar los efectos que pueda tener la exposición crónica a sustancias ambientales e industriales que puedan dañar el sistema nervioso (Jamal y col. 2002; Kamel y col. 2004; Ruckart y col. 2004; Mangone y col. 2006; Eskenazi y col. 2007).

No obstante, desde el año 1995 varios autores (Stephens y col. 1995; Baldi y col. 2001; Jamal y col. 2002; Baldi y col. 2003; Farahat y col. 2003; Kamel y col. 2003; Salvi y col. 2003; Kamel y col. 2004) han acreditado los efectos adversos que tiene sobre la salud, la exposición crónica a plaguicidas, especialmente en lo que se refiere a la exposición laboral.

Sin embargo, es necesario profundizar el estudio del efecto de estos tóxicos sobre el sistema nervioso y sobre las funciones cognitivas y psicológicas de los niños. Este grupo poblacional está entre los más susceptibles a los efectos adversos sobre el sistema nervioso, porque los niños están en una etapa en la cual su sistema nervioso se encuentra en proceso de crecimiento y desarrollo, siendo más vulnerable. Como señalan varios autores (Kamel y col. 2003; Kamel y col. 2004; Eskenazi y col. 2007), los niños de familias que trabajan en el campo, pueden estar también expuestos en alguna medida a estos tóxicos, quizás no a exposiciones agudas a grandes dosis, pero sí a una exposición prolongada a bajas dosis. Es por ello que, si bien no son tantos los trabajos realizados con este grupo etario, existen algunas experiencias al respecto (Ruckart y col. 2004; Martos Mula y col. 2005; Eskenazi y col. 2007). Desde hace más de 20 años (Bovi de De Pascuale y col. 1995) se registran en la Provincia de Jujuy (Noroeste argentino) datos sobre la prevalencia en el uso de plaguicidas en las prácticas agrícolas. A partir del año 2005, se registra que la zona de la Quebrada de Humahuaca (desde Volcán hasta Huacalera) hace

uso intensivo de plaguicidas, observándose que aproximadamente el 77% de los pequeños productores agrícolas incorporan a sus cultivos agroquímicos tales como herbicidas, fungicidas y fertilizantes. Alrededor de un 57% de los químicos aplicados corresponden a insecticidas organofosforados (Altamirano y col. 2005). En la zona de Yuto y alrededores (Ramal jujeño), un 70% aproximadamente de los agricultores que utilizan agroquímicos reconocen utilizar insecticidas organofosforados y carbámicos sistemática y simultáneamente. El objetivo de esta investigación fue determinar los efectos que, sobre las funciones cognitivas y motoras de los niños, tienen la exposición a bajas dosis de plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa en una zona rural (Yuto) de la Provincia de Jujuy (Argentina), en comparación con una población menos expuesta (León) de similares características étnicas y socioeconómicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de la muestra

El estudio se llevó a cabo en dos localidades de la provincia de Jujuy (Argentina): Yuto y León. La localidad de Yuto fue seleccionada por ser una localidad eminentemente agrícola y con alto riesgo de exposición a plaguicidas organofosforados y carbámicos. Por otra parte, residentes de la localidad de León fueron seleccionados para el análisis comparativo, ya que el nivel socioeconómico de dichos habitantes es muy similar al de la localidad de Yuto (familias con bajos ingresos, en su mayoría numerosas, con viviendas mayormente precarias y sin la mayoría de los servicios básicos) y que, por dedicarse a la ganadería, es una población con menor riesgo de exposición a plaguicidas. Se seleccionaron dos poblaciones comparables salvo en su probable exposición a plaguicidas.

En la localidad de Yuto se trabajó con los niños de la única escuela primaria que se encontraba inmersa en los centros de cultivo, concretamente la Escuela "El Bananal". En esta escuela se seleccionaron niños de entre 7 y 10 años, de ambos géneros, cuyos padres o tutores dieran la autorización para incluirlos en el estudio. En el caso de León se seleccionó la única escuela primaria del lugar. Dentro de la misma se seleccionó a un grupo de chicos que se asimilaran en género, edad y características socioeconómicas, a la muestra

obtenida en la escuela El Bananal en Yuto. Se cumplió en todos los términos la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación en seres humanos. También se siguió la Resolución 1490/2007 del Ministerio de Salud: "Guía de las Buenas Prácticas de Investigación Clínica en Seres Humanos".

El protocolo de trabajo contó con la aprobación del Comité de Bioética y los padres de los niños incluidos en la investigación autorizaron su participación mediante el consentimiento informado.

La cantidad de niños incluidos en la investigación fue de 42 (cuarenta y dos) para Yuto y 29 (veintinueve) para León.

Criterios de inclusión y pruebas neuroconductuales empleadas

A los niños de cada una de las localidades se le realizó una Historia Clínica, en la que se recolectó información sobre los datos personales de los niños (lugar de nacimiento, lugar de residencia, años que habitan en la zona, entre otros), así como también se realizó un evaluación médica completa, con medición de talla y peso, visión y audición y asignación de percentiles e índice de masa corporal. Se realizó también una revisión de antecedentes, con el fin de desestimar aquellos niños que presentaran algún problema (niños con problemas perinatales, desnutrición en función de los canales nacionales establecidos según peso, talla y edad, traumatismos craneales, problemas de visión o audición entre otras patologías) que pudieran interferir en la buena comprensión de los resultados. Se incluyeron los niños que no presentaron los problemas antes mencionados.

Las pruebas neuroconductuales que le fueron realizadas a cada uno de los niños que permaneció en la muestra fueron: Subtest de Dígitos y Símbolos para analizar memoria asociativa, Subtest de Recuerdo de Dígitos para analizar memoria inmediata, Subtest de Laberinto para analizar motricidad fina y visomotricidad. Todos pertenecientes al test de inteligencia WISC-III de Wechsler. También se realizaron pruebas de motricidad gruesa y equilibrio. La realización de dichas pruebas fue llevada a cabo por un equipo de evaluadores previamente entrenados por un Psicólogo. Cada uno de los evaluadores (bajo la dirección de una Doctora en Psicología) se encargó del pase de una única prueba.

Biomarcadores

Los biomarcadores que se usaron para detectar el grado de exposición a los plaguicidas organofosforados y carbámicos fueron las actividades de la pseudocolinesterasa plasmática y de la colinesterasa eritrocitaria. Según algunos autores la actividad de la enzima eritrocitaria es más específica para evaluar la exposición a estos plaguicidas, fundamentalmente cuando se desea evaluar exposición crónica a inhibidores de acetilcolinesterasas (Nevermann y col. 2004).

La medición de la actividad de la colinesterasa se realizó mediante el test de Ellman y colaboradores (1961). La enzima acetilcolinesterasa presente en el plasma o en el glóbulo rojo degrada la acetiltiocolina, la tiocolina resultante forma un complejo con el ditio-bisnitrobenzoico (DTNB) que es proporcional a la cantidad de sustrato desdoblado, y por lo tanto, proporcional a la actividad enzimática. La formación del complejo se lee espectrofotométricamente a 405 nm. En esta investigación no se tomaron los valores de referencia del método sino que se realizó la comparación entre las dos poblaciones evaluadas. En esta investigación no se contó con la historia pre y post-exposición de los niños ya que no había datos de una situación de exposición puntual que permitiera inferir un antes y un después. El objetivo fue tener una aproximación del efecto adverso que una probable exposición crónica a plaguicida tendría en las funciones cognitivas de los niños. Estos datos preliminares permitirán diseñar posteriores estudios poblacionales.

Análisis de la información

Se utilizaron los test χ^2 (chi cuadrado) o pruebas t para comparar las características descriptivas de los grupos.

Se realizó una prueba t de Student para muestras independientes, en la que se comparó si las actividades de colinesterasa plasmáticas y eritrocitaria diferían entre localidades, con el fin de corroborar diferentes grados de exposición a plaguicida.

Después se realizaron diversas pruebas t de Student para muestras independientes, en las que se comprobaron la existencia o no de diferencias entre los aspectos cognitivos y motores de las distintas localidades. Para la prueba de Motricidad Gruesa se realizó también un ANOVA Factorial Mixto, en el que se comparó tanto la ejecución del mismo individuo en di-

ferentes momentos, como el hecho de estar más o menos expuesto a plaguicidas.

Se llevaron a cabo correlaciones de Pearson para analizar la posible relación entre las actividades de las enzimas eritrocitarias y plasmáticas y los resultados obtenidos en cada una de las pruebas.

Para la localidad más expuesta (Yuto) se realizaron correlaciones lineales de Pearson entre los años de residencia en la zona (vinculando este valor con los años de exposición) y la ejecución de las diferentes pruebas neuroconductuales, así como la correlación lineal entre los años de residencia en esta localidad y las actividades de enzima acetilcolinesterasa eritrocitaria y plasmática.

RESULTADOS

No se observaron diferencias en la edad promedio [$t_{(69; 0,05)} = 1,159$; $p = 0,251$] entre los individuos de las localidades de Yuto ($8,49 \pm 1,3$) y León ($8,82 \pm 0,95$). Tampoco se observaron diferencias entre el porcentaje de mujeres de ambas localidades ($\chi^2 = 1,324$, $p = 0,250$), ni en el porcentaje de varones ($\chi^2 = 1,126$, $p = 0,289$) (Tabla 1).

Tabla 1. Composición porcentual en base a género y edad de los grupos de niños seleccionados para el estudio en las localidades de Yuto y León.

RESIDENTES EN YUTO N = 42	RESIDENTES EN YUTO N = 29
GÉNERO	
Mujeres: 50%	Mujeres: 52%
Varones: 50%	Varones: 48%
EDAD	
7 a 8 años: 50%	7 a 8 años: 41%
Varones: 29%	Mujeres: 21%
Varones: 21%	Mujeres: 21%
9 a 10 años: 50%	9 a 10 años: 59%
Varones: 21%	Varones: 28%
Mujeres: 29%	Mujeres: 31%

Las actividades de colinesterasa plasmática para la población de León tuvieron un valor promedio de 5.181 ± 1.047 U/L. El valor promedio para la población de Yuto fue $4.213 \pm$

1.031 U/L. Comparativamente el valor promedio de la actividad de la enzima plasmática en Yuto fue menor al valor promedio determinado en León.

Con respecto a la actividad de la colinesterasa eritrocitaria, el 11% de los niños de León y el 23% de los niños de Yuto presentaron valores por debajo de los valores de referencia. En ningún caso la inhibición de la actividad de la enzima superó el 30%.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de ambas colinesterasas entre la población menos expuesta (León) y la de estudio (Yuto). Así, con respecto a la actividad de la colinesterasa eritrocitaria, se observó una diferencia significativa entre la localidad más expuesta, en comparación con la menos expuesta [$t_{(69; 0,05)} = -5,183$; $p = 0,000$], siendo menor la actividad de colinesterasa eritrocitaria en la población de Yuto, la más expuesta a plaguicidas. También se observaron diferencias entre las localidades, en lo referente a la actividad de colinesterasa plasmática [$t_{(69; 0,05)} = -3,651$; $p = 0,001$], volviendo a ser inferior el nivel en la localidad más expuesta (Figura 1).

En lo referente a los resultados obtenidos en la prueba de Dígitos y Símbolos, se pudo comprobar que no existieron diferencias entre las localidades en el número de aciertos realizados en la prueba [$t_{(65; 0,05)} = -0,820$; $p = 0,415$], como tampoco entre el número de errores cometido en dicha prueba [$t_{(65; 0,05)} = -1,650$; $p = 0,104$]. Las correlaciones obtenidas entre los años de residencia en Yuto y estas medidas tampoco resultaron significativas (Aciertos: $r = -0,274$, $p = 0,123$; Errores: $r = -0,061$, $p = 0,734$).

Los datos obtenidos en la prueba de Recuerdo de Dígitos no mostraron diferencias entre las localidades, en lo referente al recuerdo en orden directo [$t_{(64; 0,05)} = 0,385$; $p = 0,701$], inverso [$t_{(64; 0,05)} = -0,221$; $p = 0,826$], o a su ejecución en total en la prueba [$t_{(64; 0,05)} = 0,127$; $p = 0,900$]. Tampoco se encontraron correlaciones lineales significativas entre el número de años de residencia en Yuto y estas tres puntuaciones (Orden Directo: $r = -0,241$, $p = 0,191$; Orden Inverso: $r = -0,248$, $p = 0,179$; Total: $r = -0,298$, $p = 0,104$).

Cuando se analizaron los resultados obtenidos en la prueba de Laberintos, se observaron diferencias significativas entre la localidad más expuesta a plaguicidas y la menos expuesta, siendo el rendimiento mucho peor en-

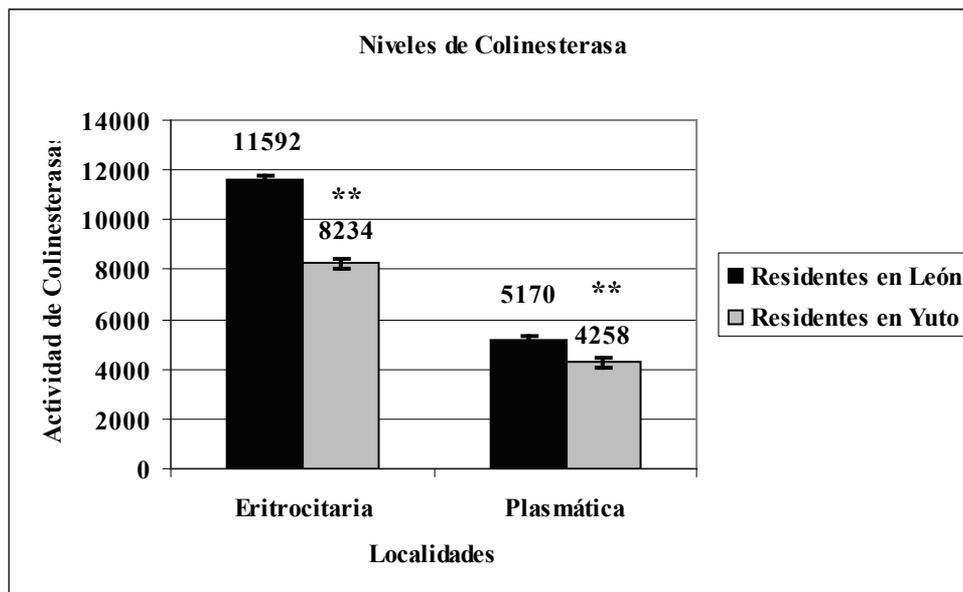


Figura 1. Actividad promedio de colinesterasas eritrocitaria y plasmática en las poblaciones residentes en Yuto y en León. Las barras de error muestran el error estándar de la media.

** p < 0,01, residentes Yuto vs residentes León.

tre aquellos niños que habitaban en la localidad más expuesta [$t_{(67; 0,05)} = -7,521$; $p = 0,000$] (Figura 2). También se pudo comprobar una relación lineal inversa entre los años de resi-

dencia en Yuto y la puntuación en esta prueba ($r = -0,541$, $p = 0,001$). Es decir, que a mayor cantidad de años de residencia en Yuto, la ejecución en esta prueba fue peor (Figura 3).

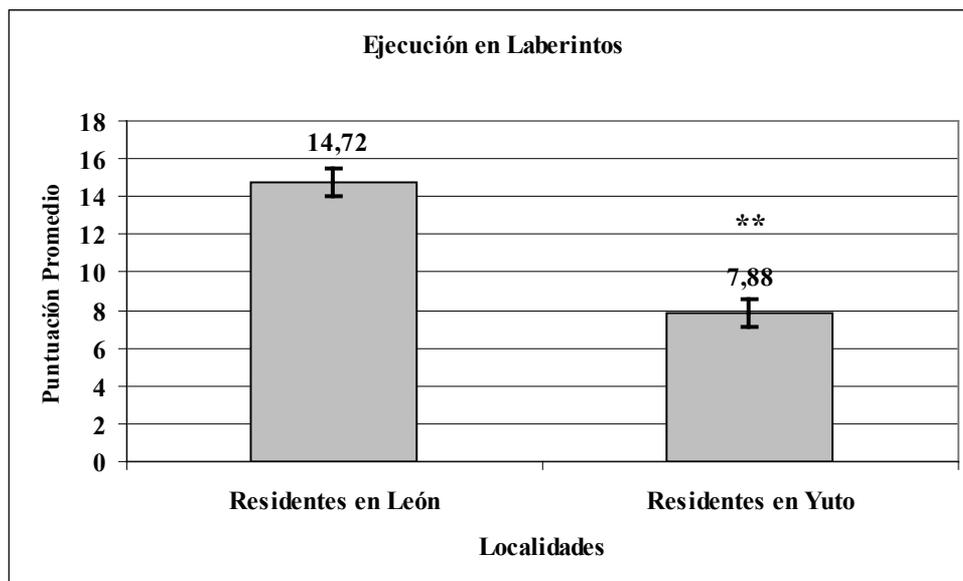


Figura 2. Puntuación promedio obtenida en el subtest de laberintos en la población residente en Yuto y la residente en León. Las barras de error muestran el error estándar de la media.

** p < 0,01, población residente en Yuto vs la residente en León.

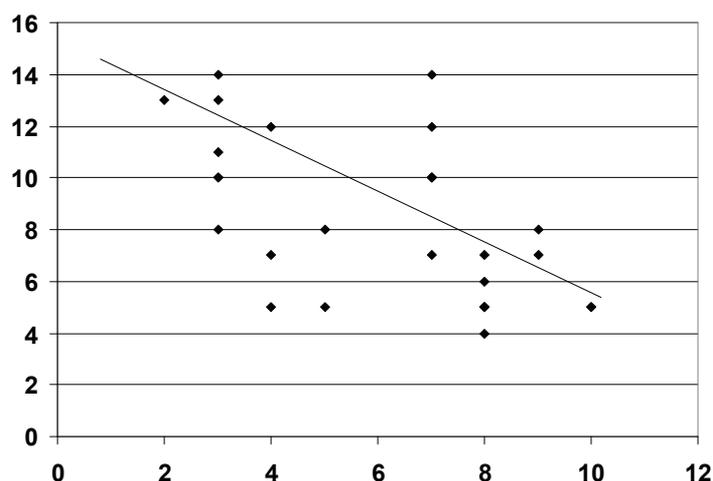


Figura 3. Correlación de los años de residencia en Yuto y la puntuación en el subtest de laberintos.

Los resultados obtenidos con la prueba seleccionada para estudiar equilibrio mostraron que la mayor o menor exposición a plaguicida no pareció afectar el tiempo que los individuos permanecían en equilibrio cuando estaban con los ojos abiertos [$t_{(69; 0,05)} = -0,985$; $p = 0,328$], o cuando estaban con los ojos cerrados [$t_{(69; 0,05)} = 0,514$; $p = 0,609$]. Tampoco se observó ningún tipo de relación entre el tiempo que los individuos llevaban residiendo en Yuto y el tiempo que permanecían en equilibrio con los ojos abiertos ($r = -0,006$, $p = 0,973$) o con los ojos cerrados ($r = 0,155$, $p = 0,407$).

En lo que respecta a la motricidad gruesa, se observó que el hecho de vivir en una localidad más o menos expuesta a plaguicidas no pareció afectar al número de errores que los niños tuvieron en esta prueba [$t_{(67; 0,05)} = -0,086$; $p = 0,932$]. No obstante, como la prueba consistió en recibir correctamente una pequeña pelota desde diferentes distancias, se consideró conveniente realizar también un ANOVA Factorial Mixto. Con este análisis se volvió a apreciar que el hecho de pertenecer a una localidad u otra no pareció afectar el rendimiento [$F_{(1,67; 0,05)} = 0,007$; $p = 0,932$]. Además, se pudo comprobar que aunque hubo un aumento significativo de errores en la distancia más lejana en comparación con las otras dos distancias [$F_{(2,134; 0,05)} = 5,67$; $p = 0,004$], este efecto fue similar para ambas localidades, ya que no se observó ningún efecto interactivo entre las distancias de lanzamiento y la localidad [$F_{(2,134; 0,05)} = 0,134$; $p = 0,875$]. En esta prueba también se observó que, trabajando con los indi-

viduos de Yuto solamente (localidad expuesta) se obtuvo una correlación lineal inversa entre el tiempo que los niños llevaban viviendo en la zona y el número de errores cometido en esta prueba ($r = -0,375$, $p = 0,037$). Es decir, que a más años de residencia menor fue el número de errores.

No se encontraron correlaciones entre el número de años de residencia en la zona de Yuto y la actividad de la enzima colinesterasa eritrocitaria ($r = 0,281$, $p = 0,114$), ni con la actividad de la colinesterasa plasmática ($r = -0,223$; $p = 0,212$).

Tampoco se pudo encontrar ningún tipo de relación entre las actividades de las enzimas eritrocitarias y plasmáticas y ninguna de las pruebas neuroconductuales realizadas (Tabla 2).

DISCUSIÓN

En los resultados se observó una reducción en las actividades de acetilcolinesterasa, que correspondieron tanto a la colinesterasa plasmática como a la eritrocitaria, en los individuos pertenecientes a la localidad más expuesta a plaguicidas organofosforados y/o carbámicos. Son varios los trabajos que han demostrado la relación entre la reducción de esta enzima y la exposición aguda (Misra y col. 1994; Kamel y col. 2004; Ruckart y col. 2004; Eskenazi y col. 2007) o crónica (Farahat y col. 2003; Kamel y col. 2004; Nevermann y col. 2004) a estos plaguicidas. En lo que se refiere a la posible relación entre los niveles de exposición a plaguicidas y las funciones cognitivas estudiadas, se pudo observar que no pareció haber una relación entre la exposición a plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa y la memoria asociativa (medida mediante el subtest de dígitos y símbolos), así como tampoco con la memoria inmediata (medida mediante el subtest de recuerdo de dígitos). Llamaron la atención estos resultados, ya que en otros estudios se ha podido comprobar que estos procesos cognitivos se veían perjudicados por la exposición a plaguicidas, tanto en adultos trabajadores (Baldi y col. 2001; Farahat y col. 2003; Kamel y col. 2003), como en niños (Ruckart y col. 2004). No obstante, Ruckart y col. (2004) señalan que los efectos de los plaguicidas organofosforados sobre el aprendizaje o la memoria en niños parecían ser transitorios, si los mismos dejaban de estar expuestos. Sin embargo, los resultados no van todos en la misma dirección, ya que otros autores (Stephens y col. 1995; Salvi y col. 2003) han

Tabla 2. Correlaciones de las actividades enzimáticas de la acetilcolinesteras eritrocitaria y plasmática y los resultados en cada una de las pruebas neuroconductuales en las localidades de Yuto y León.

Prueba	Medida	YUTO		LEON	
		Eritrocitaria	Plasmática	Eritrocitaria	Plasmática
Dígitos y Símbolos	Aciertos	r = 0,269	r = - 0,264	r = 0,252	r = - 0,118
		p = 0,167	p = 0,174	p = 0,205	p = 0,370
	Errores	r = - 0,026	r = 0,348	r = 0,019	r = 0,293
		p = 0,896	p = 0,070	p = 0,924	p = 0,138
Recuerdo de Dígitos	Directo	r = 0,132	r = 0,122	r = 0,001	r = 0,032
		p = 0,520	p = 0,562	p = 0,994	p = 0,880
	Inverso	r = 0,067	r = 0,247	r = 0,024	r = 0,058
		p = 0,749	p = 0,235	p = 0,911	p = 0,784
	Total	r = 0,120	r = 0,221	r = 0,001	r = 0,032
		p = 0,568	p = 0,289	p = 0,994	p = 0,880
Laberintos	Puntuación	r = - 0,335	r = - 0,140	r = - 0,283	r = - 0,114
		p = 0,088	p = 0,487	p = 0,152	p = 0,572
Equilibrio	Ojos Abiertos	r = - 0,249	r = - 0,011	r = - 0,198	r = - 0,258
		p = 0,202	p = 0,956	p = 0,321	p = 0,194
	Ojos Cerrados	r = 0,205	r = 0,078	r = 0,039	r = 0,092
		p = 0,297	p = 0,693	p = 0,847	p = 0,647
Motricidad Gruesa	General	r = - 0,237	r = 0,253	r = - 0,010	r = - 0,175
		p = 0,208	p = 0,177	p = 0,931	p = 0,372
	Distancia 1	r = - 0,071	r = 0,358	r = - 0,111	r = - 0,159
		p = 0,708	p = 0,052	p = 0,572	p = 0,419
	Distancia 2	r = - 0,270	r = - 0,054	r = - 0,164	r = - 0,184
		p = 0,150	p = 0,777	p = 0,406	p = 0,348
	Distancia 3	r = - 0,218	r = 0,224	r = 0,183	r = - 0,068
		p = 0,246	p = 0,234	p = 0,352	p = 0,728

encontrado que la exposición crónica de adultos a bajas dosis de plaguicidas podía producir deterioro en funciones tales como la atención o la velocidad de procesamiento de la información, pero no producían problemas de memoria inmediata o a corto plazo en adultos. Jamal y col. (2002) tampoco encontraron que la exposición crónica a bajas dosis de plaguicidas deteriorara la atención o la memoria en trabajadores.

Al analizar los resultados en visomotricidad obtenidos en el subtest de laberintos se pudo apreciar que los individuos de la localidad con mayor exposición a plaguicidas fueron los que peor ejecución presentaron en esta prueba. Esto parece concordar con nuestra hipótesis de partida, según la cual los individuos de la localidad más expuesta a plaguicidas, que presentaron actividades de acetilcolinesterasa eritrocitaria y plasmática más reducidas, presentarían niveles de acetilcolina demasiado elevados, produciendo así un posible de-

terioro en la ejecución en esta prueba. Esto parece indicar que la mayor exposición crónica a plaguicidas, podría estar deteriorando la ejecución visomotriz. Este efecto sobre la visomotricidad ya ha sido observado en otros estudios llevados a cabo en adultos en la exposición subcrónica a plaguicidas organofosforados y/o carbámicos (Farahat y col. 2003; Kamel y col. 2003; Kamel y col. 2004). No obstante, Ruckart y col. (2004), trabajando con niños, no encontraron efecto de la exposición a bajas dosis de plaguicidas organofosforados sobre la visomotricidad. Hay que tener en cuenta que la edad de los niños incluidos en el estudio de Ruckart y col. (2004) era menor, en la mayoría de los casos (seis años o menos), a los niños incluidos en nuestro estudio (de 6 a 10 años). Es posible también que el hecho de que aún no se observara el efecto adverso de estos plaguicidas sobre la motricidad fuera determinado por el hecho de que los niños no llevaran suficiente tiempo expuestos,

ya que como observaron Kamel y col. (2003), incluso en adultos, los efectos nocivos de los plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa sobre la visomotricidad son peores cuanto más tiempo llevan los trabajadores expuestos al plaguicida y estos mismo autores observaron que en realidad este deterioro empieza a hacerse visible después de los 10 años de exposición crónica a bajas dosis del plaguicida, en el trabajo. Es interesante señalar que en nuestro caso y a pesar de trabajar con niños en los que se presume que las dosis a las que pueden estar expuestos son menores que en los trabajadores, estos efectos sobre el deterioro de las funciones visomotoras se empezó a observar ya antes de los diez años, ya que no todos los individuos de nuestra muestra residieron en Yuto desde su nacimiento (por lo que no se puede asegurar que llevaran los diez años de vida expuestos a plaguicidas). La prueba seleccionada para comprobar si la exposición a plaguicidas afectaba la motricidad gruesa pareció reflejar que ésta no se afectaba, ni tampoco afectó el equilibrio de los chicos. Esto se confirmó, ya fuera en la evaluación con los ojos abiertos o cerrados. Según Kemel y Hoppin (2004) no hay estudios confirmatorios del efecto de los plaguicidas sobre las funciones motoras, aunque algunos estudios han demostrado afectar en adultos (Salvi y col. 2003), otros no (Beach y col. 1966; Baldi y col. 2001; Kamel y col. 2003). En el caso de los niños, los resultados tampoco son contundentes ya que algunos autores han señalado que se observa un cierto deterioro en las actividades motrices en los niños tras la exposición crónica a plaguicidas inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (Ruckart y col. 2004; Barret 2007), pero en algunos de estos casos, la información era adquirida en base a informes subjetivos dados por los padres, más que a una evaluación realizada con algún test neuroconductual que acredite un deterioro real. En lo que se refiere al equilibrio, son pocos los estudios que analizan el efecto de los plaguicidas sobre éste y tampoco suelen ser concluyentes (Kamel y col. 2004). Kamel y col. (2003), trabajando con adultos trabajadores, encontraron que los plaguicidas organofosforados sí deterioraban el equilibrio cuando éste se medía con los ojos cerrados, pero no cuando se medía los ojos abiertos. Este deterioro en el equilibrio empeoraba cuanto más tiempo llevaban los trabajadores expuestos a plaguicidas. No obstante, en estos estudios

este deterioro se empieza a observar también después de 10 años de exposición. Es por ello que, al ser nuestra población niños (quizás expuestos a menores dosis) y de edades comprendidas entre los seis y los diez años, es posible que el efecto de deterioro sobre dichas funciones aún no fuera detectable.

En base a lo dicho hasta el momento el único efecto perjudicial que parecería tener la exposición crónica a plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa sobre los niños de nuestra muestra fue un deterioro en la visomotricidad. También pudimos confirmar que este deterioro parecería ser dependiente del tiempo de exposición a plaguicidas, ya que vimos una correlación inversa significativa entre el tiempo de residencia en la localidad expuesta (Yuto) y la puntuación obtenida en el test de laberintos.

Estos descubrimientos también concordarían con los encontrados por Kamel y col. (2003), quienes señalan que es necesario un tiempo de exposición prolongado (diez años) para que los efectos de deterioro producido por los plaguicidas puedan ser observados en adultos. Es quizás por ello que, en nuestros niños, hay algunas pruebas que aún no muestran el efecto nocivo de estos plaguicidas. Sin embargo en la prueba que evalúa visomotricidad, a pesar de trabajar con niños en su mayoría menores a diez años, y por ende con menos de diez años de exposición a los plaguicidas, se observó un claro deterioro en dichas funciones. Esto puede ser determinado por el hecho de que los niños podrían ser más susceptibles al efecto nocivo de estos plaguicidas sobre el sistema nervioso, haciendo que el efecto de deterioro aparezca antes que en los adultos.

Si bien estos resultados estarían acordes con nuestra hipótesis de partida, hay algunas debilidades en los resultados que nos impiden asegurar a ciencia cierta que los mismos se deban a una exposición prolongada a plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa. Si bien se encontró una inhibición de la actividad de esta enzima a nivel eritrocitario y plasmático en la población más expuesta, en comparación con la menos expuesta; centrándonos en la localidad de Yuto (la más expuesta), no se pudo obtener una correlación inversa significativa entre las actividades de acetilcolinesterasa y el tiempo de residencia en la zona, que nos indicaría que a más tiempo de residencia mayor exposición al plaguicida.

Tampoco se observó una correlación entre la actividad de las enzimas y la ejecución en la

prueba de laberinto, quizás por lo dicho con anterioridad sobre la juventud de nuestra muestra en la que, aunque se empieza a observar el efecto adverso de la posible exposición a plaguicida sobre la ejecución visomotriz, aún no es contundente.

También es posible que los niños que no acreditaron vivir más de cinco años en Yuto fueran, en su mayoría, hijos de trabajadores rurales golondrinas que van de un cultivo a otro, de una zona a otra, trabajando siempre en la agricultura. Esto justificaría, tal vez la ausencia de relación entre los años de residencia en Yuto y la disminución de la actividad de acetilcolinesterasa, pero la exposición en otras zonas agrícolas de la región explicaría la inhibición de la enzima.

Algunos autores han señalado que las actividades de enzima acetilcolinesterasa no son, quizás, los biomarcadores más sensibles para medir el grado de exposición crónica a plaguicidas, ya que en muchos estudios se observaron claros efectos sobre la cognición, pero no había una reducción en la actividad de la enzima (Farahat y col. 2003; Salvi y col. 2003; Kamel y col. 2004).

Hay que señalar que nuestro estudio es un estudio piloto y es necesario corroborar los hallazgos obtenidos trabajando con una población más numerosa, así como el controlar otras variables que puedan confundir el resultados tales como variables perinatales y en la niñez (peso al nacer, exposición a plaguicidas antes del nacimiento, presencia de anemia); de exposición a otras fuentes de intoxicación (humo de cigarrillos, plomo, arsénico) o aspectos del contexto que se ha observado que influyen en las funciones cognitivas de los niños (educación de la madre, nivel de estimulación en el hogar). En esta investigación se buscó homogeneizar los grupos al buscarse, en toda la provincia, lo más similar posible, en cuanto a aspectos socio-demográficos y étnicos, a la de Bananal en Yuto.

Los resultados presentados, si bien requieren de un mayor análisis y un mayor control de algunas variables, podrían estar señalando la posibilidad de que la exposición crónica a bajas dosis de plaguicidas inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, ya puedan estar produciendo daños sobre algunas funciones cognitivas, tales como la psicomotricidad, en los niños expuestos. Es posible también que esos daños sean dependientes de la duración de la exposición al tóxico, por lo que la evidencia

encontrada nos compromete a trabajar en la prevención primaria de este tipo de exposiciones ambientales y en la realización de prácticas agrícolas en ambientes de mayor control y seguridad para los trabajadores, sus familias y las comunidades en las que están insertas.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Altamirano J., Franco A., Bovi Mitre M. Prevalencia de Plaguicidas y riesgo en las prácticas agrícolas de Huacalera-Jujuy. Jornadas Internacionales de Salud Pública, 23 al 25 de noviembre de 2005, Córdoba, publicada en la revista de Salud Pública (2005): 37. Resumen

Baldi I., Filleul L., Mohammed Brahim B., Fabrigoule C., Dartigues J.F., Schwall S., Drevet J.P., Salamon R., Brochard, P. Neuropsychologic Effects of Long-term Exposure to Pesticides: Results from French Phutoner Study. *Environ. Health Perspect.* 2001;109(8):839-844.

Baldi I., Labailly P., Mohammed-Brahim B., Lettenneur L., Dartigues J.F., Brochard P. Neurodegenerative Diseases and Exposure to Pesticides in the Elderly. *American Journal of Epidemiology.* 2003;157(5):409-414.

Barret J.R. Pesticides: Toxic Legacy. *Environ. Health Perspect.* 2007;115(4):A190.

Beach J.R., Spurgeon A., Stephens R. Abnormalities on neurological examination among sheep farmers exposed to organophosphate pesticides. *Occup Environ Med.* 1996;53:520-525.

Bovi de De Pascuale G., Ruggeri M.A., Singh J. Uso de plaguicidas en la provincia de Jujuy. Proyección, Publicación especializada del colegio de Ingenieros de Jujuy. 1995; Año 9,19:16-25.

Cocker J., Mason H.J., Garfitt S.J., Jones K. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Toxicol Lett.* 2002;134:97-103.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Feather-Stone R.M.A. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *BiochemPharmacol.* 1961;Jul;7:88-95.

Eskenazi B., Marks A.R., Bradman A., Harley K., Barr D.B., Johnson C., Morgan N., Jewell

N.P. Organophosphate Pesticide Exposure and Neurodevelopment in Young Mexican-American Children. *Environ. Health Perspect.* 2007;115(5):792-798.

Farahat T.M., Abdelrasoul G.M., Amr M.M., Shebl M.M., Farahat F.M., Anger W.K. Neurobehavioural effects among workers occupationally exposed to organophosphorous pesticides. *Occup. Environ. Med.* 2003;60:279-286.

Grandjean P., Landrigan P.J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet.* 2006; Dec 16;368(9553):2167-78.

Jamal G.A., Hansen S., Pikington A., Buchanan D., Gillham R.A., Andel-Azis M., Julu P.O.O., Al-Rawas S.F., Hurley F., Ballantyne J.P. A clinical neurological, neurophysiological and neuropsychological study of sheep farmers and dippers exposed to organophosphate pesticide. *Occup. Environ. Med.* 2002;59:434-441.

Kamel F., Hoppin J.A. Association of Pesticide Exposure with Neurologic Dysfunction and Disease. *Environ. Health Perspect.* 2004;112(9):950-958.

Kamel F., Rowland A.S., Park L.P., Anger W.K., Baird D.D., Gladen B.C., Moreno T., Stallone L., Sandler D.P. Neurobehavioral Performance and Work Experience in Florida Farmworkers. *Environ. Health Perspect.* 2003;111(14):1765-1772.

Mangone C.A., Genovese O., Abel C. Trastornos cognitivo-conductuales debidos a la exposición crónica a sustancias tóxicas ambientales e industriales. *Vertex.* 2006;17(65):16-22.

Martos Mula A.J., Figueroa E.N., Ruggieri M.A., Giunta S.A., Wierna N.R., Bonillo M.,

Bovi M.G. Diferencias en la ejecución cognitiva y actividades colinesterasa en adolescentes con exposición ambiental a plaguicidas en Jujuy (Argentina). *Revista de Toxicología.* 2005; 22 (3):180-184.

Miranda J., McConnell R., Wesseling C., Cuadra R., Delgado E., Torres E., Keifer M., Lundberg I. Muscular Strength and Vibration Thresholds Durins Two Years After Acute Poisoning with Organophosphate Insecticides. *Occup. Environ. Med.* 2004;61:4-9.

Misra U.K., Prasad M., Pandey y C.M. A study of cognitive functions and event related potentials following organophosphate exposure. *Electromyogr. Clin. Neurophysiol.* 1994;34(4):197-203.

Nevermann K.S., Guzman E.Q. Pesticide detection in Costarican vegetables based on the inhibition of serum and erythrocytic human cholinesterases. *Arch. Latinoam. Nutr.* 2004;54(4):444-448.

Ruckart R.Z., Kakolewski K., Bove F.J., Kaye W.E. Long-term Neurobehavioral Health Effects of Methyl Parathion Exposure in Children in Mississippi and Ohio. *Environ. Health Perspect.* 2004;112(1):46-51.

Salvi R.M., Lara D.R., Ghisolfi E.S., Portela L. V., Dias R.D., Souza D.O. Neuropsychiatric Evaluation in Subjects Chronically Exposed to Organophosphate Pesticides. *Toxicol. Sci.* 2003;72,267-271.

Stephens R., Spurgeon A., Calvert I.A., Beach J., Levy L.S., Berry H., Harrington J.M. Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphates in sheep dip. *Lancet.* 1995;345(8958):1135-9

Investigamos

Desarrollamos

Creamos

con Innovación

En Laboratorios Bagó trabajamos diariamente en la búsqueda de nuevas respuestas terapéuticas para ofrecer al cuerpo médico y pacientes, productos innovadores de última generación. 71 patentes obtenidas por investigación propia son fieles testimonios de nuestra misión.

 **Bagó**

Ética al servicio de la salud

Anticoagulant and factor Xa-like activities of *Tityus discrepans* scorpion venom

Brazón, Josmary^{1*}; Guerrero, Belsy²; D'Suze¹, Gina; Sevcik, Carlos¹; Arocha-Piñango, Carmen L²

¹Laboratorio de Neurofarmacología Celular, Centro de Biofísica y Bioquímica (CBB). ²Laboratorio de Fisiopatología Sección Coagulación, Centro de Medicina Experimental. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Apartado 20632 Caracas, 1020-A. Venezuela.

*jbrazon@ivic.gob.ve, jbrazon@gmail.com

Recibido: 28 de noviembre de 2012
Aceptado: 23 de abril de 2013

Abstract. *Tityus discrepans* venom (*TdV*) produces a variety of haemostatic manifestations including alveoli fibrin deposition and/or prothrombin and partial thromboplastin time (PT, PTT) alterations in mammals. *In vitro* studies have demonstrated that *TdV* contains tissue plasminogen activator-like (t-PA), fibrinolytic and plasmin inhibitory compounds and produces platelets activation through GPVI and a novel Src-dependent signalling pathway. The aim of this study is to describe the initial characterization of procoagulant and anticoagulant components from *TdV*. This venom was fractionated by exclusion molecular chromatography on a Sephadex G-50 column. The eluted material was collected as five fractions called S1 to S5. These fractions and the whole venom were used to evaluate factor Xa- and thrombin-like activities, fibrinogen degradation, furthermore thrombin- and factor Xa-inhibitory activities. The results demonstrated that *TdV* contain components with factor Xa-like activity (procoagulants) as well fibrinogenolytic compounds present in the fraction S1 and components with factor Xa inhibitory activity in the fractions S4 and S5 (anticoagulants).

Keywords: Scorpion; Coagulation; Fibrinogen; Factor Xa.

Resumen. El veneno de *Tityus discrepans* (*TdV*) produce en mamíferos una variedad de manifestaciones hemostáticas tales como depósitos de fibrina en alveolos y/o alteración en los tiempos de protrombina y tromboplastina parcial (PT, PTT). Estudios *in vitro* han demostrado que el *TdV* contiene componentes semejantes al activador del plasminógeno tipo tisular (t-PA), fibrinolíticos, compuestos que inhiben la actividad de plasmina y además componentes que promueven la activación de plaquetas a través del receptor GPVI y por una nueva vía de señalización dependiente de las Src kinasas. El objetivo de este estudio es describir la caracterización inicial de componentes procoagulantes y anticoagulantes a partir del *TdV*. Este veneno fue fraccionado por cromatografía de exclusión molecular sobre una columna Sephadex G-50. El material eluido fue colectado en cinco fracciones denominadas S1 a S5. Estas fracciones y el veneno completo fueron usados para evaluar actividades semejantes a factor Xa y trombina, degradación de fibrinógeno, como también la inhibición de la actividad del factor Xa y de la trombina. Los resultados demostraron que *TdV* contiene componentes con actividad semejante al factor Xa (procoagulantes) y compuestos fibrinogenolíticos presentes en la fracción S1, además de componentes con actividad inhibitoria del factor Xa presentes en la fracción S4 y S5 (anticoagulantes).

Palabras claves: Escorpión; Coagulación; Fibrinógeno; Factor Xa.

INTRODUCTION

Many animal venoms act on the human hemostatic system as procoagulants or anticoagulants. The procoagulant components cause activation of the coagulation system and can induce a massive consumption of coagulant factors (Markland 1998a; 1998b; Arocha-Piñango *et al.* 1999a; 1999b; Reis *et al.* 2001; Flores *et al.* 2006); also some components promote pro-coagulant response of platelets by GPVI receptor activation such as *Tityus*

discrepans venom (*TdV*) (Brazón *et al.* 2011). However, anticoagulant components may inhibit coagulant enzymes such as factor Xa or thrombin (Markward 1994; Baskova and Zavalova 2001; Basanova *et al.* 2002; Motoyashiki *et al.* 2003). Venoms may also cause an anticoagulant effect due to fibrinogen or fibrin degradation related with serine- or metalloproteases (Markland 1998a; 1998b; Pinto *et al.* 2004; Serrano and Maroun 2005; Swenson and Markland 2005).

Tityus discrepans venom contains anticoagulant and procoagulant components which produce alterations of the partial thromboplastin time (PTT) and prothrombin time (PT) (Brazón *et al.* 2008). Furthermore, discreplasminin an antifibrinolytic compound has been isolated from *TdV* (Brazón *et al.* 2009). The purpose of this study is to describe the initial characterization of procoagulant and anticoagulant components from *TdV*. In this paper, we evidenced the presence of procoagulant components showing factor Xa-like activity, while the anticoagulant components inhibited the factor Xa activity and degraded the fibrinogen molecule.

MATERIALS AND METHODS

Animals, venom and purification

Tityus discrepans scorpions were collected in the areas surrounding Caracas, Venezuela. Adult scorpions (~100) were kept alive in a laboratory with food and water *ad libitum*. Venom was extracted from them once a month. The animals were immobilized with CO₂ and the venom extraction was by electrical stimulation with pulse 50 V at 60 Hz for 100 milliseconds. The venom was dissolved in double distilled water and centrifuged at 15,000 g for 15 min at 4 °C to remove the insoluble materials. The supernatant was lyophilized and stored at -80 °C until used. The protein concentration was estimated by spectrophotometry assuming that 1 unit of absorbance/cm of path length at 280 nm corresponds to 1 mg protein/ml (D'Suze *et al.* 1996). This venom was fractionated by exclusion molecular chromatography on a Sephadex G-50 column (1x200 cm) equilibrated and eluted with 20 mM ammonium acetate, pH 4.7, with a flow rate of 0.25 ml/min. Proteins were detected at 280 nm.

Anticoagulant activity

The fibrinogenolytic activity described by Salazar *et al.* (2007) was used to determine the anticoagulant activity of crude venom and fractions. The human fibrinogen solution (in 0.05 M imidazole-0.15 M NaCl, pH 7.4 buffer) was incubated with *TdV* for 24 h at 37 °C, at 0.1/30; 0.25/30; 0.5/30; 1/30 and 5/30 µg venom/µg fibrinogen ratios. Fibrinogen degradation (molecule or chains) was visualized by SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions, respectively, using Tris-Tricine-system on 5 and 7.5% gel (with 49.5% acrylamide/3% bis-acrylamide) (Schagger and Jagow 1987).

Residual coagulant activity of fibrinogen pre-treated with *TdV* or fraction S1, was determined by the thrombin time method (TT) (Austen and Rhymes 1975). Briefly, a mixture of 0.1 ml of 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 (coagulation buffer) plus 0.1 ml of 0.3 % human fibrinogen (in coagulation buffer) treated or not with venom or fraction S1 for 24 h at 37°C and at a 1/30 ratio, was incubated in a borosilicate tube (10x75 mm). Then, 0.1 ml of thrombin solution (in coagulation buffer-2.5 IU/ml) was added, thoroughly mixed at 37°C and clotting time recorded in seconds. Tests were performed three times and the median clotting time calculated. The results were expressed in seconds.

Anticoagulant effect of *Tityus discrepans* also was evaluated using factor Xa or thrombin as substrates. The enzymes, factor Xa (0.3 nKcat/µl) or thrombin (0.01 IU/ml) were incubated at 37 °C for 30 min with different concentrations of *TdV*, S1 to S5 fractions. Then, the amidolytic activity at 405 nm was evaluated following the method of Guerrero *et al.* (1992), using S-2222 or S-2238 chromogenic substrate (0.8 mM and 0.6 mM, final concentration), respectively. The activity was expressed as UA/min/µg. The enzymes incubated with buffer were used as positive controls.

Procoagulant activity

Tityus discrepans venom coagulant activity was evaluated using S-2222 and S-2238 chromogenic substrates, which determined the factor Xa or thrombin-like activities. A mixture of 80 µl of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.4, 10 µl of sample venom (1 - 10 µg/µl) and 10 µl of substrate (0.8 mM S-2222 or 0.6 mM S-2238, final concentration) were placed in each well of 96 well polystyrene plates. After incubating at 37 °C for 30 min, the absorbance at 405 nm was measured. One unit of amidolytic activity was expressed as UA/min/µg. Furthermore, factor Xa-like amidolytic activity was assayed in the presence of protease inhibitors. Prior to the assay, *TdV* or its fractions were incubated for 30 min at 37 °C, with each protease inhibitors using 10 mM 1,10 phenanthroline, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA-Na), or 10 mM bis(2-aminoethyl) tetraacetic acid (EGTA-Na) as metalloprotease inhibitors; 10 mM benzamidine, 1 µg/µl soybean trypsin inhibitor (SBTI) or 100 UI/ml aprotinin as serine protease inhibitors; and 0.1 mM iodoacetic acid as cysteine protease inhibitors.

Statistical analysis

Data were processed using nonparametric statistical procedures. Data were expressed as medians and their 90% confidence intervals (CI) with $n=3$, calculated by Hollander and Wolfe 1973.

RESULTS

Tityus discrepans venom was fractionated on Sephadex G-50 column and the eluted material was collected as five fractions called S1 to S5 (Figure 1A).

The proteases present in *TdV* induced a slight increase of fibrinogen electrophoretic mobility when a *TdV*/fibrinogen ratio $\geq 0.5/30$ was used; this effect was greater at a ratios $\geq 1/30$. At the same conditions was also evidenced a fibrinogen $A\alpha$ -chains degradation; whereas $B\beta$ and γ chains were unaffected (not shown). The ratio 1/30 was used to evaluate the effect of *TdV* on fibrinogen molecule/chains at different incubation times. An increase in electrophoretic mobility of fibrinogen at times ≥ 16 h was observed. Fibrinogen $A\alpha$ chains degradation started after 2 h of incubation with *TdV* and the effect was completed 24 h later. The $B\beta$ and γ chains degradation did not was observed in these conditions (not shown). Fibrinogen incubation for 24 h at 37 °C with *TdV* or with Sephadex G-50 fraction S1 (ratio 1/30), under non reducing conditions produced an increase in fibrinogen electrophoretic mobility (Figure 1B, lanes 2 and 3). Under reducing conditions, *TdV* only degraded fibrinogen $A\alpha$ -chains, however fraction S1 degraded both $A\alpha$ and $B\beta$ chains, generating degradation fragments with molecular weights < 31 kDa (Figure 1C, lanes 2 and 3). S2 to S5 fractions had no effect on fibrinogen molecule or chains (Figure 1B and 1C).

The fibrinogen coagulant activity residual after treating with either *TdV* or fraction S1 (at a 1/30 ratio) was evaluated using the TT. The results showed that TT is prolonged as the fibrinogen incubation time with *TdV* or fraction S1 increases (not shown).

In relation to factor Xa or thrombin amidolytic activity, the results showed that hundred micrograms *TdV* increased the factor Xa activity (0.3 nKcat/ μ l) from 758.70 to 864.93 (864.92-864.96) UA/min/ μ g and this effect was more pronounced with fraction S1 (100 μ g), observing an amidolytic activity increase from 758.70 to 998.73 (998.71- 998.77). In contrast, fractions S4 and S5 inhibited the factor Xa activity in 56.11 and 16.17%, respectively (Table 1). *TdV* did not modify the thrombin amidolytic

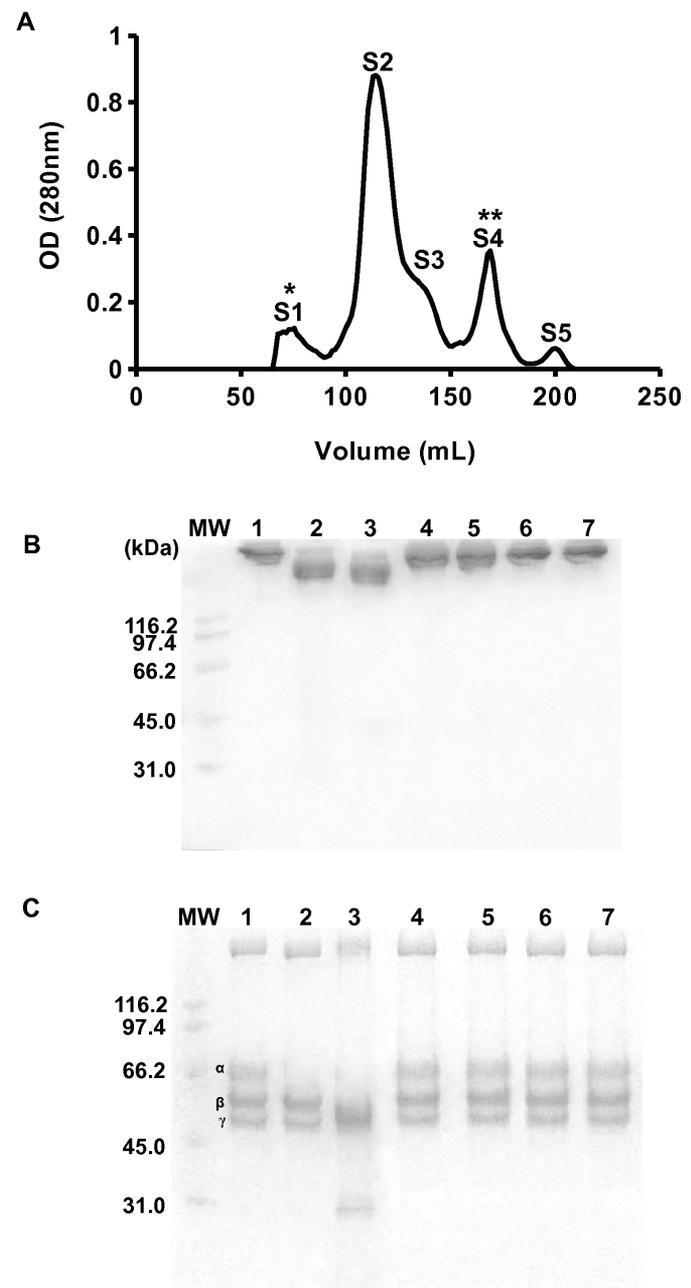


Figure 1. *Tityus discrepans* venom (*TdV*) chromatography and fibrinogenolytic activity of *TdV* and its Sephadex G-50 fractions. (A) *TdV* (100 mg/ml) was passed through a Sephadex G-50 column (1 x 200 cm), with 20 mM of ammonium acetate, pH 4.7, detecting at OD 280 nm with a 0.25 ml/min flow rate. Five fractions were obtained (S1-S5). (B) Fibrinogen molecule degradation (30 μ g) by *TdV* (1 μ g) or by its fractions (1 μ g) after 24 h incubation at 37 °C was visualized by SDS-PAGE using Tris-Tricine-system on 5% gel under non reducing conditions. (C) Fibrinogen chains degradation (30 μ g) by *TdV* (1 μ g) or by its fractions (1 μ g) after 24 h incubation at 37 °C was visualized by SDS-PAGE using Tris-Tricine-system on 7.5% gel under reducing conditions. 1.- Fibrinogen (Fg) control. 2.- Fg + *TdV*. 3.- Fg + S1. 4.- Fg + S2. Fg + S3. Fg + S4. Fg + S5. Fibrinogen consists of three polypeptide chains $A\alpha$, $B\beta$ and γ . Standard proteins were used as a reference to determine the molecular weight. The gels were stained with R-250 Coomassie Blue.

activity (data not shown). These results suggested the existence in *TdV* of a factor Xa-like activity and a factor Xa inhibitory activity which are present in the fraction S1 (procoagulant activity) and S4 and S5 (anticoagulant activity). The results also evidenced a direct amidolytic activity with *TdV* due to 10 µg crude venom hydrolyzed S-2222 substrate with an amidolytic activity of 19.80 (19.79-19.81) UA/min/µg (Table 1). This effect was more pronounced with 100 µg crude venom and the activity was

of 106.23 (106.23 - 106.24) UA/min/µg. Furthermore, the amidolytic activity was enriched four times in fraction S1 (Table 1). Fractions S2 - S5 had no hydrolyzed the S-2222 substrate (Table 1). This amidolytic activity was reduced by > 58% in presence of serine protease inhibitors such as benzamidine or SBTI (factor Xa specific inhibitor) (Table 1). In contrast, EDTA, EGTA, phenanthroline, iodoacetic acid or aprotinin did not modify this activity (data not shown).

Table 1. Factor Xa-like and Factor Xa inhibitory activities of *TdV* and its Sephadex G-50 fractions.

Factor Xa-like activity was measured by an amidolytic micromethod (S-2222 substrate) in presence or absence of protease inhibitors. To evaluate the effect of *TdV* or its fraction on factor Xa activity was incubated for 30 min at 37°C factor Xa (0.3 nkat/µl) with *TdV* or Sephadex-G50 fractions. Data were expressed as median and its IC at 90% confidence, n = 3, ND = No determined. Benz: Benzamidine.

Action of <i>TdV</i> and its fractions on factor Xa activity			
Sample (10 µL)	Amidolytic activity (S-2222) UA/min/µg	% inhibition	
FXa (0.3 nKcat/µL)	758.70 (758.69-758.72)	0.00	
FXa + <i>TdV</i> (10 µg)	545.64 (545.63-545.66)	28.08	
FXa + <i>TdV</i> (50 µg)	670.63 (670.62-670.65)	11.61	
FXa + <i>TdV</i> (100 µg)	864.93 (864.92-864.96)	0.00	
FXa + S1 (100 µg)	998.73 (998.71-998.77)	0.00	
FXa + S4 (100 µg)	333.00 (332.98-333.10)	56.11	
FXa + S5 (100 µg)	636.02 (636.00-636.04)	16.17	
Factor Xa-like activity			
Sample (10 µL)	Amidolytic activity (S-2222) UA/min/µg	Benz	SBTI
<i>TdV</i> (10 µg)	19.80 (19.79-19.81)	N.D	N.D
<i>TdV</i> (50 µg)	78.60 (78.59-78.63)	N.D	N.D
<i>TdV</i> (100 µg)	106.23 (106.23-106.24)	65.63	58.60
S1 (100 µg)	404.08 (404.08-404.10)	88.50	78.41

In addition, nor *TdV* neither the chromatographic fractions showed thrombin-like amidolytic activity.

DISCUSSION

Scorpions using their venom to defend them-

selves from predators or to capture their prey; their venoms are complex mixtures of biologically active components over different types of organisms, such as bacteria, insects, fungi and mammals (D'Suze *et al.* 2004a; 2004b; Díaz *et al.* 2009; Joya *et al.* 2011). Scorpion venoms

are generally not known to have the ability to produce hemostatic alterations. However, there are exceptions as *Centruroides sculpturatus* (Watt et al., 1974; Longenecker and Longenecker 1981), *Buthus tamulus* (Devi et al. 1970; Reddy et al. 1972), *Buthus martenisii* (Song et al. 2005) and *Tityus discrepans* (D'Suze et al. 2003; 2004b; Brazón et al. 2008; 2009; 2011) that their venoms, in case of severe envenoming perturb the mammal hemostatic system. The relevance of components with action on haemostatic system (platelet, coagulation and fibrinolysis) in scorpion venoms is not clear. However, the presence of these components has pathophysiologic implications severe in the scorpion envenoming. The results of fibrinogenolytic activity indicate that *TdV* contains fibrinogenases that induce fibrinogen degradation associated with an anticoagulant effect. Similar components were isolated from snake venoms, such as ancrod, this compound is medically important as therapeutic agents (Swenson and Markland 2005). On the other hand, the results of this study indicated the presence of anticoagulant components with factor Xa inhibitory activity in *TdV*, which are responsible of the previously described PTT and PT prolongation (Brazón et al. 2008).

Furthermore, this venom produces a factor Xa-like activity (procoagulant activity) which was found in fraction S1; this finding is consistent with the synergism in amidolytic activity observed when commercial factor Xa was incubated with either *TdV* or fraction S1. Probably, the components with the factor Xa-like activity present in the venom and S1 induced the previously described PTT shortening (Brazón et al. 2008). The benzamidine or SBTI effects on the venom amidolytic activity, supports the notion that a serineproteases with factor Xa-like activity exists in *T. discrepans* venom. Additionally, the *TdV* did not hydrolyze the S-2238 substrate. These results indicate the absence of thrombin-like activity in venom (data not shown).

We have shown that *TdV*, in addition to t-PA-like compounds and discreplasminin, a plasmin inhibitor (Brazón et al. 2009), also contains anticoagulant compounds able to inhibit factor Xa amidolytic activity and to induce fibrinogen degradation. Our results also demonstrated the existence of a procoagulant activity which was similar to factor Xa. All these compounds, per se or in combination, could explain the alterations of PT and PTT (Brazón et al. 2008)

as well as the fibrin deposits observed in lung alveoli from experimentally envenomed mammals (D'Suze et al. 2004b).

The most dangerous complication induced by *TdV* is the "scorpion venom respiratory distress syndrome (SVRDS)". Our group has demonstrated that this complication started by neutrophil lung infiltration and sequestration, with important fibrin deposition as the last step of a cascade reaction where leukocytes activation products are involved (D'Suze et al. 2003). However the pathophysiology of SVRDS is complex and cannot be entirely attributed to the unregulated leukocytes activation products, SVRDS may in part be associated with the procoagulant components found in *TdV*. These are not abundant, < 1% of the venom, but are able to produce coagulation disorders both in scorpionism patients as well as *in vitro* studies (Brazón et al. 2008; D'Suze et al. 2003, 2004). Perhaps venom procoagulant components act in a synergistic form with neutrophil procoagulant products enhancing fibrin clots formation. These critical questions wait for answers from ongoing studies.

This investigation has motivated the further purification and physiological characterization of the compounds responsible of the haemostatic alterations reported here. These compounds are very interesting due its biotechnological applications on clinical disorders associated with the fibrinolytic system and coagulation, it is mandatory to determine their action mechanisms, physiological effects and pharmacokinetic parameters.

Acknowledgements

The authors are indebted to the people of San Antonio de Los Altos, Miranda, Venezuela and their Fire Department for the supply of scorpions. We thank to Moisés Sandoval for the technical assistance. We are grateful with Zoi-la Carvajal and Ana Maria Salazar for the technical assistance as for their advice and comments. This research was supported by grants from FONACIT and IVIC (Caracas, Venezuela).

REFERENCES

Arocha-Piñango C.L., Marchi R., Carvajal Z., Guerrero B. Invertebrate compounds acting on the hemostatic mechanism. Blood coagulation and fibrinolysis. 1999a;10:43-68.

Arocha-Piñango C.L., Marchi R., Guerrero B. Inventory of exogenous hemostatic factors

derived from arthropods. *Thromb Haemost and Haemostasis*. 1999b;81:647-656.

Austen D., Rhymes I. A laboratory manual of blood coagulation. Osney Mead, Oxford, London: Blackwell Scientific Publications; pp. 38. 1975.

Basanova A.V., Baskova I.P., Zavalova L.L. Vascular-platelet and plasma hemostasis regulators from bloodsucking animals. *Biochemistry (Moscow)*. 2002;67:143-150.

Baskova I.P., Zavalova L.L. Proteinase inhibitors from the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Biochemistry (Moscow)*. 2001;66:869-883.

Brazón J., Guerrero B., Arocha-Piñango C.L., Sevcik C., D'Suze G. Efecto del veneno del escorpión *Tityus discrepans* sobre las pruebas globales de la coagulación. *Estudios preliminares. Investigación Clínica*. 2008;49:49-58.

Brazón J., D'Suze G., D'Errico M.L., Arocha-Piñango C.L., Guerrero G. Discreplasinin, a plasmin inhibitor isolated from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Archive of Toxicology*. 2009;83:669-678.

Brazón J., Hughes C., Mori J., Sevcik C., D'Suze G., Watson S. Effect of the *Tityus discrepans* scorpion venom in platelets. *Platelets*. 2011;22:165-172.

Devi S., Reddy N., Devi L., Subrahmanyam Y., Bhatt V., Suvarnakumari G., Murthy D., Reddy C. Defibrination Syndrome due to scorpion venom poisoning. *British Medical Journal*. 1970;1:345-347.

Díaz P., D'Suze G., Salazar V., Sevcik C., Shannon J.D., Sherman N.E., Fox J.W. Antibacterial activity of six novel peptides from *Tityus discrepans* scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na⁺ permeability changes. *Toxicon*. 2009;54:802-17.

D'Suze G., Corona F., Possani L.D., Sevcik C. HPLC purification and amino acid sequence of toxins from the muscarinic fraction of *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon*. 1996;34:591-598.

D'Suze G., Moncada S., González C., Sevcik C., Aguilar V., Alagón A. Relationship between

plasmatic levels of various cytokines, tumour necrosis factor, enzymes, glucose and venom concentration following *Tityus scorpion* sting. *Toxicon*. 2003;41:367-375.

D'Suze G., Sevcik C., Corona M., Zamudio F.Z., Batista C.V.F., Coronas F.I., Posanni L. Ardiscretin a novel arthrop-selective toxin from *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon*. 2004a;43:263-272.

D'Suze G., Salazar V., Díaz P., Sevcik C., Azpuru H., Bracho N. Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. *Toxicon*. 2004b;44:851-860.

Flores MPA., Fritzen M., Reis C.V., Chudzinski-Tavassi A.M. Losac, a factor X activator from *Lonomia obliqua* bristle extract: Its role in the pathophysiological mechanisms and cell survival. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;343:1216-1223.

Guerrero B., Arocha-Piñango C.L., Activation of human prothrombin by the venom of *Lonomia achelous* (Cramer) caterpillars. *Thrombosis Research*. 1992;66:169-177.

Hollander M., Wolfe D.A. Nonparametric statistical procedures. Eds John Wiley and Sons. New York. 1973.

Ickx B.E., van der Linden P.J., Melot C., Wijns W., de Pauw L., Vandestadt J., Hut F., Pradier O. Comparison of the effects of aprotinin and tranexamic acid on blood loss and red blood cell transfusion requirements during the late stages of liver transplantation. *Transfusion*. 2006;46:595-605.

Joya G., D'Suze G., Salazar V., Rosales A., Sevcik C., Visbal G., Ferreira A.T., Perales J. 2011. Scorpion toxins modify phytopathogenic fungus physiology. A possible source of new fungicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59:6327-37.

Longenecker G., Longenecker H. *Centruroides sculpturatus* venom and platelet reactivity: Possible role in scorpion venom-induced defibrination syndrome. *Toxicon*. 1981;19:153-157.

Markland F. Snake venoms and hemostatic

system. *Toxicon*. 1998a;36:1749-1800.

Markland F. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzyme: an updated inventory. *Thrombosis and Haemostasis*. 1998b;79:668-674.

Markward F. Inventory of coagulation inhibitors from animals feeding on blood. *Thrombosis and Haemostasis*. 1994;72:477-480.

Motoyashiki T., Tu A.T., Azimov D.A., Ibragim K. Isolation of anticoagulant from the venom of tick, *Boophilus calcaratus*, from Uzbekistan. *Thrombosis Research*. 2003;110:235-241.

Pinto A.F.M., Dobrovolski R., Veiga A.B.G., Guimarães J.A. Lonofibrase, a novel α -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thrombosis Research*. 2004;113:147-154.

Reddy C.R., Suvarnakumary G., Devi C.S., Reddy C.N. Pathology of scorpion venom poisoning. *Journal of Tropical Medicine & Hygiene*. 1972;75:98-100.

Reis C.V., Portaro F.C.V., Andradre S.A., Fritzen M., Fernandes B.L., Sampaio C.A.M., Camargo A.C.M., Chudzinski-Tavassi A.M. A prothrombin activator serine proteases from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (Lopap) biochemical characterization. *Thrombosis Research*. 2001;102:427-436.

Salazar A.M., Rodriguez-Acosta A., Girón M.E., Aguilar I., Guerrero B. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the mapanare (*Bothrops atrox*) snake venom from different geographical areas in Venezuela. *Thrombosis Research*. 2007;120:95-104.

Schagger H., Jagow G. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 1987;166:368-379.

Serrano M.T., Maroun R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. 2005;45:1115-1132.

Song Y.M., Tang X.X., Chen X.G., Gao B.B., Gao E., Bai L., Lv X.R. Effects of scorpion venom bioactive polypeptides on platelet aggregation and thrombosis and plasma 6-keto-PGF1 α and TXB2 in rabbits and rats. *Toxicon*. 2005;46:230-235.

Swenson S., Markland J. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon*. 2005;45:1021-1039.

Watt D., Barbin D., Mlejnek R. The protein neurotoxins in scorpion and elapid snake venoms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1974;22: 43.

Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular

Cadmium: effects on health. Cellular and molecular response

Martínez Flores, Karina; Souza Arroyo, Verónica*; Bucio Ortiz, Leticia;
Gómez Quiroz, Luis Enrique; Gutiérrez Ruiz, María Concepción

Laboratorio de Fisiología Celular, Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Avenida San Rafael Atlixco 186, Colonia Vicentina, Iztapalapa, México D. F. 09340. Tel/ Fax 58044730.

*veso@xanum.uam.mx

Recibido: 15 de mayo de 2012
Aceptado: 2 de agosto de 2012

Resumen. El cadmio (Cd) es un metal que se encuentra principalmente en la corteza terrestre y siempre se presenta en combinación con el zinc. Es ampliamente utilizado en la industria. Se considera un contaminante y es liberado al ambiente como subproducto de la extracción de cobre, hierro y zinc. La exposición al Cd puede producir una variedad de efectos adversos tanto en el humano como en los animales. Una vez absorbido se acumula en el organismo por tiempos largos. Dependiendo de la dosis, fuente y tipo de exposición puede dañar varios órganos como el hígado, riñón, pulmón, hueso, testículos y placenta. Los seres humanos están expuestos al Cd principalmente a través de la ingesta de alimentos, del humo del cigarro, así como del agua y aire contaminados con el metal. La entrada de Cd a las células no es uniforme en todos los sistemas y puede ser mediada por transporte pasivo o activo, o por canales de calcio. Se considera que uno de los mecanismos de toxicidad de este metal es debido, en parte, a las especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden actuar como segundos mensajeros y por tanto alterar diferentes vías de señalización. Por todo lo expuesto el objetivo de esta revisión es analizar los efectos del Cd sobre la salud, así como sobre la respuesta celular y molecular.

Palabras clave: Cadmio; Metalotioneína; Especies reactivas de oxígeno; Cascadas de señalización.

Abstract. Cadmium (Cd) is a metal found in the earth's crust, always as part of several, mainly zinc-rich, ores. Cd is considered as an environmental pollutant, it is widely used in the industry. It coexists with other metals and its release into the environment is carried out in parallel with the release of copper, iron and zinc. Cd is known to have numerous undesirable effects on health in both humans and animals. Once absorbed, it is efficiently retained in the body, where it accumulates throughout life. Depending on the dose, source and type of exposure it could damage several organs as the liver, kidney, lung, bones, testes and placenta. Important sources of human intoxication are food, cigarette smoke as well as contaminated water and air. Cd cell uptake is not uniform across all systems. This could be mediated by passive or active transport, or via calcium channels. It is known that the toxicity produced by this metal is due, in part to reactive oxygen species, which could act as second messengers that may alter different signaling cascades. The aim of this review is to analyze the effects of Cd on health, as well as on cellular and molecular response.

Key words: Cadmium; Metallothionein; Reactive oxygen species; Signaling pathways.

INTRODUCCIÓN

El cadmio (Cd), es un metal pesado que se obtiene como subproducto del procesamiento de metales como el zinc (Zn) y el cobre (Cu). Se acumula en el ambiente como resultado de las actividades industriales (Farkas y col. 2007; Pan y col. 2009), que involucran la fabricación de baterías níquel-cadmio, la quema de combustibles fósiles, la generación de polvos por el proceso de fabricación de cemento y fertilizantes fosfatados. Se utilizan

pigmentos a base de Cd para crear tintes, pinturas, plásticos y cerámica. Estas actividades industriales son consideradas como una gran fuente de emisión a la atmósfera y de contaminación para mantos acuíferos y suelos. Los ríos contaminados con Cd pueden irrigar tierras de cultivos, además de que el Cd es capaz de combinarse con otros elementos y formar compuestos tales como cloruros, óxidos, sulfuros y de esta manera unirse fuertemente a las partículas del suelo. A nivel mundial se

ha estimado que el uso de Cd en la actividad industrial se ha incrementado de 18400 toneladas en 2003 a 20400 toneladas en el 2007 (Moulis y Thévenod 2010). Se considera que la mayor cantidad de Cd en el suelo proviene del uso de fertilizantes de fosfatos para la agricultura, lo cual produce que se acumule a lo largo de la cadena alimenticia en plantas y animales. Es por ello que la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR), tiene al Cd catalogado entre los 275 materiales más peligrosos (ATSDR 2007). Moulis y Thévenod (2010), mencionan que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha establecido algunas medidas preventivas para disminuir la contaminación por Cd del medio ambiente y la transferencia a través de la cadena alimenticia hasta el ser humano. Estas medidas, involucran reducir la disponibilidad de Cd en el suelo y las plantas mediante la neutralización de acidez del suelo; además de mantener una dieta rica en hierro para que la absorción intestinal de Cd se reduzca. La exposición crónica al Cd puede causar efectos adversos en riñón, hígado, pulmón, páncreas, testículos, placenta y hueso (Satarug y col. 2010); sin embargo este metal puede disparar mecanismos adaptativos, así como generar especies reactivas de oxígeno (ERO) que actúan como mediadores de señalización celular y respuesta anti-apoptótica. Esta respuesta tiene importancia médica ya que este tipo de exposición se ha asociado con varios tipos de cánceres (Liu y col. 2009). Basado en estudios epidemiológicos y experimentales, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), ha clasificado al Cd como un carcinogénico en la categoría I (IARC 1993). Es por ello que el objetivo de esta revisión es analizar los efectos del Cd en la salud, así como sobre la respuesta celular y molecular.

EFFECTOS EN LA SALUD

Los efectos de la toxicidad por Cd dependen del tipo de exposición, ya sea a través de la inhalación de aire contaminado, particularmente cerca de fundidoras y las incineradoras o del humo del cigarro, consumo de alimentos y agua contaminados. Además la deficiencia de metales esenciales como el hierro (Fe), Cu, Zn y calcio (Ca) en el cuerpo humano facilita la absorción de Cd, por lo tanto sus órganos blanco son el riñón (especialmente la corteza renal), hígado, pulmón, hueso y placenta. Se estima que entre un 10-50% de Cd se absorbe

en pulmón, mientras que a nivel gastrointestinal la absorción es del 8%. Así, en fumadores, se ha encontrado que la concentración de Cd en la sangre es de 1-4 $\mu\text{g/l}$, un valor de 4 a 5 veces más alto que en los no fumadores. Se sabe que un cigarro contiene entre 0,5-3 μg de Cd por gramo de tabaco, dando como resultado una absorción de 3 μg diarios por vía respiratoria. Además del tabaco, alimentos como mariscos tienen altas concentraciones de Cd (Storelli 2009; Ololade y col. 2011). El Cd asimilado, es captado por el hígado donde forma complejos con pequeños péptidos como el glutatión (GSH) (Cd-GSH) o con proteínas de bajo peso molecular como la metalotioneína (MT) (Cd-MT) y es secretado en la bilis o bien liberado a la circulación. Estos complejos son una forma importante de transporte y almacenamiento del metal dentro del organismo, explicando así su larga vida biológica entre los 10-30 años (EFSA 2009).

Inflamación

La exposición al Cd, ya sea ocupacional o ambiental, está asociada con inflamación. La respuesta inflamatoria inducida por el Cd, involucra la producción y liberación de citocinas tales como la interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Bakshi y col. 2008; Kataranovski y col. 2009; Lag y col. 2010). Se conoce que la respuesta mediada por el TNF- α , involucra la infiltración de células inflamatorias, la generación de ERO y la regulación de la expresión de otras citocinas. Lag y col. (2010), encontraron un comportamiento diferencial en la expresión y liberación de citocinas en fibroblastos, células epiteliales y macrófagos de pulmón de ratas expuestas a Cd. El Cd puede inducir inflamación, pero las bases moleculares no se conocen con exactitud. Se ha propuesto que las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos), específicamente la cinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 (Erk 1/2) y la p38 están involucradas en la inducción del TNF- α en monocitos y macrófagos expuestos a Cd (Haase y col. 2010). Cormet-Boyaka y col. (2012), demostraron que la secreción de IL-8 en células epiteliales alveolares expuestas a Cd, disminuye cuando se inhibe la expresión de la Erk 1/2 con el RNA de silenciamiento o de interferencia (siRNA). Recientemente, se ha determinado que la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) contribuye a la

respuesta inflamatoria que el Cd induce en células de pulmón (A549) de origen humano (Kundu y col. 2011). Asimismo, el Cd activa varios factores de transcripción, tales como la proteína activadora-1 (AP-1) (Souza y col. 2004b) y el factor nuclear- κ B (NF- κ B) (Freitas y Fernandes 2011), que están involucrados en la expresión de varios mediadores inflamatorios.

Riñón

El Cd es nefrotóxico (L'Azou y col. 2007) y el daño renal se manifiesta con proteinuria (Nogué y col. 2004), que se determina por un incremento de proteínas de bajo peso molecular como transferrina, albúmina, N-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) y β 2-microglobulina en la orina que son utilizadas como marcadores de daño renal. La continua exposición a Cd, además de causar disfunción tubular, también puede progresar a daño glomerular con una disminución en la filtración glomerular (GFR) (Mortensen y col. 2011). Además de la proteinuria, el Cd también puede provocar nefrotoxicidad severa que se manifiesta como glucosaturia, aminoacidonuria e hipercalcioruria. Recientemente, se ha determinado que la toxicidad renal por el Cd, puede estar relacionada con el incremento en los niveles de la enzima sintetasa de óxido nítrico (NOS) que afecta la fisiología del órgano (Soyupek y col. 2011). La NOS es la responsable de la síntesis de óxido nítrico (ON) que puede reaccionar con el radical libre anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), generando peroxinitrito (ONOO-) que produce toxicidad celular. La exposición al Cd también ha sido asociada con el desarrollo de osteoporosis. El grupo de Chen y col. (2009) encontró que el Cd disminuye la viabilidad celular, inhibe la formación de hueso y la actividad de fosfatasa alcalina en osteoblastos de rata. Un estudio reciente, demostró que existe una correlación entre la densidad mineral ósea y una disfunción renal causada por el Cd (Chen y col. 2011).

Cáncer

Se ha asociado la exposición a Cd con una alta mortalidad por cáncer (Akesson y col. 2008). Recientemente, se ha identificado que el Cd regula la expresión del gene AEG-1, cuya proteína codificada podría ser importante para el desarrollo del tumor, progresión y metástasis a través del factor NF- κ B en células de cáncer de mama (MDA-MB231) (Luparello y col. 2012). Sin embargo, el mecanismo molecular carcinogénico del Cd no se conoce con exactitud.

INGRESO CELULAR

La entrada de Cd a la célula puede llevarse a cabo por diversas vías, dependiendo del tipo celular y de las condiciones fisiológicas. Es por ello que los mecanismos responsables de la acumulación se deben a la competencia que el Cd genera con metales esenciales como el Cu, Zn, Ca y Fe que tienen un sistema de transporte específico. Fotakis y Timbrell (2006), señalan que una tercera parte del Cd entra al hepatocito por canales de Ca y sugieren que la presencia de antagonistas de canales de Ca como la nifedipina y verapamilo, reducen la entrada de Cd, confirmando una interferencia con el transporte de Ca. Debido a que el Ca y Cd tienen un radio iónico y carga similar se puede explicar por qué los dos elementos tienen rutas similares de entrada en la célula (Fotakis y Timbrell 2006). El Fe es transportado por la proteína transportadora 1 de metales divalentes (DMT1) o por la proteína transportadora 8 relacionada a Zn y Fe (ZIP8). Dichas proteínas son utilizadas por el Cd para su entrada a la célula. Esto fue demostrado en las líneas celulares epiteliales derivadas de pulmón humano (H441 y A549) que fueron expuestas a Cd, encontrándose incrementado tanto la acumulación de Cd, como la expresión de los transportadores Zip8 y DMT1 (Mantha y col. 2011). Lo antes dicho se apoya en experimentos con células basófilas (RBL-2H3) de rata, transfectadas con el siRNA para disminuir la expresión del transportador ZIP8, demostrando una reducción en la entrada de Cd (Fujishiro y col. 2011). Recientemente se demostró, que en células epiteliales de pulmón, el Cd incrementó, tanto el ARNm como la expresión del transportador ZIP8 de manera dependiente del factor NF- κ B (Napolitano y col. 2012). Por otro lado, el grupo de Wolff y col. (2011) evaluó la participación del factor-1-ADP-ribosilación (Arf1), en la entrada de complejos metal-proteína incluyendo el complejo Cd-MT. El Arf1 es una proteína que participa en la regulación del tráfico vesicular y la sobre-expresión del mutante Arf1 en células renales está relacionada con la reducción en la toxicidad inducida por el complejo Cd-MT. El Cd también puede formar complejos con el GSH, a nivel de sus grupos sulfhidrilo (-SH) y por medio de transportadores específicos, parecidos a las proteínas de resistencia a drogas 1 y 2 (MRP1, MRP2), se puede transportar el Cd-GSH al medio extracelular. En células derivadas de intestino humano (TC7), se de-

terminó un mecanismo para el transporte de Cd en la membrana basolateral y se sugirió la participación de las MRP1 y MRP2 (Carriere y col. 2011). Una vez acumulado, este metal es capaz de afectar los patrones de actividad transcripcional y señalización celular que pueden llevar a respuestas de adaptación o sobrevivencia (Thijssen y col. 2007), proliferación celular (Liu y col. 2008) o puede culminar en la muerte celular vía apoptosis o necrosis (Zhang y col. 2010; Brama y col. 2012).

ESTRÉS OXIDATIVO

Varios mecanismos han sido propuestos para explicar el daño inducido por el Cd en el organismo y las ERO son consideradas como mediadores importantes en esta respuesta. Se conocen a las ERO como moléculas radicales o no radicales que son consideradas como agentes oxidantes. Los radicales libres, se caracterizan por tener un electrón desapareado, lo que los hace muy reactivos, debido a que tienden a sustraer un electrón de moléculas estables con la finalidad de alcanzar su estabilidad electroquímica. Las ERO comprenden al: radical $O_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH^{\cdot-}$) y lipoperóxidos que se han relacionado con una variedad de enfermedades. Estudios han demostrado que el Cd puede generar ERO de manera indirecta, provocando daño en el ADN (Nzengue y col. 2008), en proteínas, en membranas y alterando la cadena de electrones mitocondrial (Belyaeva y col. 2004; Belyaeva y col. 2008; Liu y col. 2011; Mao y col. 2011). Para explicar el papel indirecto del Cd en la generación de los radicales libres, se ha planteado que este metal puede reemplazar al Fe y Cu en varias proteínas de membrana y citosólicas como la ferritina, generando un incremento en el radical $OH^{\cdot-}$ vía la reacción de Fenton. Un estudio reciente en células C6 (glioma de rata), expuesto con $20 \mu M$ de $CdCl_2$, reveló que la alteración en la homeostasis de Cu, Zn y la inhibición en las enzimas antioxidantes están involucradas en el estrés inducido por el Cd (Nzenque y col. 2012). La mitocondria es un blanco intracelular para diferentes estresores, incluyendo el Cd, sin embargo los mecanismos de daño mitocondrial generados por el metal, no están bien definidos. Dorta y col. (2003), mencionan una secuencia de eventos para explicar la alteración funcional de la mitocondria inducida por el Cd: primero, una interacción del Cd con los grupos $-SH$ de las proteínas de la

membrana mitocondrial disipando el potencial de membrana ($\Delta\psi$), que provoca un desacoplamiento y segundo, una inhibición de la cadena respiratoria con la generación de ERO que causan lipoperoxidación mitocondrial. Belyaeva y col. (2004), proponen que el Cd genera ERO a través de una inhibición selectiva en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En células de hepatoma de rata (AS-30D) tratadas con Cd, encontraron un efecto bifásico en la generación de ERO; un incremento a tiempos cortos de exposición y una disminución a tiempos largos con altas concentraciones de Cd así como inhibición en la respiración celular y disipación del $\Delta\psi$ (Belyaeva y col. 2008). Un estudio reciente en células embrionarias humanas de riñón (HEK293), propone que el Cd puede inducir disfunción mitocondrial de manera directa; incluyendo un incremento en la permeabilidad, inhibición en la respiración y provocando estrés oxidativo (Mao y col. 2011). La acumulación de ERO afecta el potencial de membrana mitocondrial y activa una serie de eventos incluyendo la apoptosis. Por otro lado, se ha demostrado que el Cd induce la expresión de la NADPH oxidasa (NOXs) en riñón (Thijssen y col. 2007), en neuronas (Chen y col. 2011) y la actividad en hepatocitos (Souza y col. 2009). Las NOXs son una familia de enzimas transmembranales que generan ERO e incluyen: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2. Las NOXs se activan a través de una serie de fosforilaciones y de interacciones de la subunidad p22 con proteínas citosólicas que son la p40, p47, p67 y una GTPasa Rac. En hepatocitos (Souza y col. 2009) y en neuronas (Chen y col. 2011), el Cd induce la producción de ERO vía la NOX por regular la expresión de la subunidad regulatoria p47. Se ha relacionado la actividad de esta oxidasa en la activación de ciertas vías de señalización sensibles al estado redox y un exceso en la producción de ERO por las NOXs ha sido implicado en una variedad de desordenes que resulta en la muerte celular por apoptosis. El estrés oxidativo inducido por el Cd, causa lipoperoxidación y los lipoperóxidos producidos pueden reaccionar con el ADN y las proteínas alterando las funciones celulares. En un estudio con ratas Wistar expuestas a Cd, se evaluó la lipoperoxidación, dando como resultado una elevada cantidad de malondialdehído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos y una disminución en el contenido de GSH (Prabu y col. 2010). Se ha

sugerido que el estrés oxidativo inducido por el Cd, está relacionado con la inhibición de enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), la glutatión reductasa (GR), la glutatión peroxidasa (GPX), la ascorbato peroxidasa y la superóxido dismutasa (SOD) dando como resultado la acumulación de ERO. En la línea celular (CRL-1439) derivadas de hígado de rata (Ikediobi y col. 2004) y en cultivo primario de hepatocitos de rata (Liu y col 2011) expuestas a Cd, encontraron un incremento en la generación de ROS y una disminución tanto en el contenido de GSH como en las actividades de la GPX, CAT y GR. Por otro lado, en células neuronales expuestas con 10 μM de CdCl_2 durante 24 h, se asociaron cambios en la conformación de la superóxido dismutasa dependiente de Cu-Zn (Cu-Zn-SOD) con una disminución en su actividad enzimática y apoptosis inducida por estrés oxidativo (Huang y col. 2006). Un estudio reciente en la línea celular derivada de riñón de mono africano (COS7) tratada con Cd, reveló una disminución en la expresión y contenido de la superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD) pero no en las otras isoenzimas y una reducción con el inhibidor de la cinasa p38 (SB203580) (Obara y col. 2011). Con estos resultados concluyen que la reducción de la EC-SOD no está regulada directamente por la cinasa p38 sino en parte por la activación o inactivación de factores de transcripción que reprimen su transcripción. Por otra parte, estudios *in vitro* revelan que el Cd induce el rompimiento de la cadena de ADN (Haldrud y Krokje 2009), sin embargo el mecanismo de daño no está muy claro. Nzenge y col. (2008), demostraron en queratinocitos humanos (HaCaT), que el daño en ADN y los efectos tóxicos inducidos por el Cd, es consecuencia de una disminución en el contenido de GSH alterando el estado redox de la célula. El grupo de Lei y col. (2008), menciona que las transformaciones morfológicas encontradas en células epiteliales de origen bronquial humano (16HBE) por el Cd, están relacionadas con un incremento en la expresión del factor de iniciación de la traducción eucariótica 3 (eIF3). Un estudio reciente en trabajadores expuestos a Cd, demostró una correlación positiva entre la concentración de Cd en orina y la expresión de los factor eIF3 y factor de elongación 1 δ (eEF-1 δ) (Wei y col. 2012). Estos investigadores sugieren que la sobre-expresión del factor eEF-1 δ en sangre, podría ser usado como un biomarcador mole-

cular de exposición poblacional al Cd. Por otro lado, un estudio en la línea celular K562 derivada de leucemia mieloide humana, señaló que el Cd a concentraciones bajas inhibe la actividad de la DNA topoisomerasa II α por interaccionar con los grupos -SH de la enzima (Wu y col. 2011) y que este efecto fue reducido por el glutatión. Así mismo, el grupo de Nemmiche y col. (2011), indicaron que el daño inducido en el ADN de células Jurkat T derivada de leucemia linfocítica humana, expuestas a Cd está asociado más a la alteración en la homeostasis redox que al contenido de elementos traza intracelular. Recientemente en células epiteliales 16HBE expuestas a Cd, se ha señalado un incremento progresivo en la metilación del ADN con la sobre-expresión de la enzima ADN metiltransferasa y esto podría explicar parcialmente la carcinogénesis inducida por el Cd (Zhou y col 2012). De igual forma, en hígado de rata encontraron que el Cd induce hipermetilación del promotor de la caspasa 8 y un incremento en la proliferación celular. Con esto explican que el silenciamiento de la caspasa 8 por hipermetilación resulta en la ausencia de la expresión de la proteína con ausencia en la muerte celular por apoptosis mediada por receptor y descontrol en el crecimiento celular (Wang y col. 2012).

SEÑALIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES

La exposición al Cd puede alterar varias cascadas de señalización y la expresión de genes. Sin embargo, los mecanismos moleculares que llevan a la desregulación de genes por este metal y las alteraciones celulares que desencadena su toxicidad son poco entendidas. Diversos reportes en la literatura han contribuido a ampliar la lista de genes que responden al Cd; entre ellos los del ciclo celular, respuesta inmune, metabolismo, oncogenes y transportadores (Kawata y col. 2007; Badisa y col. 2008; Yamada y col. 2009; Tokumoto y col. 2011; Wang y col. 2012). Sin embargo, se ha determinado que los genes más expresados son los relacionados con las metalotioneínas (MTs), las proteínas de choque térmico (Hsp) y la apoptosis. Además, se sugiere que la identificación de estos genes puede ser candidata para evaluar el riesgo a la salud por la exposición al metal. Las MTs inicialmente fueron reportadas como proteínas de unión al Cd, comprenden una familia de proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa) compuestas de más de diez isoformas en humanos. Se en-

cuentran subdivididas en 4 grupos: MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV, siendo las isoformas MT-I y MT-II las más distribuidas. Las MTs se caracterizan por tener en su estructura regiones ricas en cisteína, lo que les confiere una alta capacidad de unión a metales pesados como el Cd (Ejnik y col. 2010) y protección contra el daño oxidativo. En diversos tipos celulares se ha demostrado que el Cd induce la expresión de la MT-I (Urani y col. 2007; Nzengue y col. 2009; Banni y col. 2010) y de su mRNA por RT-PCR (Mukhopadhyay y col. 2009; Zhang y col. 2012), la cual está asociada con un mecanismo de resistencia (Honda y col. 2010). La expresión de la MT, puede estar regulada en parte por el factor de transcripción-1 que responde a metales (MTF-1). Estudios indican que el MTF-1 puede ser fosforilado por la proteína cinasa C (PKC) o por la cinasa c-Jun N-terminal (Jnk), sin embargo el uso de los inhibidores de estas cinasas no afectan la unión del MTF-1 al promotor de la MT inducido por el Cd (Jiang y col. 2004). Ellos sugieren que en esta regulación pueden estar involucradas múltiples cascadas de señalización que pueden estar cambiando los estados de fosforilación del MTF-1. Por otro lado, Li y col. (2008), demostraron por co-inmunoprecipitación la formación de un complejo multiproteico formado por el MTF-1, la histona acetiltransferasa p300/CBP y el factor de transcripción Sp1 en respuesta al Zn o Cd. Estos autores mencionan que al silenciar p300 con siRNA y por mutagénesis en el dominio de transactivación del MTF-1, la transcripción del gen de MT-1 disminuye. Por otra parte, el grupo de Okumura y col. 2011, propone que el mecanismo por el cual el MTF-1 regula la transcripción del gen de la MT involucra una rápida exclusión del nucleosoma del promotor de la MT en respuesta al Zn. Recientemente, el grupo de Zhang y col. (2012), determinaron que el Cd induce un incremento en los niveles de Zn en hígado y riñón que se correlaciona con la expresión del ARNm y la síntesis de la MT, dándole al Zn un papel positivo. El Zn interacciona con el factor de transcripción MTF-1 formando un complejo que se une a elementos ARE en la región promotora del gen de la MT para inducir su expresión. Además, estudios recientes sugieren que la fosfatasa y tensina homólogo (PTEN), regula la actividad transcripcional del factor MTF-1, ya que una disminución en el contenido de la PTEN, reduce la expresión de la MT y promueve la sensibilidad a

la toxicidad del Cd (Lin y col. 2012). Otra de las proteínas que se inducen en respuesta a la exposición de Cd es la Hsp70 (Urani y col. 2007; Cardin y col. 2009; Selim y col. 2012) que se activa rápidamente en respuesta al estrés y tiene gran importancia en la protección y tolerancia al Cd. Como molécula chaperona, la Hsp70 tiene la capacidad para unirse a proteínas en proceso de desnaturalización y así prevenir su degradación. Estudios realizados en células de hepatoma humano (HepG2) (Souza y col. 2004b) y fibroblastos de ratón (NIH3T3) (Ridley y col. 2010), indicaron que el Cd aumenta la producción de Hsp70 de manera dependiente del tiempo de exposición y de la dosis (Valbonesi y col. 2008; Gerspacher y col. 2009) y que las cinasas Erk 1/2 y Jnk están involucradas (Nishitai y Matsuoka 2008; Escobar y col. 2009), confiriéndole protección celular contra el daño por el metal. Además, señalaron una represión en la expresión de la Hsp70 inducidos por el Cd en células transfectadas con el siRNA para las cinasa Jnk, p38 y Erk 1/2 (Nishitai y Matsuoka 2008). Así, se asume que el patrón de expresión para la Hsp70 fue diferente y la inducción de esta chaperona puede ser considerada como una respuesta adaptativa inducida por el Cd, permitiendo a las células realizar sus funciones esenciales para sobrevivir. La producción de la proteína Hsp70 es regulada por el factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF-1) que se une a elementos de choque térmico (HSE) localizados en el promotor de la Hsp70. El HSF-1 se encuentra como un monómero inactivo y se activa por fosforilación en parte por las MAPK, en respuesta al estrés inducido por la acumulación de proteínas dañadas. La activación de estas MAPK (Erk 1/2, p38, Jnk) requiere de mecanismos de fosforilación por las cinasas MEK, MKK o SEK. Así, la cinasa Erk 1/2 es fosforilada por las MEK1 y MEK2, la p38 por MKK3 y MKK6, y la Jnk por SEK1 (conocida como MKK4 y MKK7). En base a estas consideraciones, en células de origen embrionario (ES) de ratón, fueron silenciados los genes para las cinasa SEK1 y MKK7 y expuestas a Cd (Nishitai y Matsuoka 2008). Se encontró disminuida la fosforilación del factor HSF-1 sólo cuando las células ES fueron silenciadas para SEK1. Estos resultados sugieren que la cinasa SEK1 puede activar, mientras que la cinasa MKK7 puede suprimir la actividad transcripcional de la proteína Hsp70, a través de la regulación de la fosforilación del

factor HSF-1. La hsp70 también puede ser regulada por otros factores de transcripción como AP-1 o el Stat-3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3). Esto fue demostrado en células HepG2 que fueron pretratadas con el péptido inhibidor para el Stat-3, indicando una disminución en la producción de la proteína Hsp70 inducida por el Cd (Souza y col. 2009). Diversos estudios, han demostrado que el Cd induce la activación de AP-1, Stat-3 y que son regulados por las MAPK. En células HepG2 expuestas a Cd, se ha reportado que la activación de AP-1 es dependiente de la dosis y sensible al estrés oxidante (Souza y col. 2004b). Esta activación puede ser mediada por las MAPK (Hsiao y Stapleton 2004; Escobar y col. 2009) o por cambios a nivel transcripcional de los miembros de la familia Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) inducidos por el Cd (Iwatsuki y col. 2011). En células HK-2 de origen renal expuestas a Cd se encontró un incremento progresivo en la proteína c-fos y no en su RNAm, sugiriendo una posible estabilidad en la fosforilación de c-fos. Además, las cinasas Erk 1/2 y p38 pueden estar involucradas en la regulación de la expresión de c-fos y en la fosforilación de la proteína c-Fos (Iwatsuki y col. 2011). Se han identificado seis proteínas de la familia de los Stat; Stat-1, Stat-2, Stat-3, Stat-4, Stat-5a, Stat-5b, Stat6 que son activados en respuesta a varias citocinas, factores de crecimiento y estresores como el Cd. Estudios en células epiteliales de riñón (LLC-PK1) y en HepG2, indicaron que la activación de Stat3 es dependiente del tiempo de exposición, de la dosis (Nakagawa y col. 2007) y que es sensible a las ERO procedente de la NADPH oxidasa activada por Cd (Souza y col. 2009). Los Stat son fosforilados en residuos de tirosina por las cinasas Jak (Janus cinasa) o en serina por las MAPK para una máxima actividad transcripcional. Se ha determinado que la cinasa p38 fosforila al factor Stat-3 inducido por el Cd en células LLC-PK1 (Nakagawa y col. 2007) y en células HepG2 fue mediada por la Erk 1/2 (Souza y col. 2009). Asimismo, diversos estudios, han demostrado que la activación de las MAPK por el Cd, es dependiente del tiempo de exposición (Valbonesi y col. 2009; Iwatsuki y col. 2011), de la dosis (Leal y col. 2007) y que es sensible a las ERO generadas por la NADPH oxidasa (Souza y col. 2009). Sin embargo, el tiempo en que permanecen activadas las MAPK, parece ser importante para la respuesta celular ya sea

proliferación, diferenciación o muerte celular. Estudios en cultivo de células de pulmón de rata tratadas con Cd, encontraron un incremento en la activación de Erk 1/2, p38 y Jnk, sin embargo la prolongada activación de p38 parece estar involucrada en el proceso de apoptosis ya que sólo el inhibidor de p38 disminuyó parcialmente la apoptosis inducida por el Cd (Lag y col. 2005). La apoptosis inducida por Cd, involucra vías intrínsecas y extrínsecas. La vía intrínseca es mediada por señales de estrés celular (daño al ADN) con la activación de la caspasa-9 y la extrínseca implica la activación de receptores de muerte Fas con la activación de la caspasa-8. La caspasa-8 y 9 activan a la caspasa efectora 3 y 7, que participan en la muerte celular. Por lo tanto, la generación de ERO, la alteración del potencial de membrana mitocondrial y la activación de la caspasa-9, representan los principales elementos de la vía apoptótica mitocondrial. Estudios demuestran que el Cd induce apoptosis vía caspasas (Pham y col. 2006; Lasfer y col. 2008; Lawal y Ellis 2011; Brama y col. 2012). El estudio de Pham y col. (2006), reveló un incremento en la actividad de la caspasa 9 y 3 dependiente del tiempo y la concentración de Cd, así como del factor inductor de apoptosis (AIF) en hepatocitos de rata. Ellos sugieren que la apoptosis inducida por el Cd involucra un evento primario dependiente de la mitocondria pero no necesariamente por las caspasas. Asimismo, el grupo de Kim y Soh (2009), indicaron que el Cd induce la translocación de AIF desde la mitocondria al núcleo y que las ERO son las responsables de este evento en células de testículo de rata. Se ha determinado la participación de la fosfolipasa C (PLC) y de las MAPK en la activación de las caspasas inducidas por el Cd. Esto fue demostrado en células HEK 293 tratadas con Cd, encontrando un incremento tanto en el contenido de Ca como en la actividad de la calpaína y en la activación de la caspasa 3, los cuales fueron inhibidos cuando usaron el inhibidor de PLC (U73122). Estos resultados indican que la vía de señalización mediada por la PLC está involucrada en la apoptosis inducida por Cd (Lawal y Ellis 2011). Se conoce que la vía de señalización mediada por la cinasa Erk 1/2 está implicada en procesos de proliferación celular, sin embargo hay estudios que proponen la activación de esta cinasa con procesos de apoptosis. Esto fue apoyado por los estudios realizados por Chen y col. (2008)

en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), en los cuales la inhibición de las cinasa Erk 1/2 y Jnk pero no de p38, previene parcialmente la apoptosis inducida por el Cd. Por otro lado, estudios realizados en osteoblastos que fueron pre-tratados con el inhibidor de la cinasa Erk 1/2 (PD98058), señalan una disminución en la apoptosis inducida por el Cd (Arbon y col. 2011). Se ha reportado que varios metales pesados incluyendo al Cd pueden activar la vía de señalización de la cinasa serina/treonina mTOR provocando la muerte por apoptosis. Los estudios del grupo de Chen y col. (2008), indicaron que el Cd induce la fosforilación de la cinasa serina/treonina mTOR y de sus efectores. Además, con el inhibidor de mTOR (rapamicina), se encontró disminuida tanto la fosforilación de la cinasa S6K1 como del factor de iniciación eucariótico de unión a proteína 1 (4E-BP1) con una inhibición parcial de escisión de la caspasa 3. Esto indica que la señalización por las MAPK y del mTOR está asociada a la apoptosis inducida por el Cd (Chen y col. 2008). Sin embargo, no es bien conocido el mecanismo mediante el cual los metales activan a mTOR, pero se propone que el Cd induce la generación de ERO que contribuyen a la activación de la señalización por mTOR, lo que fue evaluado por el antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) (Chen y col. 2011). Además, el mismo grupo determinó que el Cd induce la generación de ERO vía la NADPH oxidasa, que podría estar participando en la activación de mTOR, llevando a la muerte celular, en parte por la activación de la cinasa IP3K y por la inhibición de la fosfatasa PTEN. En células hepáticas (Xie y col. 2010) y neuronales (Xu y col. 2011), se demostró que el Cd eleva los niveles de calcio intracelular $[Ca^{+2}]_i$, induciendo apoptosis por la activación de las MAPK y la cinasa mTOR a través de la fosforilación de la proteína cinasa II dependiente de calmodulina /calcio (CaMKII) (Chen y col. 2011) ya que al silenciar la proteína CaMKII, disminuye la activación de la vía MAPK/mTOR y la muerte celular. Por otro lado, el Cd induce apoptosis a través de la activación p53. En células JB6 de origen epidérmico de ratón, el Cd incrementó la expresión de p53 dependiente de la concentración. Además, al transfectar las células JB6 con el siRNA para la cinasa Jnk1 o Jnk2, la expresión de p53 disminuyó más con Jnk2 que con Jnk1, así como también la toxicidad inducida por el Cd (Son y col. 2010). Recientemente, en células epiteliales

de próstata tratadas con Cd, se relacionó la inhibición en la proliferación celular con la acumulación de p53. Además, el silenciamiento de p53 mediante el siRNA, señaló que el Cd induce apoptosis y se sugiere que una mutación en p53, podría contribuir a la resistencia inducida por Cd en la carcinogénesis (Aimola y col. 2012). Se ha asociado la apoptosis inducida por el Cd vía estrés del RE (Yokouchi y col. 2008). En células H4-II-E-C3 derivadas de hepatoma de rata, se estudiaron los cambios transcripcionales mediante análisis de microarreglos, encontrando alterados los genes relacionados al estrés del RE y la apoptosis por el Cd (Permenter y col. 2011). El RE tiene un papel muy importante en el plegamiento y transporte de las proteínas, así como en la regulación de Ca intracelular. Sin embargo, si las funciones del RE son severamente dañadas, las células son removidas. El estrés del ER, es definido como la acumulación de proteínas mal plegadas y la respuesta celular a este fenómeno se denomina "respuesta a proteínas mal plegadas" (UPR) que tiene la función de transmitir la información obtenida a través de los sensores de estrés al núcleo. Esto provoca una disminución en la carga proteica que entra al retículo, así como un aumento en la capacidad del retículo para manejar las proteínas mal plegadas y por último si la homeostasis no puede ser restablecida, activar la maquinaria de muerte celular. Tres sensores de estrés del ER se han identificado en la membrana del RE; una cinasa dependiente de ARN ligada al RE (PERK), el activador del factor de transcripción 6 (ATF-6) y la proteína reclutadora de inositol 1 (IRE1). La apoptosis se puede dar por la activación de la vía IRE1 y ATF6 que promueven la expresión del factor de transcripción Chop (proteína homóloga a C/EBP). El factor Chop, la cinasa Jnk y las caspasas han sido involucradas en la activación de la apoptosis, ya que Chop disminuye la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl2. Estudios con células NIH 3T3, encontraron que el Cd provoca muerte celular vía la activación de la caspasa-12 (Biagiolo y col. 2008). Mientras que en células LLC-PK1, el proceso de apoptosis provocado por el Cd fue sugerido por el factor Chop vía el ATF6 y por la activación de la cinasa Jnk vía la IRE1 (Yokouchi y col. 2008). Un estudio reciente, relaciona al estrés del RE con la señalización mitocondrial en la apoptosis inducida por el Cd. En él se ha descrito que el Cd incrementa la fosforilación del factor de

iniciación de la traducción eucariótica 2α (eIF2 α) y la expresión del factor Chop, indicando que la vía PERK es activada por el metal. Asimismo, se indica que Chop promueve la translocación de Bax del citosol a la mitocondria provocando la liberación del citocromo c inducido por el Cd (Ji y col. 2011). Sin embargo, dependiendo de la concentración de Cd, la célula puede desarrollar respuestas de adaptación a la apoptosis inducida por el metal. Esto se evaluó en las células de linfoma humano (U937) que fueron expuestas a dosis bajas de Cd (Cui y col. 2011). Estos autores sugirieron, que el mecanismo molecular involucrado en la respuesta adaptativa, es una inhibición tanto en la generación intracelular de ERO como en la activación de la cinasa Jnk, así como una modulación en el balance entre la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Mcl-1 y pro-apoptóticas como Bim. (Figura 1).

RESPUESTA ANTIOXIDANTE

Las células cuentan con una variedad de antioxidantes endógenos de tipo enzimático y no enzimático para controlar las ERO generadas durante el estrés oxidativo. Entre los antioxidantes no enzimáticos tenemos al ácido ascórbico (vitamina C), el α -tocoferol (vitamina E), la albúmina, la MT, el GSH, por mencionar algunos. El de mayor relevancia y abundancia en la célula es el GSH que mantiene el estado de óxido reducción y es cofactor de enzimas antioxidantes como la GPX, GR, GST. El GSH es considerado como un antioxidante importante, debido a que ayuda a mantener los grupos -SH de las proteínas en estado reducido y también ayuda a remover peróxidos tóxicos. En cultivo de hepatocitos tratados con piridoxina (vit. B6), encontraron incrementado el contenido de GSH y disminuida la lipoperoxidación. Asimismo, las enzimas antioxi-

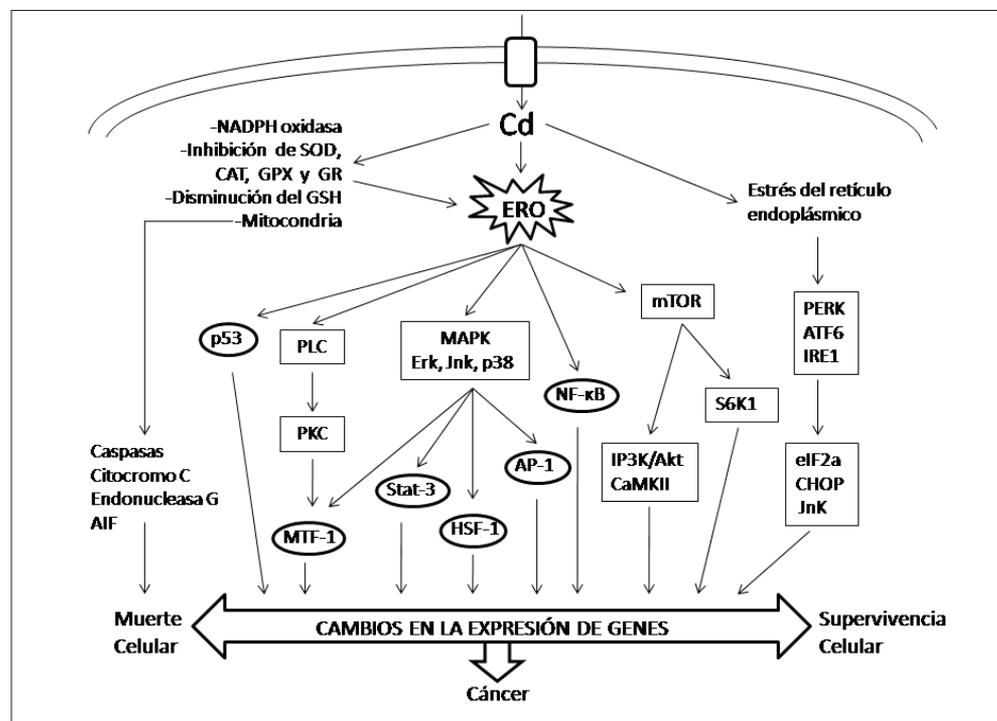


Figura 1. Efecto del cadmio en la señalización y expresión de genes. El Cd propicia la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) vía la mitocondria o la NADPH oxidasa, pero también por la inhibición de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), la glutatión reductasa (GR) o por la disminución en el contenido de glutatión (GSH). El Cd activa diferentes cascadas de señalización que son sensibles a las ERO como la fosfolipasa C (PLC), la proteína cinasa C (PKC), las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), cinasa serina/treonina mTOR, cinasa S6K1, cinasa II dependiente de calmodulina /calcio (CaMKII), cinasa dependiente de ARN ligada al RE (PERK), proteína reclutadora de inositol 1 (IRE1) y la cinasa trifosfato inositol/proteína cinasa B (PI3K/Akt). El daño en la mitocondria, así como el estrés del retículo endoplásmico y las cascadas de señalización, favorecen la activación de diversos factores de transcripción como el factor de transcripción-1 que responde a metales (MTF-1), factor de transcripción de choque térmico-1 (HSF-1), transductor de señal y activador de la transcripción-3 (Stat-3), proteína activadora-1 (AP-1), factor nuclear- κ B (NF- κ B), activador del factor de transcripción 6 (ATF-6), factor de transcripción Chop (proteína homóloga a C/EBP), factor de iniciación de la traducción eucariótica 2α (eIF2 α), factor inductor de apoptosis (AIF) y p53 que inducen la transcripción de genes blanco que participan en varios procesos celulares tales como supervivencia, protección, cáncer o muerte celular.

dantes se recuperaron a niveles control (Wen y col. 2010). Estudios previos demuestran que las enzimas antioxidantes como la SOD, CAT, GPX, GR y GST son determinantes en la respuesta celular al estrés oxidativo y protegen a las células de la apoptosis inducida por el Cd. En células HEK293 que sobre-expresan GST, se demostró una inhibición en la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, en la liberación del citocromo c y en la activación de la caspasa 3, suprimiendo la apoptosis vía las MAPK inducida por Cd (Zhang y col. 2010). Estudios con α -tocoferol, han demostrado que colabora contra el estrés oxidante (Kara y col. 2008) y que revierte la alteración metabólica de los lípidos provocada por el Cd (Prabu y col. 2010). De igual forma se ha propuesto que el Se y el Zn pueden actuar como antioxidantes y proteger del daño inducido por el Cd. En células estelares de origen hepático (CFSC-2G) (Souza y col. 2004a), el Zn disminuyó la toxicidad inducida por el Cd por incrementar tanto el contenido de GSH como del gen de la MT y disminuir la lipoperoxidación. Por otro lado, en ratas tratadas con Se, se mantuvieron estables los niveles de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos mono y poli-insaturados alterados por el Cd (Newairy y col. 2007) y con el Zn se restauraron los niveles de GSH/GSSG y de las enzimas antioxidantes SOD, GPX (Jihen y col. 2011). Recientemente, el grupo de Galazyn y col. (2012), sugirió una correlación positiva entre la actividad de la GPX, la concentración de Se y el índice de lipoperoxidación. De igual forma, se le ha asignado al magnesio (Mg) un papel protector, especialmente en los parámetros de estrés oxidativo. La administración de Mg provocó una disminución tanto en el contenido de Cd como en los niveles de ERO y del MDA. Asimismo, la actividad de la SOD se restableció en hígado de rata, lo que podría explicar su efecto positivo (Matović y col. 2012). Por otro lado, el NAC puede bloquear la apoptosis dependiente de caspasas, por inhibir la generación de ERO generado por el Cd (Oh y Lim 2006) y por incrementar significativamente la viabilidad celular, los niveles de las enzimas CAT, GPX, GR en células hepáticas (Liu y col. 2011; Odewumi y col. 2011). Se le ha dado un papel neuroprotector a la melatonina porque disminuye los niveles de marcadores de estrés oxidativo como la lipoperoxidación y la carbonilación de proteínas inducidas por el Cd en cerebro de rata y también incrementa la

actividad de la acetilcolinesterasa (Shagirtha y col. 2011). Por otro lado, la dexametasona, una hormona que tiene varios efectos farmacológicos, incluyendo anti-inflamatorios, disminuye la formación de ERO. En cultivo de hepatocitos, la dexametasona previene el daño oxidativo a las membranas y evita cambios en el cociente GSH/GSSH inducido por el Cd (Ferrigno y col. 2010). Recientemente, el grupo de Rennolds y col. (2012), demostró que la curcumina, un antioxidante natural puede tener un efecto anti-inflamatorio, disminuyendo la secreción de la IL-6 por la vía del factor NF- κ B y la secreción de la IL-8 por la cinasa Erk 1/2 inducido por el Cd en células epiteliales. Recientemente, el grupo de Komoike y col. (2012), determinó que el salubrinal suprime el daño y la muerte por apoptosis inducida por Cd en células HK-2 de origen renal humano. Estos autores señalan que el salubrinal inhibe la desfosforilación tanto del factor eIF2 α , como de las cinasas Jnk, p38 y además disminuye la activación de la caspasa 3 y de la polimerasa. Aunque, no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de los antioxidantes, éstos pueden prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico y en algunos casos revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas.

CONCLUSIÓN

El Cd es un metal altamente tóxico, por lo tanto es considerado como un contaminante ambiental muy peligroso, porque es utilizado en la manufactura de productos como pilas, pinturas, fertilizantes, galvanizado de tubos, cerámica entre otros. El Cd afecta diferentes tejidos y órganos como el hígado, riñón, pulmón, testículos y hueso. Puesto que estos efectos traen como consecuencia un problema muy grave a nivel de salud, se ha tratado de proponer estrategias para evitar la contaminación por este metal a nivel mundial. Sin embargo, el organismo puede activar diferentes cascadas de señalización que están relacionadas con respuestas de adaptación y sobrevivencia ante la presencia del metal, mecanismos que dependen tanto del tipo celular como de las condiciones de exposición.

Agradecimientos: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Aimola P., Carmignani M., Volpe AR., Di Benedetto A., Claudio L., Waalkes M.P., van Bokhoven A., Tokar E.J., Claudio P.P. Cad-

mium Induces p53-Dependent Apoptosis in Human Prostate Epithelial Cells. PLoS One. 2012;7(3):e33647.

Akesson A., Julin B., Wolk A. Long-term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: a population-based prospective cohort study. Cancer Res. 2008;68:6435-6441.

Arbon K.S., Christensen C.M., Harvey W.A., Heggland S.J. Cadmium exposure activates the ERK signaling pathway leading to altered osteoblast gene expression and apoptotic death in Saos-2 cells. Food Chem Toxicol. 2011;50:198-205.

Agency for toxic substance and disease registry (ATSDR). U.S. Toxicological profile for cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta. 2007.

Badisa V.L., Latinwo L.M., Odewumi C.O., Ikediobi C.O., Badisa R.B., Brooks-Walter A., Lambert A.T., Nwoga J. Cytotoxicity and stress gene microarray analysis in cadmium-exposed CRL-1439 normal rat liver cells. Int J Mol Med. 2008;22:213-219.

Bakshi S., Zhang X., Godoy-Tundidor S., Cheng R.Y., Sartor M.A., Medvedovic M., Ho S.M. Transcriptome analyses in normal prostate epithelial cells exposed to low-dose cadmium: oncogenic and immunomodulations involving the action of tumor necrosis factor. Environ Health Perspect. 2008;116(6):769-76.

Banni M., Messaoudi I., Said L., El Heni J., Kerkeni A., Said K. Metallothionein gene expression in liver of rats exposed to cadmium and supplemented with zinc and selenium. Arch Environ Contam Toxicol. 2010;59(3):513-519.

Belyaeva E.A., Dymkowska D., Wieckowski M.R., Wojtczak L. Mitochondria as an important target in heavy metal toxicity in rat hepatoma AS-30D cells. Toxicol Appl Pharmacol. 2008;231:34-42.

Belyaeva E.A., Glazunov V.V., Korotkov S.M. Cd²⁺ versus Ca²⁺-produced mitochondrial membrane permeabilization: a proposed direct participation of respiratory complexes I and III. Chem Biol Interact. 2004;150(3):253-70.

Biagioli M., Pifferi S., Ragghianti M., Bucci S., Rizzuto R., Pinton P. Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis. Cell Calcium. 2008; 43:184-195.

Brama M., Politi L., Santini P., Migliaccio S., Scandurra R. Cadmium-induced apoptosis and necrosis in human osteoblasts: role of caspases and mitogen-activated protein kinases pathways. J Endocrinol Invest. 2012;35(2):198-208.

Cardin G.B., Mantha M., Jumarie C. Resistance to cadmium as a function of Caco-2 cell differentiation: role of reactive oxygen species in cadmium- but not zinc-induced adaptation mechanisms. Biometals. 2009;22:752-769.

Carrière P., Mantha M., Champagne-Paradis S., Jumarie C. Characterization of basolateral-to-apical transepithelial transport of cadmium in intestinal TC7 cell monolayers. Biometals. 2011;24(5):857-74.

Chen L., Liu L., Luo Y., Huang S. MAPK and mTOR pathways are involved in cadmium-induced neuronal apoptosis. J Neurochem. 2008;105:251-261.

Chen L., Xu B., Liu L., Luo Y., Zhou H., Chen W., Shen T., Han X., Kontos C.D., Huang S. Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. Free Radic Biol Med. 2011;50:624-32.

Chen S., Xu Y., Xu B., Guo M., Zhang Z., Liu L., Ma H., Chen Z., Luo Y., Huang S., Chen L. CaMKII is involved in cadmium activation of MAPK and mTOR pathways leading to neuronal cell death. J Neurochem. 2011;119(5):1108-18.

Chen X., Zhu G., Gu S., Jin T., Shao C. Effects of cadmium on osteoblasts and osteoclasts *in vitro*. Environ Toxicol Pharmacol. 2009;28(2):232-6.

Chen X., Zhu G., Jin T., Lei L., Liang Y. Bone mineral density is related with previous renal dysfunction caused by cadmium exposure. Environ Toxicol Pharmacol. 2011;32(1):46-53.

Cormet-Boyaka E., Jolivette K., Bonnégarde A., Rennolds J., Hassan F., Mehta P., Tridanda-

pani S., Webster-Marketon J., Boyaka P.N. An NF- κ B-independent and Erk1/2-dependent mechanism controls CXCL8/IL-8 responses of airway epithelial cells to cadmium. *Toxicol Sci.* 2012;125(2):418-29.

Cui Z.G., Ogawa R., Piao J.L., Hamazaki K., Feril L.B., Shimomura A., Kondo T., Inadera H. Molecular mechanisms involved in the adaptive response to cadmium-induced apoptosis in human myelomonocytic lymphoma U937 cells. *Toxicol In vitro.* 2011;25(8):1687-93.

Dorta D.J., Leite S., DeMarco K.C., Prado I.M., Rodrigues T., Mingatto F.E., Uyemura S.A., Santos A.C., Curti C. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *J Inorg Biochem.* 2003;97:251-257.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on cadmium in food. *EFSA J.* 2009;980:1-139.

Ejnik J., Shaw C.F., Petering D.H. Mechanism of cadmium ion substitution in mammalian zinc metallothionein and metallothionein alpha domain: kinetic and structural studies. *Inorg Chem.* 2010;49(14):6525-34.

Escobar M del C., Souza V., Bucio L., Hernández E., Gómez-Quiroz L.E., Gutiérrez Ruiz M.C. MAPK activation is involved in cadmium-induced Hsp70 expression in HepG2 cells. *Toxicol Mech Methods.* 2009;19(8):503-9.

Farkas A., Erratico C., Viganó L. Assessment of the environmental significance of heavy metal pollution in surficial sediments of the River Po. *Chemosphere.* 2007;68:761-768.

Ferrigno A., Gregotti C., Richelmi P., Vairetti M. Dexamethasone protects cultured rat hepatocytes against cadmium toxicity: involvement of cellular thiols. *In vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010;46(5):445-9.

Fotakis G., Timbrell J. Role of trace elements in cadmium chloride uptake in hepatoma cell lines. *Toxicol Lett.* 2006;164(2):97-103.

Freitas M., Fernandes E. Zinc, cadmium and nickel increase the activation of NF- κ B and the release of cytokines from THP-1 monocytic

cells. *Metallomics.* 2011;3(11):1238-43.

Fujishiro H., Doi M., Enomoto S., Himeno S. High sensitivity of RBL-2H3 cells to cadmium and manganese: an implication of the role of ZIP8. *Metallomics.* 2011;3(7):710-718.

Galażyn-Sidorczuk M., Brzóska M.M., Rogalska J., Roszczenko A., Jurczuk M. Effect of zinc supplementation on glutathione peroxidase activity and selenium concentration in the serum, liver and kidney of rats chronically exposed to cadmium. *J Trace Elem Med Biol.* 2012;26(1):46-52.

Gerspacher C., Scheuber U., Schiera G., Proia P., Gygax D., Di Liegro I. The effect of cadmium on brain cells in culture. *Int J Mol Med.* 2009;24(3):311-8.

Haase H., Ober-Blöbaum J.L., Engelhardt G., Hebel S., Rink L. Cadmium ions induce monocytic production of tumor necrosis factor-alpha by inhibiting mitogen activated protein kinase dephosphorylation. *Toxicol Lett.* 2010;198(2):152-8.

Haldsrud R., Krøkje A. Induction of DNA double-strand breaks in the H4IIE cell line exposed to environmentally relevant concentrations of copper, cadmium, and zinc, singly and in combinations. *J Toxicol Environ Health.* 2009;72(3-4):155-63.

Honda A., Komuro H., Hasegawa T., Seko Y., Shimada A., Nagase H., Hozumi I., Inuzuka T., Hara H., Fujiwara Y., Satoh M. Resistance of metallothionein-III null mice to cadmium-induced acute hepatotoxicity. *J Toxicol Sci.* 2010;35(2):209-15.

Hsiao C.J., Stapleton S.R. Characterization of Cd-induced molecular events prior to cellular damage in primary rat hepatocytes in culture: activation of the stress activated signal protein JNK and transcription factor AP-1. *J Biochem Mol Toxicol.* 2004;18(3):133-42.

Huang Y.H., Shih C.M., Huang C.J., Lin C.M., Chou C.M., Tsai M.L., Liu T.P., Chiu J.F., Chen C.T. Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu,Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *J Cell Biochem.* 2006;98(3):577-89.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Cadmium and cadmium compounds evaluation. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Scientific Publications, Lyon. 1993;58:119.

Ikediyobi C.O., Badisa V.L., Ayuk-Takem L.T., Latinwo L.M., West J. Response of antioxidant enzymes and redox metabolites to cadmium-induced oxidative stress in CRL-1439 normal rat liver cells. *Int J Mol Med*. 2004;14(1):87-92.

Iwatsuki M., Inageda K., Matsuoka M. Cadmium induces phosphorylation and stabilization of c-Fos in HK-2 renal proximal tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;251(3):209-16.

Ji Y.L., Wang H., Zhao X.F., Wang Q., Zhang C., Zhang Y., Zhao M., Chen Y.H., Meng X.H., Xu D.X. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mitochondrial pathway mediates cadmium-induced germ cell apoptosis in testes. *Toxicol Sci*. 2011;124(2):446-59.

Jiang H., Fu K., Andrews G.K. Gene- and cell-type-specific effects of signal transduction cascades on metal-regulated gene transcription appear to be independent of changes in the phosphorylation of metal-response-element-binding transcription factor-1. *Biochem J*. 2004;382:33-41.

Jihen el H., Sonia S., Fatima H., Mohamed Tahar S., Abdelhamid K. Interrelationships between cadmium, zinc and antioxidants in the liver of the rat exposed orally to relatively high doses of cadmium and zinc. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2011;74(7):2099-104.

Kara H., Cevik A., Konar V., Dayangac A., Servi K. Effects of selenium with vitamin E and melatonin on cadmium-induced oxidative damage in rat liver and kidneys. *Biol Trace Elem Res*. 2008;125(3):236-44.

Kataranovski M., Mirkov I., Belij S., Nikolic M., Zolotarevski L., Ciric D., Kataranovski D. Lungs: remote inflammatory target of systemic cadmium administration in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009;28(2):225-31.

Kawata K., Yokoo H., Shimazaki R., Okabe S. Classification of heavy metal toxicity by human DNA microarray analysis. *Environ. Sci. Technol*. 2007;41:3769.

Kim J., Soh J. Cadmium-induced apoptosis is mediated by the translocation of AIF to the nucleus in rat testes. *Toxicol Lett*. 2009;188(1):45-51.

Komoike Y., Inamura H., Matsuoka M. Effects of salubrinal on cadmium-induced apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells. *Arch Toxicol*. 2012;86(1):37-44.

Kundu S., Sengupta S., Bhattacharyya A. EGFR upregulates inflammatory and proliferative responses in human lung adenocarcinoma cell line (A549), induced by lower dose of cadmium chloride. *Inhal Toxicol*. 2011;23(6):339-48.

L'Azou B, Dubus I, Ohayon-Courtès C, Cambar J. Human glomerular mesangial IP15 cell line as a suitable model for *in vitro* cadmium cytotoxicity studies. *Cell Biol Toxicol*. 2007;23(4):267-78.

Lag M., Refsnes M., Lilleaas E.M., Holme J.A., Becher R., Schwarze P.E. Role of mitogen activated protein kinases and protein kinase C in cadmium-induced apoptosis of primary epithelial lung cells. *Toxicology*. 2005;211:253-264.

Lag M., Rodionov D., Ovreivik J., Bakke O., Schwarze P.E., Refsnes M. Cadmium-induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity: Expression and release of cytokines in fibroblasts, epithelial cells and macrophages. *Toxicol Lett*. 2010;193(3):252-60.

Lasfer M., Vadrot N., Aoudjehane L., Conti F., Binguier A.F., Feldmann G., Reyl-Desmars F. Cadmium induces mitochondria-dependent apoptosis of normal human hepatocytes. *Cell Biol Toxicol*. 2008;24(1):55-62.

Lawal A.O., Ellis E.M. Phospholipase C Mediates Cadmium-Dependent Apoptosis in HEK 293 Cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;110(6):510-7.

Leal R.B., Posser T., Rigon A.P., Oliveira C.S., Goncalves C.A., Gelain D.P., Dunkley P.R. Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology*. 2007;234(1-2):34-43.

Lei Y.X., Wei L., Wang M., Wu G.R., Li M. Malignant transformation and abnormal expres-

sion of eukaryotic initiation factor in bronchial epithelial cells induced by cadmium chloride. *Biomed Environ Sci.* 2008;21(4):332-8.

Li G.Y., Kim M., Kim J.H., Lee M.O., Chung J.H., Lee B.H. Gene expression profiling in human lung fibroblast following cadmium exposure. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:1131.

Lin M.C., Liu Y.C., Tam M.F., Lu Y.J., Hsieh Y.T., Lin L.Y. PTEN interacts with metal-responsive transcription factor 1 and stimulates its transcriptional activity. *Biochem J.* 2012;441(1):367-77.

Liu J., Qu W., Kadiiska M.B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;238:209-214.

Liu T., He W., Yan C., Qi Y., Zhang Y. Roles of reactive oxygen species and mitochondria in cadmium-induced injury of liver cells. *Toxicol Ind Health.* 2011;27(3):249-56.

Liu Z., Yu X., Shaikh Z.A. Rapid activation of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells by cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;228:286-294.

Luparello C., Longo A., Vetrano M. Exposure to cadmium chloride influences astrocyte-elevated gene-1 (AEG-1) expression in MDA-MB231 human breast cancer cells. *Biochimie.* 2012;94(1):207-13.

Mantha M., El Idrissi L., Leclerc-Beaulieu T., Jumarie C. Fe- and Zn-induced inhibition of Cd uptake in human lung cell lines: Speciation studies with H441 and A549 cells. *Toxicol In vitro.* 2011;25(8):1701-1711.

Mao W.P., Zhang N.N., Zhou F.Y., Li W.X., Liu H.Y., Feng J., Zhou L., Wei C.J., Pan Y.B., He Z.J. Cadmium directly induced mitochondrial dysfunction of human embryonic kidney cells. *Hum Exp Toxicol.* 2011;30(8):920-9.

Matović V., Buha A., Bulat Z., Dukić-Ćosić D., Miljković M., Ivanišević J., Kotur-Stevuljević J. Route-dependent effects of cadmium/cadmium and magnesium acute treatment on parameters of oxidative stress in rat liver. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(3-4):552-557.

Mortensen M.E., Wong L.Y., Osterloh J.D. Smoking status and urine cadmium above levels associated with subclinical renal effects in U.S. adults without chronic kidney disease. *Int J Hyg Environ Health.* 2011;214(4):305-10.

Moulis J.M., Thévenod F. New perspectives in cadmium toxicity: an introduction. *Biometals.* 2010;23(5):763-768.

Mukhopadhyay D., Mitra A., Nandi P., Varghese A.C., Murmu N., Chowdhury R, Chaudhuri K., Bhattacharyya A.K. Expression of metallothionein-1 (MT-1) mRNA in the rat testes and liver after cadmium injection. *Syst Biol Reprod Med.* 2009;55(5-6):188-92.

Nakagawa J., Nishitai G., Inageda K., Matsuoka M. Phosphorylation of Stats at Ser727 in renal proximal tubular epithelial cells exposed to cadmium. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007;24(3):252-9.

Napolitano J.R., Liu M.J., Bao S., Crawford M., Nana-Sinkam P., Cormet-Boyaka E., Knoell D.L. Cadmium-mediated toxicity of lung epithelia is enhanced through NF- κ B transcriptional activation of the human zinc transporter ZIP8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302(9):L909-18 .

Nemmiche S., Chabane-Sari D., Kadri M., Guiraud P. Cadmium chloride-induced oxidative stress and DNA damage in the human Jurkat T cell line is not linked to intracellular trace elements depletion. *Toxicol In vitro.* 2011;25(1):191-198.

Newairy A.A., El-Sharaky A.S., Badr-Deen M.M., Eweda S.M., Sheweita S.A. The hepatoprotective effects of selenium against cadmium toxicity in rats. *Toxicology.* 2007;242(1-3):23-30.

Nishitai G., Matsuoka M. Differential regulation of Hsp70 expression by the JNK kinases SEK1 and MKK7 in mouse embryonic stem cells treated with cadmium. *J Cell Biochem.* 2008;104(5):1771-1780.

Nogué S., Sanz-Gallén P., Torras A., Boluda F. Chronic overexposure to cadmium fumes associated with IgA mesangial glomerulonephritis. *Occup Med.* 2004;54:265-7.

- Nzengue Y., Lefebvre E., Cadet J., Favier A., Rachidi W., Steiman R., Guiraud P. Metallothionein expression in HaCaT and C6 cell lines exposed to cadmium. *J Trace Elem Med Biol.* 2009;23(4):314-23.
- Nzengue Y., Steiman R., Garrel C., Lefebvre E., Guiraud P. Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: role of glutathione in the resistance to cadmium, *Toxicology.* 2008;243:193-206.
- Nzengue Y., Steiman R., Rachidi W., Favier A., Guiraud P. Oxidative Stress Induced by Cadmium in the C6 Cell Line: Role of Copper and Zinc. *Biol Trace Elem Res.* 2012;146(3):410-419.
- Obara A., Kamiya T., Izumi M., Hara H., Yamada H., Adachi T. Extracellular-Superoxide Dismutase expression in COS7 cells exposure to cadmium chloride. *Biol Pharm Bull.* 2011;34(9):1443-1447.
- Odewumi C.O., Badisa V.L., Le U.T., Latinwo L.M., Ikediobi C.O., Badisa R.B., Darling-Reed S.F. Protective effects of N-acetylcysteine against cadmium-induced damage in cultured rat normal liver cells. *Int J Mol Med.* 2011;27(2):243-8.
- Oh S.H., Lim S.C. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;212(3):212-23.
- Okumura F., Li Y., Itoh N., Nakanishi T., Isobe M., Andrews G.K., Kimura T. The zinc-sensing transcription factor MTF-1 mediates zinc-induced epigenetic changes in chromatin of the mouse metallothionein-I promoter. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1809(1):56-62.
- Ololade I.A., Lajide L., Olumekun V.O., Ololade O.O., Ejelonu B.C. Influence of diffuse and chronic metal pollution in water and sediments on edible seafoods within Ondo oil-polluted coastal region, Nigeria. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2011;46(8):898-908.
- Pan J., Plant J.A., Voulvoulis N., Oates, C.J., Ihlenfeld C. Cadmium levels in Europe: implications for human health. *Environ Geochem Health.* 2009;32:1-12.
- Permenter M.G., Lewis J.A., Jackson D.A. Exposure to nickel, chromium, or cadmium causes distinct changes in the gene expression patterns of a rat liver derived cell line. *PLoS One.* 2011;6(11):e27730.
- Pham T.N.D., Marion M., Denizeau F., Jumarie C. Cadmium-induced apoptosis in rat hepatocytes does not necessarily involve caspase-dependent pathways. *Toxicol In vitro.* 2006;20(8):1331-42.
- Prabu S.M., Shagirtha K., Renugadevi J. Amelioration of cadmium-induced oxidative stress, impairment in lipids and plasma lipoproteins by the combined treatment with quercetin and α -tocopherol in rats. *J Food Sci.* 2010;75(7):T132-T140.
- Rennolds J., Malireddy S., Hassan F., Tridandapani S., Parinandi N., Boyaka P.N., Cormet-Boyaka E. Curcumin regulates airway epithelial cell cytokine responses to the pollutant cadmium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417(1):256-261.
- Ridley W., Nishitai G., Matsuoka M. HSP110 expression is induced by cadmium exposure but is dispensable for cell survival of mouse NIH3T3 fibroblasts. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010;29(3):260-5.
- Satarug S., Garrett S.H., Sens M.A., Sens D.A. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ Health Perspect.* 2010;118:182-190.
- Selim M.E., Rashed el H.A., Aleisa N.A., Daghestani M.H. The protection role of heat shock protein 70 (HSP-70) in the testes of cadmium-exposed rats. *Bioinformation.* 2012;8(1):58-64.
- Shagirtha K., Muthumani M., Prabu S.M. Melatonin abrogates cadmium induced oxidative stress related neurotoxicity in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011;15(9):1039-50.
- Son Y.O., Lee J.C., Hitron J.A., Pan J., Zhang Z., Shi X. Cadmium induces intracellular Ca^{2+} - and H_2O_2 -dependent apoptosis through JNK-

and p53-mediated pathways in skin epidermal cell line. *Toxicol Sci.* 2010;113(1):127-37.

Souza V., Escobar M.C., Bucio L., Hernández E., Gómez-Quiroz L.E. Guitiérrez-Ruiz. NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced- Stat3 activation in HepG2 cells. *Toxicol Lett.* 2009;187:180-186.

Souza V., Escobar M.C., Bucio L., Hernández E., Gutiérrez-Ruiz M.C. Zinc pretreatment prevents hepatic stellate cells from cadmium-produced oxidative damage. *Cell Biol Toxicol.* 2004a;20:241-251.

Souza V., Escobar M. C., Gómez-Quiroz L., Bucio L., Hernández E., Chávez Cossio E., Gutiérrez-Ruiz M.C. Acute cadmium exposure enlases AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology.* 2004b;197:213-228.

Soyupek S., Oksay T., Sütçü R., Armağan A., Gökalp O., Perk H., Delibas N. The effect of cadmium toxicity on renal nitric oxide synthase isoenzymes. *Toxicol Ind Health.* 2012;28(7):624-8.

Storelli M.M. Intake of essential minerals and metals via consumption of seafood from the Mediterranean Sea. *J Food Prot.* 2009;72(5):1116-20.

Thijssen S., Cuypers A., Maringwa J., Smeets K., Horemans N., Lambrichts L., Van Kerkhove E. Low cadmium exposure triggers a biphasic oxidative stress response in mice kidneys. *Toxicology.* 2007;236(1-2):29-41.

Tokumoto M., Ohtsu T., Honda A., Fujiwara Y., Nagase H., Satoh M. DNA microarray analysis of normal rat kidney epithelial cells treated with cadmium. *J Toxicol Sci.* 2011;36(1):127-9.

Uenishi R., Gong P., Suzuki K., Koizumi S. Cross talk of heat shock and heavy metal regulatory pathways. *Bioch Biophys Res Commun.* 2006;341:1072-1077.

Urani C., Melchiorretto P., Canevali C., Morazzoni F., Gribaldo L. Metallothionein and hsp70 expression in HepG2 cells after prolonged cadmium exposure. *Toxicol In vitro.* 2007;21(2):314-9.

Valbonesi P., Ricci L., Franzellitti S., Biondi C., Fabbri E. Effects of cadmium on MAPK signalling pathways and HSP70 expression in a human trophoblast cell line. *Placenta.* 2008;29(8):725-33.

Wang B., Li Y., Tan Y., Miao X., Liu X.D., Shao C., Yang X.H., Turdi S., Ma L.J., Ren J., Cai L. Low-Dose Cd Induces Hepatic Gene Hypermethylation, along with the Persistent Reduction of Cell Death and Increase of Cell Proliferation in Rats and Mice. *PLoS One.* 2012;7(3):e33853.

Wei L., Lei Y.X., Wu L., Wang M., Lu Q., He C.C. Alterations in the expression of translation factors as molecular markers in cadmium-exposed workers. *Biomarkers.* 2012;17(1):78-84.

Wen Y.F., Zhao J.Q., Bhadauria M., Nirala S.K. Pyridoxine mitigates cadmium induced hepatic cytotoxicity and oxidative stress. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010;30(2):169-174.

Wolff N.A., Lee W.K., Thévenod F. Role of Arf1 in endosomal trafficking of protein-metal complexes and cadmium-metallothionein-1 toxicity in kidney proximal tubule cells. *Toxicol Lett.* 2011;203(3):210-218.

Wu X., Yalowich J.C., Hasinoff B.B. Cadmium is a catalytic inhibitor of DNA topoisomerase II. *J Inorg Biochem.* 2011;105(6):833-8.

Xie Z., Zhang Y., Li A., Li P., Ji W., Huang D. Cd-induced apoptosis was mediated by the release of Ca²⁺ from intracellular Ca storage. *Toxicol Lett.* 2010;192(2):115-8.

Xu B., Chen S., Luo Y., Chen Z., Liu L., Zhou H., Chen W., Shen T., Han X., Chen L., Huang S. Calcium signaling is involved in cadmium-induced neuronal apoptosis via induction of reactive oxygen species and activation of MAPK/mTOR network. *PLoS One.* 2011;6(4):e19052.

Yamada H., Uenishi R., Suzuki K., Koizumi S. Cadmium-induced alterations of gene expression in human cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009;28(1):61-9.

Yokouchi M., Hiramatsu N., Hayakawa K., Okamura M., Du S., Kasai A., Takano Y., Shitamura A., Shimada T., Yao J., Kitamura M. Involvement of selective reactive oxygen species

upstream of proapoptotic branches of unfolded response. *J Biol Chem.* 2008;283:4252-4260.

Zhang C., Yuan X., Mao W., Yue L., Kong X., Gao Y., Luo L., Yin Z. Inhibition of cadmium-induced apoptosis by glutathione S-transferase P1 via mitogen-activated protein kinases and mitochondrial pathways. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010;30(2):202-208.

Zhang D., Gao J., Zhang K., Liu X., Li J. Effects of Chronic Cadmium Poisoning on Zn, Cu, Fe, Ca, and Metallothionein in Liver and Kidney of Rats. *Biol Trace Elem Res.* 2012;149(1):57-63.

Zhou Z.H., Lei Y.X., Wang C.X. Analysis of aberrant methylation in DNA repair genes during malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by cadmium. *Toxicol Sci.* 2012;125(2):412-7.

Citotoxicidade e atividade antiparasitária de *Lygodium venustum* SW Cytotoxic and antiparasitic activity of *Lygodium venustum* SW

Morais-Braga, Maria Flaviana B.¹; Souza, Teógenes .M.¹; Santos, Karla K.A.¹; Andrade, Jacqueline C.¹; Guedes, Gláucia M.M.¹; Tintino, Saulo R.¹; Souza, Celestina E.S.¹; Costa, José G.M.²; Saraiva, Antônio A.F.³; Coutinho, Henrique.D.M.^{1*}

¹Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, ²Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, ³Laboratório de Paleontologia da Universidade Regional do Cariri, Crato, Brasil.

*hdmcoutinho@gmail.com

Recibido: 2 de agosto de 2012
Aceptado: 12 de marzo de 2013

Abstract. Infectious and parasitic diseases like leishmaniasis and Chagas disease have spreading recent decades to places not observed before. They are considered neglected by desolating poor countries and marginalized pharmacologically. There are not many options for the treatment and these drugs have shown significant toxicity contributing to the appearance of several side effects. Research on natural products has been shown to be an interesting alternative to the search for new drugs. *Lygodium venustum* is a cosmopolitan fern with latescence habit found on the Chapada do Araripe, considered by some American populations as a medicinal plant for the treatment of skin diseases, infections, fungal infections and trichomoniasis. This study evaluated its antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis*, as well as its cytotoxicity through trials *in vitro*. We tested the ethanolic extract and hexane fraction obtained from the leaves of *L. venustum* at different concentrations. For *in vitro* tests of *T. cruzi*, we used the clone CL-B5 and for *L. brasiliensis* we used promastigotes. The cytotoxicity assay was performed with strains of fibroblasts. *L. venustum* showed no antiparasitic activity clinically relevant in the form of crude ethanolic extractor as the hexane fraction against *Leishmania*. The hexane fraction showed an intermediate activity against *T. cruzi*, but the concentration of moderate effect has maximum cytotoxicity becoming unfeasible for clinical application. However, the cytotoxicity presented may be useful in research on antineoplastic activity in tumor cells.

Keywords: Fern; Leishmanicidal activity, Trypanocidal activity, Hexane fraction.

Resumo. Doenças parasitárias infecciosas como leishmaniose e doença de Chagas tem se difundido nas últimas décadas a locais onde antes não se observava sua ocorrência. São consideradas negligenciadas por assolarem países pobres e serem marginalizadas farmacologicamente. O tratamento não apresenta muitas opções de fármacos e estes demonstram relevante toxicidade contribuindo para o aparecimento de diversos efeitos colaterais. A pesquisa com produtos naturais tem se mostrado uma interessante alternativa para a procura por novos fármacos. *Lygodium venustum* é uma samambaia cosmopolita de hábito lianescente encontrada na encosta na Chapada do Araripe, considerada por algumas populações americanas como planta medicinal para o tratamento de dermatoses, infecções, micoses e tricomoníases. Neste estudo foi avaliada sua atividade antiparasitária contra *Leishmania brasiliensis* e *Trypanosoma cruzi*, bem como sua citotoxicidade através de ensaios *n vitro*. Foram testadas a fração hexânica e o extrato etanólico obtido das folhas de *Lygodium venustum* em diferentes concentrações. Para os testes *in vitro* de *T. cruzi*, foi utilizado o clone CL-B5 e para *Leishmania brasiliensis* foram utilizadas formas promastigotas. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com linhagens de fibroblastos. *L. venustum* não apresentou atividade antiparasitária clinicamente relevante na forma de extrato etanólico bruto nem como fração hexânica contra *Leishmania*. A fração hexânica apresentou uma atividade intermediária contra *T. cruzi*, porém a concentração de efeito moderado possui citotoxicidade máxima tornando-se inviável para aplicação clínica. Entretanto, a citotoxicidade apresentada poderá ser útil em pesquisas sobre atividade antineoplásica em células tumorais.

Palavras-chave: Samambaia; Atividade leishmanicida; Atividade tripanocida. Fração hexânica.

INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas que acometem primordialmente os países em desenvolvimento tem sido a causa de morte de milhões de pessoas em todo o mundo. Estas doenças são negli-

genciadas e têm afligido a humanidade desde tempos imemoráveis e afetam principalmente comunidades marginalizadas, sem influência política, em áreas remotas, zonas de conflitos ou favelas urbanas onde há pouco ou ne-

nhum acesso à saúde ou outros serviços. A alta morbidade das doenças afeta a frequência escolar, o desenvolvimento cognitivo, o crescimento e a produtividade em geral (WHO 2003). Entre as doenças consideradas negligenciadas podemos citar a Doença de Chagas e Leishmaniose.

Ações vêm sendo realizadas no sentido de estabelecer metas por tempo limitado para o controle de algumas destas doenças mesmo diante de dificuldades como recursos financeiros limitados, falta de pessoal treinado e fraqueza ou carência de infraestrutura de saúde para alcançar as populações afetadas (WHO 2003). Além dos entraves impostos por estas situações, ainda há uma grande desafio que é chamar a atenção da indústria farmacêutica, diante do reduzido potencial de retorno lucrativo. Dessa forma, o conhecimento produzido pelas pesquisas não se reverte em avanços terapêuticos, como, por exemplo, novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas (Ministério da Saúde 2010). Portanto, além de estigmatizadas socialmente, as pessoas afetadas por estas doenças se vêem também marginalizadas farmacologicamente. A leishmaniose é uma doença prevalente em 88 países, em 4 continentes, estimando-se que cause 1,6 milhões de novos casos anualmente, dos quais cerca de 500.000 sejam visceral e 1,1 milhões cutânea ou mucocutânea (WHO 2010). Os agentes causadores dessa doença são parasitas unicelulares heteroxênicos do gênero *Leishmania* que apresentam duas formas morfológicas no seu ciclo de vida: promastigota, quando estão infectando o inseto vetor e amastigota quando estão infectando o homem (Magill 1995; Michalick 2005).

Apresenta diversos tipos de manifestações clínicas e se dividem em dois grupos principais: a forma tegumentar, que pode ser cutânea localizada, que se caracteriza por lesões únicas ou múltiplas na pele, geralmente no rosto, braços e pernas; cutânea difusa, com lesões nodulares persistentes, no corpo inteiro; e mucocutânea ou cutâneo mucosa, que afeta de maneira preponderante as mucosas da face, como fossas nasais e o palato; e as formas viscerais, que se caracteriza pelo aumento no volume do fígado e baço, anemia, perda de peso e febre, e que, se não tratada a tempo, pode ser fatal (Grevelink e Lerner 1996; Herwaldt 1999; Hepburn 2000).

Apesar de sua alta toxicidade, os antimonial pentavalentes têm sido utilizados como dro-

gas de primeira escolha para tratamento da Leishmaniose. A anfotericina B lipossomal, pentamidina, paramomicina e miltefosine são drogas de interesse por representarem novas alternativas terapêuticas, porém apresentam grandes problemas como efeitos colaterais, preço do produto e produção da formulação (Pereira *et al.* 2011). A Organização Mundial de Saúde (WHO 2010) recomenda que a leishmaniose visceral – que tem potencial de desenvolver resistência a drogas – seja tratada com combinação de medicamentos ao invés de monoterapia. Porém, desde 2009 foi recomendado que anfotericina B lipossomal seja utilizada como estratégia provisória até que as combinações possam ser implementadas.

A doença de Chagas é uma zoonose causada por *Trypanosoma cruzi*, que continua a persistir na Região das Américas, entretanto com a introdução de medidas de controle de vetores e transfusão de sangue mais segura, diminuiu-se o risco de transmissão e com isto, o número estimado de pessoas infectadas caiu de aproximadamente 20 milhões em 1981 para cerca de 10 milhões em 2009. Porém, devido a mobilidade da população ser cada vez maior, tem ocorrido o movimento da doença para áreas antes consideradas não-endêmicas, representando um desafio sério de saúde pública (WHO 2010).

As formas de transmissão de maior importância epidemiológica são a vetorial através de insetos hematófagos, os triatomíneos (barbeiros), a transfusional, a congênita e a oral (Coura *et al.* 2007). O *T. cruzi* possui um ciclo biológico complexo, envolvendo três formas evolutivas (tripomastigota, epimastigota e amastigota) e várias espécies de triatomíneos e de mamíferos, silvestres e domésticos, que atuam respectivamente, como vetores e reservatórios do parasito (Lana e Tafuri, 2005).

As doenças endêmicas parasitárias representam um grave problema médico, social e humano e sua prevenção, controle e tratamento representam um grande desafio mundial (Dias *et al.* 2009). Atualmente, os dois medicamentos usados para o tratamento são benzonidazol e nifurtimox, sendo que este último é contra-indicado em pacientes com antecedentes psiquiátricos ou distúrbios neurológicos (WHO 2010), tendo sido abolido em alguns países. Portanto, pesquisas por novos fármacos antiparasitários para o combate da leishmaniose e da doença de Chagas são urgentes e necessárias.

Neste trabalho, iremos verificar o potencial

leishmanicida e tripanocida, bem como a citotoxicidade de uma samambaia lianescen-te, *Lygodium venustum*, cujo uso popular tem sido relatado para o tratamento de der-matoses, infecções, micoses e tricomoníases (Duke 2008).

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Folhas de *L. venustum* foram coletadas em Crato, estado do Ceará, Brasil em maio de 2010. O material vegetal foi identificado pelo Dr. Antonio Álamo Feitosa Saraiva e deposi-tado no Herbário Cariense Dárdano de Andra-de-Lima da Universidade Regional do Cariri URCA, com o número 5569 HCDAL.

Preparação do extrato etanólico e fração hexânica das folhas de *L. venustum*

Folhas frescas de *L. venustum* (211,18 g) foram submersas em etanol 92% em tempera-tura ambiente durante 72 h. O extrato obtido foi filtrado e concentrado a vácuo em rotaeva-porador a 60°C e 760 mmHg de temperatura e pressão, respectivamente, obtendo-se 12,42 g de extrato bruto. O fracionamento foi rea-lizado tomando-se metade do extrato bruto, obtendo-se a fração hexânica com rendimen-to de 0,22 g. Foram diluídos 0,01 mg do ex-trato e da fração em dimetilsulfóxido (DMSO) para realização dos testes.

Linhagens celulares utilizadas

Para estudos *in vitro* de *T. cruzi*, cepas de pa-rasito CL-B5 (clone CL-B5) foram usados. Os parasitos estavelmente transfectados com o gene β -galactosidase de *Escherichia coli* (LacZ) foram gentilmente cedidos pelo Dr. F. Buckner por meio do Instituto Comemorati-vo Gorgas (Panamá). Os epimastigotas foram cultivados a 28°C em infusão de fígado tripto-se (LIT) com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina e estreptomicina como descrito an-teriormente e colhidas durante a fase de cres-cimento exponencial.

Para o estudo da atividade leishmanicida *in vitro*, foi utilizado formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301) a 26°C em Schneider's (meio para inseto) suplementado à 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2% de urina humana normal (v/v) mais penicilina e estreptomicina.

A linhagem de células utilizada no teste de ci-totoxicidade foi a de fibroblastos de mamífero NCTC clone 929. As células foram cultivadas

em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado a 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado pelo calor (30 minutos a 56°C), penicilina G (100 U/ml) e estreptomicina (100 mg/ml). Para os ex-perimentos, as células na fase pré-confluência foram colhidas com tripsina. Culturas de célu-las foram mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% umidificado CO₂.

Ensaio de susceptibilidade para as formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*

O ensaio de rastreamento foi realizado em placas de microdiluição de 96 poços (Sars-tedt, Inc.) com culturas que não atingiram a fase estacionária, como descrito por Vega *et al* (2005). Epimastigotas foram semeadas a 1×10^5 por mililitro em 200 μ l, as placas foram então incubadas com os extratos a 28°C por 72 horas, momento em que 50 μ l de solução CPRG foram adicionados para dar a concen-tração final de 200 μ M, as placas foram incu-badas a 37°C por mais 6 h adicionais e então lidas a 595 nm em espectrofotômetro. O Nifur-timox foi utilizado como droga de referência. Cada concentração foi testada em triplicata. Cada experimento foi realizado duas vezes se-paradamente. O percentual de inibição (%AE) foi calculado como segue: %AE = [(AE - AEB)/ (AC - ACB)] x 100, onde AE = absorvância do grupo experimental; AEB = branco de com-postos; AC = grupo controle de absorvância; ACB = branco de meio de cultura. As soluções dos extratos a ser analisado foram preparadas em dimetilsulfóxido, com a concentração final uma mistura água/DMSO jamais excedendo 0,2% do solvente final.

Ensaio de suscetibilidade para formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*

O ensaio foi realizado seguindo um método anteriormente descrito (Mikus e Steverding 2000 com modificações). Formas promastigo-tas ($2,5 \times 10^5$ parasitas/poço) foram cultiva-das em placas de 96 poços de plástico. As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxi-do (DMSO). Diferentes diluições dos compos-tos de até 200 ml de volume final foram adicio-nados. Após 48 h a 26 °C, 20 ml de solução de resazurina foi adicionado e a oxidação-redu-ção foi quantificada a 570 a 595 nm Cada con-centração foi testada em triplicata. Em cada ensaio foi utilizado como controle drogas de referência. As porcentagens antipromastigo-tas (%AP) foram calculadas. A eficácia de cada composto foi determinada.

Ensaio de citotoxicidade

O procedimento para a medição de viabilidade celular foi avaliada com resazurina por método colorimétrico descrito anteriormente (Rólón *et al.* 2006). Fibroblastos NCTC929 foram semeados (5×10^4 células/ poço) em placas de microdiluição de fundo chato de 96 poços com 100 μ l de meio RPMI 1640. Deixou-se que as células pavimentassem as placas por 24 h a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. O meio foi substituído por diferentes concentrações das drogas em 200 μ l de meio e, em seguida, foram incubados por mais 24 h. Controles de crescimento também foram incluídos. Posteriormente, um volume de 20 μ l da solução 2 mM de resazurina foi adicionado e as placas foram devolvidas à incubadora por outras 3 h para avaliar a viabilidade celular. A redução da resazurina foi determinada por medida de absorbância do comprimento de onda a 490nm e 595nm. Cada concentração foi testada três vezes. Meio e drogas controle foram usados em cada teste como brancos. A citotoxicidade de cada composto foi estimada através do cálculo do percentual de citotoxicidade (C%). A atividade tripanocida e a citotoxicidade foram testadas paralelamente, enquanto que a atividade leishmanicida foi testada somente nas concentrações em que não foram tóxicas às células de mamíferos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliadas a citotoxicidade de *Lygodium venustum* utilizando fibroblastos de mamíferos e a bioatividade antiparasitária contra as formas epimastigota de *T. cruzi* e promastigota de *L. brasiliensis*.

A forma epimastigota de *T. cruzi* apresenta-se de forma alongada, com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo e flagelo livre na porção anterior. Podemos identificá-la como sendo a forma de replicação que se observa no hospedeiro invertebrado (triatomíneo) localizada na porção posterior do intestino e em cultura em meio líquido (Chagas 1909; Rey 2001; Lana e Tafuri 2005). A forma promastigota de *Leishmania* possui flagelo único, núcleo no terço médio da célula e cinetoplasto em posição anterior (Michalick 2005). Estas formas presentes no hospedeiro invertebrado são englobadas por macrófagos de hospedeiros vertebrados (Michalick 2005).

De acordo com Castilhos (2008), estudos envolvendo *Leishmania spp* apresentam o foco na forma extracelular do parasito, conhecido

como promastigota, ao invés da forma amastigota, devido à facilidade de cultura *in vitro* e de não envolver outra cultura de células como macrófagos, por exemplo. Dessa forma, entende-se que o mesmo se pode dizer do *T. cruzi* e a forma epimastigota, ensaiada nesta pesquisa. Fibroblastos são células encontradas no tecido conjuntivo de mamíferos. Estas células têm sido geralmente escolhidas para realização de testes de citotoxicidade porque são de fácil manutenção e produzem resultados que apresentam alta correlação com os biológicos e ainda por estarem presentes em ferimentos, sendo o principal tipo de célula presente na regeneração (Ratner *et al.* 2004).

Os testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (Forbes e Forbes, 1994). Nesse sentido, os resultados podem fornecer informações valiosas para a triagem de produtos naturais que apresentem condições de serem considerados como prováveis candidatos a fármacos.

Leishmaniose e doença de Chagas são doenças cujo tratamento é feito com medicamentos considerados tóxicos, além disso, este tratamento tem sido dificultado pelo desenvolvimento da resistência pelos parasitos. A quimioresistência está muito presente em alguns países onde o fármaco não é mais utilizado com eficiência e novos estudos tiveram que ser conduzidos para o entendimento dos mecanismos de ação e compreensão da quimioresistência (Boibessot *et al.* 2002). Em busca de novos fármacos, pesquisas de produtos naturais com bioatividade antiparasitária e ausência ou uma baixa citotoxicidade vem sendo realizadas (Luize *et al.* 2005; Mesquita *et al.* 2005; Rojas *et al.* 2010).

Nos testes realizados, a citotoxicidade e a atividade tripanocida foram realizadas concomitantemente, observando-se o efeito do produto natural na medida em que se diminuía a sua toxicidade em fibroblastos (*Tabela 1*). De uma maneira geral, tanto o extrato como a fração foram extremamente tóxicos na concentração mais elevada do produto (1000 μ g/ml), sendo que a fração hexânica continuou demonstrando toxicidade máxima até a concentração de 250 μ g/ml. Na concentração em que não houve citotoxicidade, o efeito antiepigastigota foi irrelevante. O extrato demonstrou uma toxicidade menor se compararmos extrato e fração na concentração de 500 μ g/ml, entretanto o efeito

sobre formas epimastigotas foi abaixo de 50%. Diante dos resultados da citotoxicidade é que foram realizados os testes de suscetibilidade para a forma promastigota. Nenhuma atividade foi demonstrada pelo extrato e a fração hexânica demonstrou um efeito extremamente baixo (Tabela 2).

Segundo hipóteses mais recentes, metabólitos secundários de plantas seriam formados com a função de defender a espécie de predadores. Por isso, não é surpreendente que muitas plantas acumulem substâncias de elevada toxicidade. As substâncias tóxicas em uma planta podem estar limitadas a uma estação do ano ou a certas condições ambientais, ou ainda a certas variedades ou cultivares (Simões *et al.* 2010). Estudos mostram que o mecanismo de ação da citotoxicidade está relacionado à capacidade destas plantas de induzir apoptose celular (Block *et al.* 2004).

Este foi o primeiro relato sobre a citotoxicidade da samambaia *Lygodium venustum*. A avaliação de sua bioatividade antiparasitária contra *T. cruzi* e *L. brasiliensis* também é pioneira na família Lygodiaceae.

CONCLUSÕES

L. venustum não apresentou atividade antiparasitária clinicamente relevante na forma de extrato etanólico bruto nem como fração hexânica contra *Leishmania*. A fração hexânica apresentou uma atividade intermediária contra *T. cruzi*, porém a concentração de efeito moderado possui citotoxicidade máxima tornando-se inviável para aplicação clínica. Os compostos químicos presentes no produto natural foram incapazes de afetar as formas de protozoários em concentrações de baixa toxicidade. Portanto, para o caso do *T. cruzi*, as concentrações em que demonstraram atividade moderada foram tóxicas sobre as células fibroblásticas e para o caso da *L. brasiliensis* os produtos naturais não foram ativos nas concentrações não tóxicas. Entretanto, a citotoxicidade apresentada poderá ser estudada sobre diferentes tipos de células, como por exemplo, com linhagens de células tumorais, com a finalidade de avaliar seu potencial como fonte promissora de metabólitos secundários anticancerígenos.

Tabela 1. Citotoxicidade e atividade antiepipimastigota de extrato e fração de *Lygodium venustum*.

Produto natural	Conc. (µg/ml)	%C	± %DS	Conc.(µg/ml)	%AE	± %DS
EELV	1000	100	0,04	1000	25,45	2,98
	500	10,8	14,88	500	33,94	11,88
FHLV	1000	100	1,78	1000	63,14	2,93
	500	100	11,19	500	42,04	8,05
	250	100	10,84	62,5	5,01	9,05
	125	74,1	2,94	31,25	5,72	5,68
	62,5	0	4,66	15,62	2,87	3,71

EELV: Extrato etanólico de *Lygodium venustum*; FHLV: Fração hexânica de *L. venustum*; %C: percentual de citotoxicidade; %AE: percentual de atividade antiepipimastigota

Tabela 2. Atividade antipromastigota de extrato e fração de *Lygodium venustum*.

Produto natural	Conc. (µg/ml)	%AP	± %DS
EELV	500	0,00	0,65
FHLV	62,5	2,61	1,86

EELV: Extrato etanólico de *Lygodium venustum*; FHLV: Fração hexânica de *L. venustum*; %AP percentual de atividade antipromastigota

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Block S., Gerkens, P., Peulen O., Jolois O., Mingeot-Leclercq M.P., De Pauw-Gillet M.C., Quetin-Leclercq J. Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia cells by a natural trachylobane diterpene. *Anticancer Res.* 2005;25:363-368.
- Boibessot I., Turner C.M., Watson D.G., Goldie E., Connel G., McIntosh A., Grant M.H., Skellern G.G. Metabolism and distribution of phenanthridine trypanocides in *Trypanosoma brucei*. *Acta Trop.* 2002; 84: 219-228.
- Castilhos P. Efeito da peçonha de *Bothrops moojeni* sobre formas promastigotas de *Leishmania* spp. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Uberlândia: Universidade federal de Uberlândia, 2008.
- Chagas C. Nova tripanossomíase humana. Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Trypanosoma Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1909; 1: 159-218.
- Coura J.R., Junqueira A.C.V., Carvalho-Moreira C.J., Borges-Pereira J., Albajar, P.V. Uma visão sistêmica da endemia chagásica. In: Silveira, A.C., editor. *La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral.* Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud/Fundación Mundo Sano, 2007.
- Dias L.C., Dessoy M.A. Chemotherapy of Chagas' Disease: State of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quím Nova.* 2009;32:2444-2457.
- Duke J.A. *Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America.* New York: CRC Press Taylor & Francis group, 2008.
- Forbes V.E., Forbes T.L. *Ecotoxicology in theory and practice.* Londres: Chapman and Hall, 1994.
- Grevelink S.A., Lerner E.A. *Leishmaniasis.* *J Am Acad Dermatol.* 1996;34:257-272.
- Hepburn N.C. Cutaneous *Leishmaniasis.* *Clin Exp Dermatol.* 2000;25:363-370.
- Herwaldt B.L. *Leishmaniasis.* *Lancet.* 1999;354:1191-1199.
- Lana M., Tafuri W.L. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. In: Neves, D.P. et al. *Parasitologia Humana.* São Paulo: Atheneu, 2005.
- Luize O.S., Tiunan T.S., Morello L.G., Maza P.K., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B.P., Cortez D.A.G., Mello J.C.P. Nakamura C.V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Ci Farma.* 2005; 41: 85-94.
- Magill A.J. Epidemiology of *Leishmaniasis.* *Dermatologia Clin.* 1995;13:5055-5023.
- Mesquita M.L., Desrivot J, Bories C, Fournet A, Paula JE, Grellier P, Espindola LS. Anti-*Leishmanial* and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100: 783-787.
- Michalick, M.S.M. Gênero *Leishmania*. En: Neves, D.P.; Melo, A.L.; Genaro, O.; Linardi, P.M., *Parasitologia humana.* 11. ed., São Paulo: Atheneu, 2005.
- Mikus J., Steverding D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using dye Alamar Blue®. *Parasitol Int.* 2000;48:259-265.
- Ministério da Saúde - Brasil. *Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde.* Texto de difusão técnico-científico do Ministério da Saúde. *Rev Saúde Públ.* 2010;44:200-202.
- Pereira I.O., Sacramento L.V.S., Marques M.J. *Leishmanioses: "o estado da arte".* *Rev Univ Vale do Rio Verde.* 2011; 9:220-238.
- Ratner B., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* 2nd Edition, New York: Elsevier Academic Press, 2004.
- Rey L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África.* Terceira edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- Rojas J., Solís H., Palacios, O. *Evaluación in vitro de La actividad anti Trypanosoma cruzi*

de aceites esenciales de diez plantas medicinales. *An Fac Med.* 2010;71:161-165.

Rolón M., Seco E., Vega C, Nogal J.J., Escario J.A., Gomez-Barrio A. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents.* 2006;28:104-109.

Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., Mello J.C.P., Mentz L.A., Petrovick P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Sexta edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010.

Vega C., Rolon M., Martínez-Fernandez A.R., Escario J.A., Gomez-Barrio A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma*

cruzi epimastigotes expressing beta-galactosidase. *Parasitol Res.* 2005;95:296-298.

World Health Organization. International Workshop, Intensified control of neglected diseases, Summary Report. 2011 Dezembro [consulta em 15 de dezembro de 2011] Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_CDS_CPE_CEE_2004.45.pdf>.

World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. 2011 Dezembro [consulta em 15 de dezembro de 2011]. Disponível em <http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/NTD_2010report_embargoed.pdf> .

RESÚMENES DE TESIS

Biodisponibilidad y toxicidad de metales pesados en aguas naturales con características físico-químicas extremas. Bases para su monitoreo y remediación

Casares, María V.

Museo Argentino de Ciencias Naturales *Bernardino Rivadavia* - CONICET, Avenida Ángel Gallardo 470 (C1405DJR), Buenos Aires, Argentina.
mvc251@hotmail.com

En esta tesis doctoral se presentaron los resultados obtenidos en el marco de la aplicación de dos herramientas importantes para ser tenidas en cuenta en el manejo, restauración y monitoreo de ecosistemas acuáticos contaminados por metales pesados: el Modelo del Ligando Biótico y la Fitorremediación. Ambas fueron evaluadas en dos aguas naturales de nuestro país con características físico-químicas extremas, como lo constituyen las aguas del Río Pilcomayo, caracterizadas por los elevados valores de sus iones principales como por la gran carga de sólidos que transporta y las aguas del Arroyo Morales, afluente del Río Matanza-Riachuelo, caracterizadas por el elevado pH, sodio y alcalinidad. El Río Pilcomayo presenta también una gran variación inter-estacional en su caudal que, de acuerdo al análisis realizado, afecta directamente la hidroquímica del río ya que los iones mayoritarios muestran una variación inter-estacional con valores superiores en la estación seca. Los sólidos totales en suspensión son mayores en la estación húmeda y constituyen los principales transportadores de los metales pesados que este río recibe provenientes de la actividad minera en su alta cuenca. El mecanismo determinante del contenido iónico en el agua del Río Pilcomayo en la cuenca baja es la evaporación-cristalización en ambas estaciones.

Dado el efecto directo de la hidroquímica sobre la biodisponibilidad y toxicidad de los metales en los organismos acuáticos, se estudió la toxicidad aguda del cobre, cinc, cadmio y plata en la especie nativa *Cnesterodon decemmaculatus*, en agua del Río Pilcomayo y en agua del Arroyo Morales, que mostró el siguiente patrón: plata>cobre>cadmio>>cinc

y cobre>>cinc, respectivamente. La variable físico-química con mayor influencia sobre la toxicidad de los metales fue la dureza. Se aplicó el Modelo del Ligando Biótico a cada calidad de agua y cada metal para evaluar la validez de una extrapolación inter-específica de la predicción de toxicidad aguda del modelo para la especie *Pimephales promelas*. La extrapolación mostró ser válida sólo para el cobre en agua del Río Pilcomayo, para el resto, el modelo tendió a sobrestimar la toxicidad. Esto podría deberse a las limitaciones del modelo en cuanto al rango de valores de los parámetros físico-químicos con los que ha sido calibrado, a que los individuos empleados en los ensayos constituían estadíos menos sensibles y/o a la menor sensibilidad de *C. decemmaculatus* respecto a *P. promelas* a la presencia de los metales estudiados.

La especie acuática flotante nativa *Salvinia minima* presentó una gran capacidad para remover nutrientes, cobre y cinc, tanto en medio de cultivo como en un agua natural como el agua del Río Pilcomayo, incrementándose el contenido del metal en la biomasa a mayor concentración del mismo en solución. La remoción de cobre fue fundamentalmente por biosorción. Esto permitiría una recuperación relativamente sencilla del metal removido. Asimismo, esta especie presentó una baja traslocación del metal a la biomasa aérea, evidenciando un efecto protector de la maquinaria fotosintética. Estas características hacen de esta especie una buena elección para el tratamiento de aguas y efluentes con elevados niveles de los nutrientes y metales estudiados. El trabajo realizado contribuye con la evaluación de herramientas que podrían ser aplicadas, en un futuro, en la generación de una

normativa y en el manejo y monitoreo ambiental de las aguas basados en las características propias de nuestras especies y nuestros cuerpos de agua.

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

Director: Dra. Laura I. de Cabo

Director Asistente: Ing. Rafael S. Seoane.

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
Aboud 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.