

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 22
N° 3
Diciembre 2014

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

Adriana S. Ridolfi

Vicepresidente

Marta A. Carballo

Tesorera

Patricia N. Quiroga

Secretario

María L. Oneto

Vocales

Marcela M. López Nigro

Marta D. Mudry

Claudia P. Lamenza

Vocales Suplentes

María T. Yanicelli

María F. Simoniello

Gerardo D. Castro

Comité Científico

José A. Castro

María I. Díaz Gómez

Mirtha Nassetta

Marta M. Salseduc

Aldo S. Saracco

Órgano de Fiscalización

Mirta E. Ryczel

Claudia V. Vassena

Norma B. Casabé

Tribunal de Honor

Susana I. García

Edda C. Villaamil Lepori

Irma Giolito

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, *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. Donnenwald, *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 Milano, Italia*

Estela Giménez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*

Nelly Mañay, *Universidad de la República, Uruguay*

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

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

Haydée N. Pizarro, *CONICET, Argentina*

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

María M. Salseduc, *Laboratorios Bagó, Argentina*

Carlos Sèvcik, *IVIC, Venezuela*

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

Norma Vallejo, *SEDRONAR, Argentina*

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

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

INDICE (CONTENTS)

Artículos

Cotina urinaria en embarazadas expuestas al humo ambiental del tabaco que concurren a controles prenatales en la ciudad de Gualeguaychú
Goldaracena, Carlos A.; Taus, María Rosalba; Farabello, Sergio P.; Grenóvero, Silvia; Piaggio, Natalia; Piaggio, Orlando L.A.; Raffo, Argelia C.A.; Larrivey, María Ayelén 105

Histo-cytological responses of the prolactin cells of the catfish *Heteropneustes fossilis* to cadmium exposure
Srivastav, Ajai K.; Rai, Rubi; Mishra, D.; Srivastav, S.K.; Suzuki, Nobuo 116

Revisiones

Etanol e isopropanol: genotoxicidad y teratogénesis evaluada aplicando el modelo de *Drosophila melanogaster*
Palermo, Ana María; Mudry, Marta Dolores 122

Reporte de casos

Serie de casos de intoxicación fatal por ingesta intencional de fosforo de aluminio
Docampo, Patricia C.; Spera, Marina; Voitzuk, Ana P. 136

Toxicidad pulmonar por inyección intravenosa de eugenol
de Souza Viera Morales, Raquel; Méndez Gura, Mónica 141

Comunicaciones breves

Cylindrospermopsis raciborskii (Cyanobacteria, Nostocales) productora de microcistinas en Corrientes, Argentina
Otano, Silvia; Bogarin, Cinthia 145

Instrucciones para los autores 149

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

ARTÍCULOS

Cotina urinaria en embarazadas expuestas al humo ambiental del tabaco que concurren a controles prenatales en la ciudad de Gualeguaychú

Urinary cotinine values and exposure to environmental snuff in pregnant women who attend prenatal examinations in the city of Gualeguaychú

Goldaracena, Carlos A.^{*1,2}; Taus, María Rosalba^{1,2}; Farabello, Sergio P.¹; Grenóvero, Silvia¹; Piaggio, Natalia²; Piaggio, Orlando L.A.^{1,2}; Raffo, Argelia C.A.^{1,2}; Larrivey, María Ayelén¹

¹Facultad de Bromatología. Universidad Nacional de Entre Ríos. Perón 64, CP E2822EXB, Gualeguaychú, Entre Ríos. ²Instituto de Análisis Bioquímicos (INDABI). Urquiza 934, CP E2820ABF, Gualeguaychú, Entre Ríos. Dirección de Salud de la Municipalidad de Gualeguaychú. H. Irigoyen 75, CP E2820DUA, Gualeguaychú, Entre Ríos.

*FAX 03446 424777.

*carlosgolda@hotmail.com

Recibido: 17 de diciembre de 2013

Aceptado: 22 de abril de 2014

Resumen. El tabaco es uno de los factores de riesgo prevenibles más importante de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT). Los efectos de fumar no están limitados a los fumadores activos, involucran además a los individuos que sufren los efectos de los tóxicos del humo del tabaco ambiental (HTA): los fumadores pasivos. Las mujeres embarazadas fumadoras activas o expuestas al HTA son una población muy sensible a los efectos tóxicos del tabaco, ya que los mismos repercuten también sobre el feto en formación. La cotinina es en la actualidad el marcador biológico más adecuado para medir exposición al HTA tanto activa como pasiva. **Objetivo:** determinar el nivel de cotinina en mujeres embarazadas que manifestaron ser fumadoras pasivas, relacionando los valores obtenidos con los días de exposición manifestados. **Materiales y métodos:** se trabajó con 443 embarazadas que concurren a centros de salud públicos y a un centro privado de Gualeguaychú para su control prenatal, solicitándoles a las que manifestaron estar expuestas al HTA una muestra de orina para el dosaje de cotinina. Se aplicó un diseño de tipo no experimental, retrospectivo y de corte transversal. El dosaje de cotinina se realizó en orina, empleando una metodología quimioluminiscente. Previamente se obtuvo un valor referencial de cotinina urinaria inferior a los 15,2 ng/ml para el 98 % de sujetos no fumadores no expuestos al HTA. **Resultados:** los análisis de los niveles de cotinina en las embarazadas fumadoras pasivas revelaron que, el 82 % en los centros públicos y el 42 % en el centro privado, presentaron un nivel de cotinina superior a 15,2 ng/ml. Teniendo en cuenta los días de exposición, el registro promedio de cotinina para las que manifestaron estar expuestas los últimos siete días fue de 52,3 ng/ml en el sector público y 64,1 ng/ml en el privado. **Discusión y conclusiones:** la medición de cotinina resulta de utilidad para tener datos fidedignos de la exposición pasiva al HTA. En los centros públicos el 82 % de las embarazadas que manifestaron estar expuestas tenían valores de cotinina urinaria que coincidían con lo expresado, mientras que en el centro privado el 42 % de las que manifestaron la misma situación presentaba valores del indicador que denotaban exposición al tabaco. Se observó un aumento progresivo del promedio del indicador biológico de acuerdo a los días de exposición en ambos sectores, superando los 50ng/ml cuando la exposición declarada fue durante los últimos 7 días, lo que es indicativo de una exposición al HTA severa. El interés y preocupación manifestados por las embarazadas que participaron en este estudio indica que la implementación de este tipo de diagnóstico puede contribuir a las campañas de prevención contra el consumo de tabaco y promover el derecho de quienes no fuman a vivir en ambientes saludables libres de los compuestos tóxicos del mismo.

Palabras clave: Fumar tabaco; Cotinina; Embarazadas; Exposición al humo del tabaco ambiental.

Abstract. Tobacco is one of the preventable risk factors, which is most important in the chronic non-communicable diseases (NCDs). The effects of smoking are not limited to active smokers; it also involves individuals who suffer the effects of environmental tobacco smoke (ETS): passive smokers. Pregnant women who are active smokers or exposed to ETS are a very sensitive population to the toxic effects of snuff, since they also affect the developing fetus. Cotinine is currently the most suitable biomarker for measuring ETS exposure both active and passive. **Objective:** To determine the level of cotinine in pregnant women who reported being passive smokers, relating the values obtained with the indicated days of exposure. **Materials and methods:** We worked with 443 pregnant women attending public health centers and a private centre in Gualeguaychú for prenatal care, asking to be exposed to ETS showed a urine sample for cotinine dosage. We performed a non-experimental, retrospective and cross-sectional design. The dosage of cotinine in urine was performed using a chemiluminescent method. Previously we obtained a reference value of urinary cotinine less than 15,2ng/ml for 98% of non smokers unexposed to ETS. **Results:** The analysis of cotinine levels in passive smoking pregnant women show tHTA in public centers, 82% has a cotinine level greater than 15,2ng/

ml, whereas in the private centre, 42% have the same range values. Considering the days of exposure, the average cotinine log for those who said were exposed for the past seven days, was 52.32 ng/ml in the public sector and 64.17 ng/ml in the private one. Discussion and conclusion: The measurement of cotinine is useful to have reliable data from passive exposure to ETS. In public centers, 82% of pregnant women who said were exposed had urinary cotinine levels consistent with the statement, while in the private centre the 42% who said had the same situation had indicator values denoting exposure to snuff. There was a progressive increase in average biological indicator according to the days of exposure in both sectors, exceeding 50ng/ml when the declared exposure was during the last 7 days, which is indicative of a severe ETS exposure. The interest and concern expressed by the pregnant women who participated in this study indicates HTA the implementation of this kind of diagnosis may contribute to prevention campaigns against snuff consumption and promote the right of nonsmokers to live in healthy environments free of the toxic compounds thereof.

Keywords: Tobacco smoking; Cotinine; Pregnant women; Environmental tobacco smoke.

Introducción

En la Argentina hay aproximadamente 12.000.000 de fumadores, perdiéndose 40.000 vidas por año a causa del consumo de tabaco (Grupo Tabaquismo 2005), el cual está considerado uno de los factores de riesgos prevenibles más importante de las principales enfermedades crónicas no transmisibles (Pardell y col. 1996; OMS 2008; Pérez Jiménez y col. 2008). En la composición química del tabaco se han identificado cerca de 4.000 sustancias diferentes (Lorenzo y col. 2009), de las cuales alrededor de la mitad se encuentran originalmente en las hojas y el resto se produce durante la combustión. La mayoría de las mismas posee propiedades tóxicas.

El hábito de fumar tabaco es causa de numerosas enfermedades (más de 20 comprobadas), entre ellas diversos tipos de cánceres, enfermedades cardiovasculares, pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y oclusiva arterial periférica. Lamentablemente los efectos de fumar tabaco no están limitados a los fumadores activos, sino que también involucran a aquellos que involuntariamente sufren los efectos de los productos tóxicos del humo del tabaco ambiental (HTA) convirtiéndose en los llamados fumadores pasivos (Banegas y col. 1998; Flórez y col. 2001). Las mujeres embarazadas fumadoras activas o aquellas expuestas involuntariamente al HTA constituyen una población muy sensible a los efectos tóxicos del tabaco, ya que involucra no solamente a la gestante sino también al feto en formación. Investigaciones realizadas en varios países (Gueguen y col. 1995), señalan los efectos adversos del tabaquismo maternal (Mori y col. 1996) activo o pasivo (Lazzaroni y col. 1990; Play y col. 1991; Crowley y Geary

1998) durante el embarazo. Los riesgos de fumar sobre la salud perinatal están bien establecidos e incluyen: recién nacidos con bajo peso para su edad gestacional (Fortier y col. 1994; Ellard y col. 1996; Comisión de Tabaquismo 2001), aumento de la mortalidad perinatal (Tager y col. 1995, OPS 1998; Comisión de Tabaquismo 2001), incremento de la incidencia de abortos espontáneos (Morello y col. 2001), daños al aparato respiratorio del recién nacido (Ministerio de Salud 2001; Área de Investigación de la SAC 2002) como así también una mayor susceptibilidad a las infecciones respiratoria y al asma (Seidman y Mashiach 1991; Hu y col. 1997), síndrome de muerte súbita del lactante (Di Franza y Lew 1995; Roquer y col. 1995), intensificación del riesgo de desarrollo de neoplasias en la infancia entre otros (Ferris Tortajada y col. 1998). Todos estos efectos también se presentan, aunque en menor grado, con el tabaquismo pasivo materno.

El uso de marcadores biológicos ha resultado de mucha utilidad para determinar la exposición a los componentes tóxicos del tabaco, tanto en fumadoras activas como en pasivas. En ocasiones, la información autodeclarada respecto al consumo de tabaco no es fiable por la percepción negativa que existe socialmente del mismo, por lo que la medición de marcadores biológicos resulta ser más confiable. La cotinina (metabolito de la nicotina) es en la actualidad el marcador biológico más adecuado para medir exposición, tanto activa como involuntaria al HTA (Benowitz 1996; Pérez Trullén y col. 2004; Thaqi y col. 2005; Pérez Trullén y col. 2006) pudiéndose medir en distintos fluidos biológicos: plasma, orina o saliva.

En el presente estudio se trabajó con emba-

razadas que concurren a centros de salud públicos y privados de la ciudad de Gualeguaychú para sus controles bioquímicos prenatales. A quienes daban su consentimiento y cumplían con los criterios de inclusión establecidos, se les informaba las características del estudio, se les solicitaba que completaran un cuestionario informativo (*Anexo I*) y a las no fumadoras que manifestaban estar expuestas al HTA, se les solicitaba una muestra de orina para el dosaje de cotinina urinaria. Luego del procesado de las muestras, se informó individualmente a las embarazadas de los resultados obtenidos y las medidas preventivas a tomar en los casos de análisis con valores significativos del marcador.

Objetivos

Determinar el nivel de cotinina en mujeres embarazadas que manifestaron ser fumadoras pasivas, que concurren a control prenatal en establecimientos públicos de salud y a un centro privado de la ciudad de Gualeguaychú.

Observar si había relación entre lo declarado, en lo referente a la exposición pasiva, y el dosaje de cotinina y comprobar si había correlación entre dichos valores y la cantidad de días de exposición manifestada.

Material y métodos

En este estudio se aplicó un diseño de tipo no experimental, retrospectivo y de corte transversal. El total de embarazadas evaluadas fue 295 en los centros de salud públicos y 148 en el centro privado.

La secuencia operativa de las actividades se detalla en la *Figura 1*.

Las unidades de observación fueron seleccionadas teniendo en cuenta los siguientes criterios:

De inclusión:

- mujeres embarazadas que asistieron a los centros de control prenatal públicos y privado de la ciudad de Gualeguaychú. Entre Ríos. Período 2011-2013.

De exclusión:

- negativa a participar del estudio o no prestar su consentimiento.
- incapacidad del individuo como informante calificado para responder a las acciones y preguntas propuestas en el estudio.
- barreras éticas institucionales.

Las embarazadas que concurren a su control prenatal a los centros mencionados y reunían los criterios de inclusión, fueron informa-

das de los objetivos del Proyecto y se las invitó a participar en el estudio. Previa firma del consentimiento (*Anexo II*), se les solicitó completar un cuestionario con sus datos personales, nivel educativo, datos laborales y situación frente al tabaco (*Anexo I*). A continuación se procedió a recolectar una muestra de orina, preferentemente la primera de la mañana.

El dosaje de cotinina se realizó a partir de una muestra biológica de orina, por ser un procedimiento simple y no invasivo. En la bibliografía consultada, los métodos más utilizados para su medición son la cromatografía gaseosa o la líquida de alta presión (Oddeze y col. 1998; Kuo y col. 2002; Man y col. 2005) muy sensibles y precisos, pero que requieren de aparatología y técnicas sofisticadas y costosas, que no son habituales en muchos laboratorios de nuestro país. En el presente trabajo se empleó una metodología quimioluminiscente que permite trabajar en serie, en un tiempo de procesamiento corto (25 muestras en aproximadamente una hora de proceso) y sin un tratamiento complejo previo de la orina (solamente una centrifugación previa).

Se utilizó el sistema analítico Immulite 1000 y kits de reactivos de la firma SIEMENS. La sensibilidad del método fue de 2 ng/ml, con un rango de medición comprendido entre 10 ng/ml y 500 ng/ml (Siemens 2012).

Las muestras de orina se procesaron por duplicado, tomando como valor final el promedio de ambas determinaciones y, cuando se observaban valores que no coincidían con las respuestas dadas por la embarazada en el cuestionario informativo, se repetía la determinación.

En un trabajo exploratorio elaborado por nuestro equipo, utilizando esta metodología a los efectos de obtener un valor referencial para individuos no fumadores y no expuestos al HTA, se encontró que el 98% de la población estudiada presentaba valores de cotinina urinaria inferiores a 15,2 ng/ml, siendo este valor independiente de la edad y el género (Goldaracena y col. 2013b).

De acuerdo a los datos bibliográficos consultados (Kaplan 2006; Vacchino y col. 2006a; Lumley y col. 2008; Malafatti y Martins 2009), para establecer una medida del grado de exposición al HTA, las embarazadas analizadas fueron divididas en cuatro grupos: (*Tabla 3*) grupo I, las que tenían concentraciones de cotinina urinaria inferiores a 15,2 ng/ml, que generalmente se encuentran en individuos no fumadores no expuestos; grupo II, aquellas

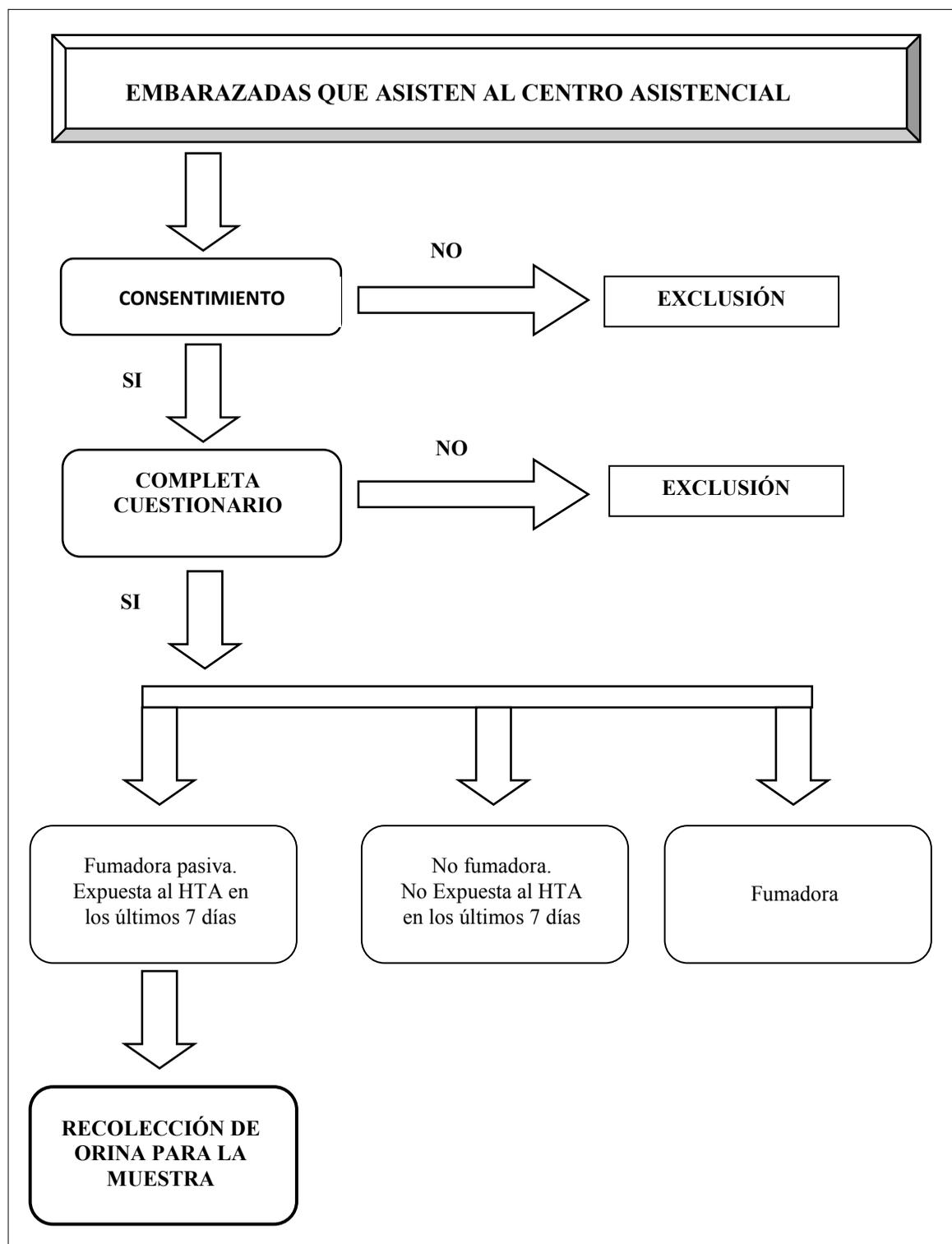


Figura 1. Secuencia operativa para la recolección de muestras de orina de embarazadas que concurrieron a los centros de control prenatal públicos y privado de la ciudad de Gualeguaychú. Entre Ríos. Periodo 2011-2013.

que tenían valores comprendidos entre 15,2 ng/ml y 50 ng/ml, que frecuentemente se encuentran en no fumadores expuestos; grupo III, que incluía a las que tenían niveles entre los 50

ng/ml y 100 ng/ml, valores que son indicativos de una exposición al HTA más severa; y por último el grupo IV con valores superiores a los 100 ng/ml que sugeriría o bien una exposición

Anexo I. Cuestionario autoaplicado estructurado

N°

DIAGNÓSTICO REGIONAL DE RIESGOS EN EL CONSUMO DEL TABACO**DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE COTININA EN EMBARAZADAS**

Carácter Estrictamente Confidencial y Reservado - Ley N°17.622

EDAD (AÑOS):**PERÍODO GESTACIONAL (SEMANAS):****N° DE HIJOS (N°):****IDENTIFICACIÓN**

Zona de Residencia	N° Establecimiento	N° Paciente	N° Consulta	N° de protocolo

En las siguientes secciones, marque con una X, la situación que mejor la identifique:

A- Educación

¿Cuál es el máximo nivel educativo que alcanzó?

1. Sin educación
2. Primaria incompleta
3. Primaria completa
4. Secundaria incompleta
5. Secundaria completa
6. Terciaria Incompleta
7. Terciaria completa
8. Universitaria Incompleta
9. Universitaria completa
10. Postgrado Universitario

C- Tabaco

Especificar su situación actual

1. Ahora fumo, y fumo lo mismo que antes de enterarme que estaba embarazada.
2. Ahora fumo, pero menos desde que me enteré que estaba embarazada.
3. Fumo de vez en cuando.
4. Dejé de fumar cuando me enteré que estaba embarazada.
5. No fumaba cuando me enteré del embarazo, ni tampoco ahora.

*Rozenek M., Alderete M., Braun S,
Pezzano L. Patrocinio Beca Carrillo Oñativia.
Ministerio de salud de la Nación. 2007*

Si contesta afirmativamente ítems 1,2 o 3, continúa en:

F- Dependencia física de la nicotina**B- Trabajo**

A. Durante la semana pasada, ¿trabajó por lo menos una hora, sin contar las tareas de su hogar?

 Sí No

¿Cuántas horas trabajó la semana pasada?

(N°) ¿Cuántas en ambientes cerrados? ¿Cuántas en ambientes abiertos?

B. ¿Cuál es su función dentro de la institución?

1. Operario
2. Personal de servicios (limpieza, cocina, maestranza)
3. Personal administrativo
4. Personal técnico/profesional
5. Gerente de área
6. Directivo de la institución
7. Otro: especifique cual

D- Humo Ambiental de Tabaco o Humo de Segunda Mano (HTA)

1. ¿Usted cree que el humo de cigarrillo en el ambiente es perjudicial para las personas que no fuman?

 Sí No No se No estoy segura

2. Si usted es fumadora, ¿fuma en su lugar de trabajo?

 Sí Número de cigarrillos/día:

3. Durante los últimos siete días, ¿en cuántas ocasiones hubo gente que fumó delante suyo, en su trabajo ó en su casa?

 Nunca Uno o dos días Tres o cuatro días Cinco o seis días Siete días

F- Dependencia física de la nicotina en embarazadas que contestaron afirmativamente los ítems 1, 2 o 3 (C- Tabaco)

Marque con un círculo, en el

puntaje, la respuesta que la identifique

	PUNTAJE
1. ¿Cuánto tiempo transcurre desde que se levanta hasta el primer cigarrillo?	
Menos de 30 minutos	1
Más de 30 minutos	0
2. ¿Tiene dificultades para no fumar en los lugares donde está prohibido (iglesia, biblioteca, cine, etc)?	
Sí	1
No	0
3. ¿Qué cigarrillo le costará más suprimir?	
El primero de la mañana	1
Cualquier otro	0
4. ¿Cuántos cigarrillos fuma al día?	
15 o menos	0
16-25	1
26 o más	2
5. ¿Fuma más frecuentemente durante las primeras horas del día que durante el resto del día?	
Sí	1
No	0
6. ¿Fuma cuando debe guardar cama por una enfermedad la mayor parte del día?	
Sí	1
No	0
7. ¿Cuál es el nivel de nicotina de su marca de tabaco actual?	
0.9 mg o menos	0
1.0 - 1.2 mg	1
1.3 mg o más	2
8. ¿Inhala el humo?	
Nunca	0
A veces	1
Siempre	2
Total	

Anexo II. Consentimiento

DIAGNÓSTICO REGIONAL DE RIESGOS EN EL CONSUMO DEL TABACO DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE COTININA EN EMBARAZADAS

El tabaquismo es hoy en el mundo la principal causa de muerte evitable.

Se desconoce cuántas embarazadas de ellas continúan fumando durante el embarazo, conviven con fumadores o pasan gran parte de su tiempo en lugares cerrados con personas que fuman.

Los riesgos del tabaquismo maternal activo o pasivo durante el embarazo están bien establecidos. Entre los efectos adversos se observan: recién nacidos con bajo peso para su edad gestacional, aumento de la mortalidad perinatal, aumento de la incidencia de abortos espontáneos, daños al aparato respiratorio del recién nacido tales como disminución de la compliance pulmonar, de la capacidad residual funcional y de la capacidad vital forzada así como también aumento de la susceptibilidad a las infecciones respiratorias y al asma, síndrome de muerte súbita del lactante. Los efectos nocivos mencionados pueden presentarse tanto en el feto y el recién nacido como en la vida post-natal.

En los últimos años, se le ha dado gran trascendencia a la problemática del fumador pasivo, ya que está científicamente comprobada la alta probabilidad que tiene el mismo de padecer las patologías que son habituales en el fumador activo. Una medida de la exposición al Humo Tabaco Ambiental (HTA) lo dan los valores de cotinina metabolito de la nicotina en orina. La gestación representa en sí misma una motivación significativa para abandonar el hábito de fumar en las poblaciones estudiadas, pero esta motivación se ve perjudicada, en el caso del tabaquismo, por la convivencia con fumadores.

Las mujeres embarazadas actualmente no están contempladas dentro de de las encuestas periódicas sobre tabaquismo, y no se conoce con precisión cuál es la proporción de ellas que fuman durante el embarazo. Determinar las características particulares de este grupo podría contribuir a mejorar el diseño de las intervenciones para dejar de fumar durante el embarazo y para mantener el cambio de conducta después del mismo.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Si usted acepta participar:

- Se procederá a completar un cuestionario individual de tipo estructurado y carácter estrictamente confidencial y reservado – Ley Nº 17.622 (edad, meses de gestación, hábitos de fumar, exposición al humo ambiental, etc.)

- Se recogerá una muestra de orina para la determinación del nivel de cotinina, metabolito urinario de la nicotina, al efecto de tener una medida cualitativa del grado de exposición al H.T.A.

- De acuerdo a la bibliografía consultada, se puede agrupar a la población en estudio en cuatro conjuntos: “no fumadores, no expuestos” (menores a 15,2ng/ml); “no fumadores, moderadamente expuestos” (entre 15,2ng/ml y 50ng/ml); “no fumadores con exposición más severa” (entre 50ng/ml y 100ng/ml); y “fumadores activos” o “pasivos intensamente expuestos”, que se considera que tienen el mismo riesgo que los fumadores activos de sufrir las patologías derivadas del consumo del tabaco (más de 100ng/ml).

- Se utilizará la metodología de Quimioluminiscencia, en un sistema Immulite 1000, con kits de reactivos de la firma D.P.C. (Dianostig Products Corporation).

- Los análisis serán procesados por duplicado.

- Se informará individualmente a los familiares de los resultados obtenidos y las medidas preventivas a tomar en los casos de análisis con valores significativos de cotinina.

SOLICITUD DE CONSENTIMIENTO

Dando cumplimiento a la Ley 25.326 sobre “Protección de los datos personales” y de acuerdo al artículo 8° de la misma sobre “Datos relativos a la salud”, el Equipo de Proyecto PID 9059 solicita el consentimiento para realizar el cuestionario individual y obtener la muestra de orina para la determinación de cotinina y se compromete a cumplir con el artículo 10° de dicha ley en lo referente a “Deber de confidencialidad”, aclarando expresamente que los costos generados por dicho estudio serán cubiertos en su totalidad por el Equipo de Proyecto PID 9059.

ACEPTACIÓN

.....,

DNI N°, autoriza al Equipo de Proyecto PID 9059 a realizar el cuestionario individual y la determinación de cotinina en una muestra de orina, así como también hacer uso de los datos obtenidos en este estudio.

aún más intensa o que se trate de fumadoras activas que no manifestaron esta situación en el cuestionario informativo.

Los resultados se analizaron teniendo en cuenta la concurrencia de las embarazadas a centros de salud públicos y privados con el fin de observar si el acceso diferenciado al sistema de salud y el nivel educacional que tienen las embarazadas se reflejan en su conocimiento respecto del riesgo que presenta el hábito tabáquico y la exposición al HTA (Goldaracena y col. 2013a; 2014).

Resultados

Las embarazadas que acudieron a los centros públicos se distribuyeron según el cuestionario informativo en un 32 % (n=95) como no fumadoras no expuestas, un 46 % (n=136) como fumadoras pasivas y un 22 % (n=64) como fumadoras activas. En el centro privado, la distribución fue de 32 % (n=47), 62 % (n=92) y 6 % (n=9) respectivamente (Tabla 1).

Los análisis de los niveles de cotinina en las embarazadas que declararon ser fumadoras pasivas, revelan que el 82 % (n=112) en los

Tabla 1. Distribución de las embarazadas, según el hábito tabáquico y la exposición al HTA, que concurren a los centros de control prenatal públicos y privados de la ciudad de Gualeguaychú, Entre Ríos. Período 2011-2013.

Hábito tabáquico y exposición al HTA	CENTROS PÚBLICOS		CENTRO PRIVADO		TOTALES	
	n	%	n	%	n	%
No fumadoras, no expuestas	95	32	47	32	142	32
Fumadoras pasivas	136	46	92	62	228	51
Fumadoras activas	64	22	9	6	73	17
TOTALES	295	100	148	100	443	100

Tabla 2. Distribución de nivel de cotinina en embarazadas, no fumadoras expuestas al HTA, que concurren a los centros de control prenatal públicos y privados de la ciudad de Gualeguaychú, Entre Ríos. Período 2011-2013.

Nivel de cotinina (ng/ml)	CENTROS PÚBLICOS		CENTRO PRIVADO		TOTALES	
	n	%	n	%	n	%
Menos de 15,2	24	18	53	58	77	34
Más de 15,2	112	82	39	42	151	66
TOTALES	136	100	92	100	228	100

Tabla 3. Distribución de nivel de cotinina en embarazadas expuestas al HTA, que concurren a los centros de control prenatal públicos y privados de la ciudad de Gualeguaychú. Entre Ríos. Período 2011-2013.

Nivel de cotinina (ng/ml)	CENTROS PÚBLICOS		CENTRO PRIVADO		TOTALES	
	n	%	n	%	n	%
Menos de 15,2	24	18	53	58	77	34
Entre 15,2 y 50	87	64	28	30	115	50
Entre 50 y 100	15	11	6	7	21	9
Más de 100	10	7	5	5	15	7
TOTALES	136	100	92	100	228	100

centros públicos y el 42 % (n=39) en el centro privado, presentan un nivel de cotinina superior a 15,2 ng/ml (Tabla 2).

La Tabla 3 muestra que el 93 % (n=213) del total de embarazadas encuestadas en ambos centros que manifestaron estar expuestas al HTA, posee valores menores a los 100 ng/ml.

Se puede observar la representación gráfica de los promedios de cotinina, en los centros de salud públicos (Figura 2) y privado (Figura 3) evaluados, de las embarazadas que declararon estar expuestas al HTA en las cuatro situaciones planteadas de exposición (Anexo I). El promedio general de cotinina en el grupo de gestantes pertenecientes a los centros públicos fue de 33,8 ng/ml y en el grupo perteneciente al centro privado, fue de 37,7 ng/ml.

Discusión y conclusiones

El análisis de las respuestas obtenidas en el cuestionario informativo indicó un porcentaje mayor de fumadoras activas en los centros de salud públicos que en el centro privado, mientras que el porcentaje que declaró ser fumadoras pasivas resultó ser mayor en el último.

El análisis de los valores de cotinina del grupo de fumadoras pasivas permitió deducir que en los centros públicos hay una mejor correlación entre lo autodeclarado y los valores hallados de cotinina. En los centros públicos un 46 % de las embarazadas (n=136), manifestó estar expuesta y el 82 % (n=112) de las mismas tenía valores de cotinina urinaria que coincidían con lo expresado, por lo que se observa que del total de las evaluadas en dichos centros (n=295) el 38 % presentaba valores de cotini-

na que indicaba exposición real al HTA. En el centro privado del 62 % (n=92) de las embarazadas que autodeclaró ser fumadora pasiva, el 42 % (n=39) presentaba valores del indicador que denotaban exposición a los productos tóxicos del tabaco, lo que representa un 26 % del total de las embarazadas evaluadas en dicho centro. Muchas veces la información autodeclarada no es fiable y en este estudio se ve reflejado en especial en el centro privado, por lo que la medición de cotinina resulta de mucha utilidad para tener datos fidedignos de exposición pasiva. El promedio general de todas las embarazadas que declararon estar expuestas es de 33,8 ng/ml en los centros públicos y de 37,7 ng/ml en el centro privado, superiores en ambos casos al valor referencial para no fumadoras no expuestas de 15,2 ng/ml.

En cuanto a los valores de cotinina según los días de exposición, se observó un aumento en los promedios del indicador a medida que aumentan los días. Esto nos indica que al aumentar el tiempo de exposición al HTA, se incrementa el riesgo de padecer los efectos deletéreos de las sustancias tóxicas del tabaco, por parte de la madre y de su hijo en gestación. El valor promedio de cotinina obtenido en las embarazadas que declararon estar los últimos siete días expuestas es indicativo de una marcada exposición a los productos tóxicos del tabaco. En esta situación el dosaje de cotinina serviría

para alertar a la embarazada sobre los posibles daños en su salud y la de su hijo en formación que podría originar esta exposición pasiva.

El porcentaje de las embarazadas que manifestaron ser fumadoras activas (22 % en los centros públicos y 6 % en el privado), sumado a los porcentajes de las que se autodeclararon fumadoras pasivas con valores de cotinina que confirman esta situación (38 % y 26 %) denotan cifras marcadoras de embarazadas en riesgo de sufrir los efectos tóxicos del HTA: 60 % en los centros públicos y 32 % en el centro privado.

El 93 % de las embarazadas que manifestaron estar expuestas, tenía valores de cotinina urinaria menor a los 100 ng/ml, lo que coincide con la mayoría de las citas bibliográficas consultadas (Pérez Trullén y col. 2004; Kaplan y col. 2006; Vacchino y col. 2006b; Malafatti y Martins 2009).

El marcado interés y la preocupación manifestada por las embarazadas que participaron en el estudio por las implicancias negativas del hábito de tabaco activo o la exposición involuntaria al HTA, sobre la salud de ellas y los posibles efectos sobre la de sus hijos, indica que la implementación de este tipo de trabajo puede contribuir muy positivamente a las campañas de prevención en contra del consumo de tabaco y también promover el derecho de aquellos que no fuman, a vivir en ambientes saludables libres de los compuestos tóxicos del mismo.

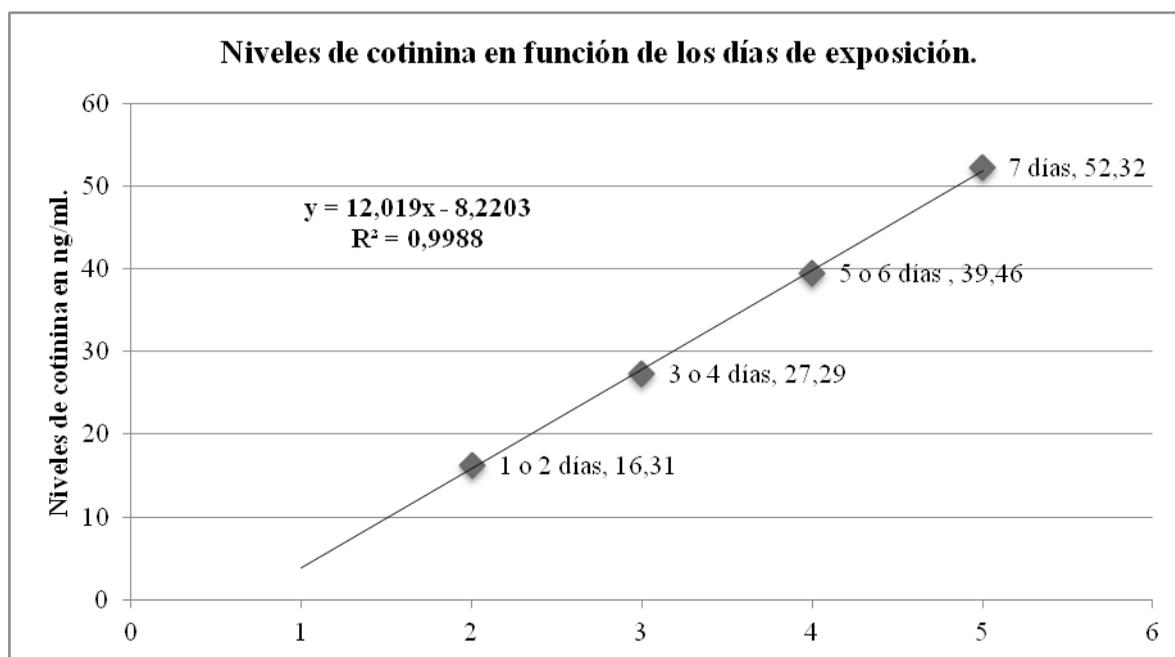


Figura 2. Niveles de cotinina en función de los días de exposición en centros públicos de la ciudad de Gualeguaychú. Entre Ríos. Periodo 2011-2013.

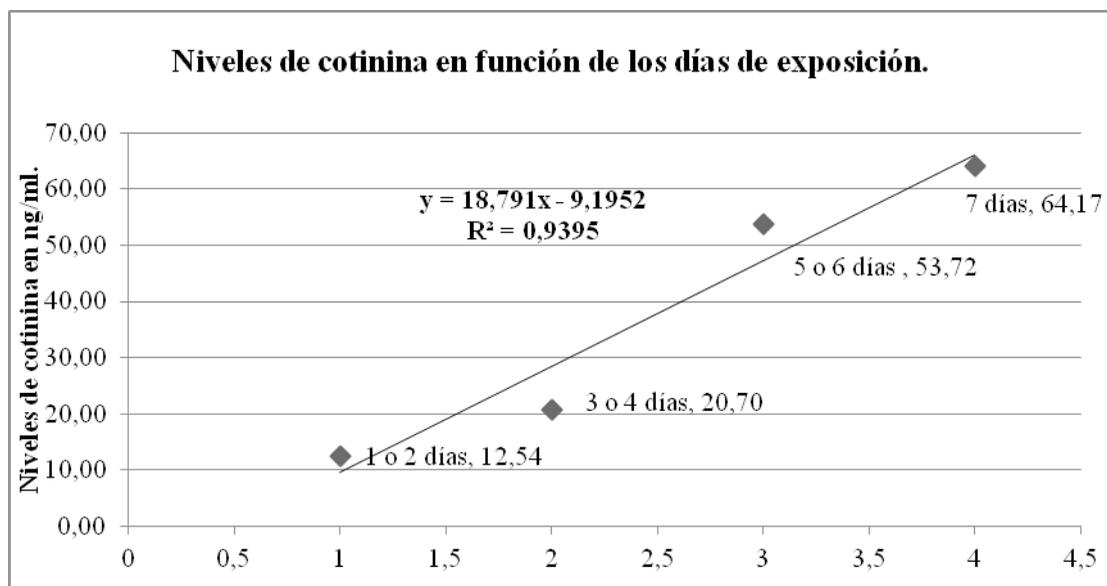


Figura 3. Niveles de cotinina en función de los días de exposición en centro privado de la ciudad de Gualeguaychú, Entre Ríos. Periodo 2011-2013.

Bibliografía citada

Área de Investigación de la SAC, Consejo de Epidemiología y Prevención Cardiovascular de la SAC, Área del Interior de la SAC, Fundación Cardiológico Argentina. Estudio REDIFA (Relevamiento de los Distritos de la Sociedad Argentina de Cardiología de los Factores de riesgo coronario). Prevalencia de los factores de riesgo coronario en una muestra de la población argentina. *Rev Argen Cardiol.* 2002;70:300-11.

Banegas J.R., Estapé J., González-Enríquez J., López García-Aranda V., Pardell H., Salvador T., Sánchez Agudo L., Villalbi J.R. Exposición involuntaria al humo ambiental del Tabaco. Revisión actualizada y posibilidades de actuación. *Semergen,* 1998;25(8):702-711.

Benowitz N. Cotinine as a Biomarker of Environmental Tobacco Smoke Exposure. *Epidemiol Rev.* 1996; 18(2):188-203.

Comisión de Tabaquismo. Consenso de Prevención Primaria y Secundaria de la Enfermedad Coronaria. *Rev Argen Cardiol.* 2001;69:12-21.

Crowley D.S., Geary M. Passive smoking in pregnancy [letter]. *Br Med J.* 1998;316 (7149):1981-2.

Di Franza J., Lew R. Effect of maternal cigarette smoking on pregnancy complications and sudden infant death syndrome. *J Fam Pract.* 1995;40(4):385-94.

Ellard G.A., Johnstone F.D., Priscott R.J., Ji Xian W., Jian Hua M. Smoking during pregnancy: the dose dependence of birthweight deficits. *Br J Obstet Gynaecol.* 1996;103(8):806-13.

Ferris Tortajada J., Alonso López Andreu J., García Castell J., Pérez Tarazona S., Cortell Aznar I. Enfermedades pediátricas asociadas al tabaquismo pasivo. *An Esp Pediatr.* 1998;49(4):339-347.

Flórez S., Solano S., Granda J.I., Jiménez C.A. Enfermedades asociadas al tabaquismo pasivo. *Rev Patol Respir.* 2001;3:98-103.

Fortier I., Marcoux S., Brisson J. Passive smoking during pregnancy and the risk of delivering a small-for-gestational-age infant. *Am J Epidemiol.* 1994;139(3):294-301.

Goldaracena C.A., Taus M.R., Farabello S.P., Grenóvero M.S., Piaggio N., Piaggio O., Raffo A.C., Larrivey A. Cotinina urinaria en mujeres embarazadas fumadoras activas y pasivas. *Prevención del Tabaquismo.* 2013a;15(4):149-156.

Goldaracena C.A., Taus M.R., Farabello S.P., Grenóvero M.S., Raffo A.C., Piaggio O., Piaggio N. Vigilancia epidemiológica en mujeres embarazadas para control de riesgos en el consumo de tabaco en la ciudad de Gualeguaychú. Reseña. En prensa. Revista Ciencia, Docencia y Tecnología. EDUNER, 2014

Goldaracena C.A., Taus M.R., Piaggio N., Farabello S.P., Pancrazio G., Piaggio R. Valores de referencia de cotinina urinaria en población no expuesta al Humo de Tabaco Ambiental en la ciudad de Gualeguaychú. XII Congreso Nacional Bioquímico. 70° Congreso Argentino de Bioquímica. CUBRA – ABA 2013b. 9 al 11 de octubre de 2013. Buenos Aires, Argentina.

Grupo Tabaquismo. Tabaquismo. Consenso. Arch. argent. pediatr. [revista en la Internet]. 2005 [consulta: 7 de diciembre de 2012]; 103(5):450-475. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-00752005000500014&lng=es.

Gueguen C., Lagrue G., Jause Marec J. Effect of smoking on the fetus and child during pregnancy. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 1995;24(8): 853-9.

Hu F., Persky V., Flay B., Zelli A., Cooksey J., Richardson J. Prevalence of asthma and wheezing in public schoolchildren: association with maternal smoking during pregnancy. Ann Allergy Asthma Immunol. 1997;79(1):80-4.

Kaplan J. Tabaquismo pasivo: Medición del grado de exposición infantil y el impacto de una "no intervención" específica. Fundación Cáncer (FUCA). En: Epidemia del Tabaquismo en Argentina. Estrategias de control. Publicación del Ministerio de Salud de la República Argentina, 2006.

Kuo H.W., Yang J.S., Chiu M.C. Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and, enzyme-linked immunosorbent assay. J Chromatogr B. 2002; 769:297-303.

Lazzaroni F., Bonassi S., Maniello E., Morcaldi L., Repetto E., Ruoco A. Effect of passive smoking during pregnancy on selected perinatal parameters. Int J Epidemiol. 1990; 19 (4): 960-6.

Lorenzo P., Ladero J.M., Leza J.C., Lizasoain

I. Sección X: Tabaco y Nicotina. En Drogodependencia. Ed. Médica Panamericana, Bs. As., Argentina, 2009, pp. 497-514.

Lumley J., Oliver S.S., Chamberlain C., Oakley L. Intervenciones para promover el abandono del hábito de fumar durante el embarazo (Revisión Cochrane traducida). [consulta: 7 de diciembre 2012]. En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2008 Número 4. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de The Cochrane Library, 2008 Issue 3. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.)

Malafatti L., Martins I. Marcadores analíticos da determinação de Cotinina em matrizes Biológicas. Rev Bras Toxicol. 2009;22(1-2):9-20.

Man C.H., Gam L.H., Ismail R., Awang R. Simple rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B. 2005;844:322-327.

Ministerio de Salud. Departamento de Promoción de la Salud. Salud sin Tabaco. Guía Técnica-Metodológica. Programa Ambientes Libres de Humo de Tabaco, 2001.

Morello P., Dugga A., Hoover A.(jr). ¿Qué opinan los adolescentes de Capital Federal? Am J Pub Health. 2001;91:219-224.

Mori y Asociados. Encuesta sobre tabaquismo en Capital Federal y Gran Buenos Aires. 1996.

Odoze C., Puli A.M., Pastor J. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of nicotine and cotinine in nonsmoker human and rat urines. J Chromatogr B. 1998;708:95-101.

Organización Mundial de la Salud (OMS). Prevención y control de las enfermedades no transmisibles: aplicación de la estrategia Mundial. 61ª Asamblea Mundial de la salud. A61/8, 2008.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). Epidemia de tabaquismo. Dimensiones sanitarias. Hoja informativa. Mayo 1998; (154)

Pardell H., Salto E., Salleras L.I. Manual diagnóstico y tratamiento del tabaquismo. Editorial Médica Panamericana, Madrid, 1996. 203 p.

Perez Jiménez T., Gómez de Paz M., Luna Rodríguez O., Pomo González M. Algunos factores de riesgos conocidos en enfermedades crónicas no transmisibles. *Gaceta Médica Espirituana*. 2008;10(2).

Pérez Trullén A., Bartolomé C.B., Barrueco Ferrero M., Herrero I., Jiménez Ruiz C.A. Nuevas perspectivas en el diagnóstico y evolución del consumo de tabaco: Marcadores de exposición. *Prevención del Tabaquismo*, 2006;8(4):164-173.

Pérez Trullén A., Herrero I., Clemente M.L., Marrón R. Marcadores Biológicos y Funcionales para la determinación de exposición y evolución de los fumadores. En: Jiménez A, Fagerstrom K. *Tratado de Tabaquismo*. Grupo Aula Médica, Madrid, 2004, pp. 299-314.

Play E.A.; Wouters E.J.; Voorhorst F.J.; Stolte S.B.; Kurver P.H.; de Jong P.A. Assesment of tobacco-exposure during pregnancy; behavioral an biochemical changes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1991;40(3):197-201.

Roquer J., Figueras J., Botet F., Jimenez R. Influence on fetal growth of exposure to tobacco smoke during pregnancy. *Acta Paediatr*. 1995;84(2):118-21.

Seidman D.S.; Mashiach S. Involuntary smo-

king and pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1991;41(2):105-6.

Siemens [en línea]. Nicotina Metabolito: Kit para la Medición en orina y suero de cotinina en sistemas de analizadores IMMULITE 1000. [actualizado al 20 de Noviembre de 2012; consulta: 4 de diciembre de 2012]. Disponible en: www.siemmens.com/diagnostics.

Tager I.B.; Ngo L.; Hanrahan J.P. Maternal smoking during pregnancy effect on lung function during the first 18 months of life. *Am Rev Respir Dis*. 1995;152(3):977-83.

Thaqi A., Franke G.K., Merkel G., Wichmann H.E., Heinrich J. Biomarkers of exposure to passive smoking of school frequency and determinants. *Indoor Air*. 2005;15(5):302-10.

Vacchino M.N., Velurtas S.M., Salinas G.P., Colino M.C. Biomarcadores de Exposición a Tabaco Ambiental en Argentina. *Acta Toxicol Argent*. 2006a; 14:73-74.

Vacchino M.N., Velurtas S.M., Salinas G.P., Garcialoredo H.H. Determinación de cotinina y exposición a tabaco. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. [en línea]. 2006b [consulta 7 de diciembre 2012]; 40(2):181-185. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S032529572006000200004&lng=es

Histo-cytological responses of the prolactin cells of the catfish *Heteropneustes fossilis* to cadmium exposure

Respuesta histológica y citológica frente a la exposición a cadmio de las células prolactínicas del pez gato *Heteropneustes fossilis*

Srivastav, A.K.^{1*}; Rai, Rubi¹; Mishra, D.²; Srivastav, S. K.¹; Suzuki, Nobuo³

¹Department of Zoology, D.D.U. Gorakhpur University, Gorakhpur 273 009, India. ²Department of Zoology, Government Girls P.G. College, Ghazipur, (U.P.), India. ³Noto Marine Laboratory, Institute of Nature and Environmental Technology, Kanazawa University, Ogi, Noto-cho, Ishikawa 927-0553, Japan.

*ajaiksrivastav@hotmail.com

Recibido: 31 de enero de 2014

Aceptado: 17 de julio de 2014

Abstract. Cadmium is an important metal for modern industrial processes and, being biologically non-essential, poses health hazards to the organisms. In this study we aimed to evaluate the effect of cadmium exposure on the histo-cytology of prolactin cells in the freshwater catfish, *Heteropneustes (H.) fossilis*. Fish were subjected to 288 mg/L (0.8 of 96 h LC₅₀) and 72 mg/L (0.2 of 96 h LC₅₀) of cadmium chloride for short-term and long-term, respectively. After sacrificing the fish, the blood was collected on 24, 48, 72 and 96 h in short-term and after 7, 14, 21, and 28 days in long-term experiment and analyzed for plasma calcium levels. Also, pituitary glands were fixed on these intervals. The plasma calcium levels of short-term cadmium exposed fish remain unchanged after 24 h. The levels exhibit a progressive decrease from 48 h onwards. The fish exposed to cadmium for 7 days exhibit a decrease in the plasma calcium level. Thereafter, the levels progressively decrease till the end of the experiment (28 days). The prolactin cells of the control fish exhibit structural resemblance to the description given for the prolactin cells of normal *H. fossilis*. No change in the histological structure and nuclear volume of prolactin cells of cadmium non-exposed fish has been noticed throughout the experiment. In cadmium treated fish, the prolactin cells remain unchanged till 14 days. On day 21, the nuclear volume of these cells exhibits an increase and the cells degranulate. These changes increased profoundly on day 28. In addition, vacuolization and cytolysis were also encountered on day 28 following cadmium treatment. It is concluded that cadmium affects the prolactin cells of the fish *H. fossilis* thus disturbing the ionic balance.

Keywords: Cadmium; Fish; Prolactin; Pituitary gland

Resumen. El cadmio es un metal importante para los procesos industriales modernos, siendo no esencial biológicamente, representa riesgos para la salud de organismos. En este estudio tratamos de evaluar el efecto de la exposición al cadmio por el aspecto histológico y citológico de células secretoras de prolactinas del pez gato de agua dulce *Heteropneustes (H.) fossilis*. Los peces fueron sometidos a una exposición de 288 mg/L (0,8 de 96 h CL₅₀) and 72 mg/L (0,2 de 96 h CL₅₀) de cloruro de cadmio por a corto y largo término respectivamente. Después del sacrificio de los peces, la sangre fue colectada, tomando muestras de 24, 48, 72 y 96 hs en el corto término y de 7, 14, 21 y 28 días en las sometidas a largo término, la cuales se analizaron para medir niveles de calcio. Además, las glándulas pituitarias fueron fijadas en esos intervalos El nivel plasmático de calcio en los experimentos de exposición a corto tiempo se mantuvo sin cambio tras 24 h. Los niveles exhibieron una caída progresiva a partir de las 48 hs. Los peces expuestos a cadmio por 7 días presentaron una disminución en el nivel plasmático de calcio.

Después de esto, los niveles decayeron progresivamente hasta el fin del experimento (28 días). Las células prolactínicas de los peces controles mostraron semejanza estructural a la descripción dada para estas células normales en *H. fossilis*.

No se observaron cambios en la estructura histológica y el volumen nuclear de las células prolactínicas de los peces no expuestos a cadmio a través de todo el experimento. En los peces tratados con cadmio las células prolactínicas se mantuvieron sin cambios hasta los 14 días. En el día 21, el volumen nuclear de esas células se incrementó y estas células presentaron desgranulación. Estos cambios aumentaron profundamente en las muestras del día 28. Adicionalmente en el día 28 posterior al tratamiento con cadmio se encontró vacuolización y citólisis. Se concluyó en que el Cadmio afecta las células prolactínicas de *H. fossilis*, produciendo disturbios en el balance iónico.

Palabras clave: Cadmio; Peces; Prolactina; Glándula pituitaria.

Introduction

Cadmium is an important metal for modern industrial processes and being biologically non-essential poses health hazards to the organisms. The toxic effects of cadmium have been investigated in mammals (Jarup 2003; Johansen *et al.* 2006), amphibians (Othman *et al.* 2009; Sparling and Fellers 2009; Jia *et al.* 2010) and fish (Chan and Cheng 2003; Lacroix and Hontela 2004; Metz *et al.* 2005; Sennger *et al.* 2006; Isani *et al.* 2009; Wu *et al.* 2009; Poleksic *et al.* 2010; Kalman *et al.* 2010; Brunelli *et al.* 2011). Fish, inhabiting a complex and diverse environment, are particularly more susceptible to environmental contamination as they are exposed to aquatic toxicants through their extensive and delicate respiratory surface of the gill (Wendelaar Bonga 1997). After entering into an animal's physiological system, cadmium accumulates in various tissues (Hilmy *et al.* 1985; Rani 2000; Bervoets *et al.* 2001; Rashed 2001; Szebedinszky *et al.* 2001; Pillai *et al.* 2002) and causes serious damage to vital organs.

Although few reports are available regarding the effects of toxicants on the endocrine gland regulates calcium homeostasis in fish (Fu *et al.* 1989; Srivastav *et al.* 2002), the effects of cadmium is least studied in this group with regard to similar aspect. Hence, in this study we aimed to evaluate the effect of cadmium exposure on the histo-cytology of prolactin cells in the fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch, 1794) (Siluriformes, Heteropneustidae).

Materials and Methods

Live freshwater catfish *H. fossilis* (body weight 37-44 g) were collected and acclimatized for 15 days in plastic pools. The experiments were run for short-term (for 96h; by using 0.8 of 96h LC50 value of cadmium chloride i.e. 288 mg/L), and long-term (for 28 days; by using 0.2 of 96h LC50 value of cadmium chloride i.e. 72 mg/L). Simultaneously, a control group was also used for comparison in both experiments. Fish were kept in groups of 10 in 30 L media. Six fish were killed on each time intervals from control and experimental groups in short-term (24, 48, 72, and 96h) and long-term (7, 14, 21, and 28 days) treatment and blood samples were collected by sectioning of the caudal peduncle. Plasma calcium levels were analyzed by Sigma kits. After collection of blood sample, the pituitary gland along with the brain were fixed in aqueous Bouin's fluid and Bouin's-Hollande

for histological studies. Tissues were routinely processed in graded series of alcohol, cleared in xylene and embedded in paraffin wax. Serial sections were cut at 6- μ m. The pituitaries were stained with Herlant tetrachrome and Heidenhain's azan techniques.

Nuclear indices (maximal length and maximum width) of the prolactin cells (for each fish, 50 randomly nuclei were measured in those cells whose perimeter was clearly discernible in the plane of the section) were taken using ocular micrometer. The nuclear volume was calculated as –

$$\text{volume} = 4/3 \pi ab^2$$

where 'a' is the major semiaxis and 'b' is the minor semiaxis. Student's t test was used to test for significant differences between the control and experimental groups with $P < 0.05$ being accepted as significant.

Results

The plasma calcium levels of the fish exposed to cadmium for 24 h exhibit no change. After 48 h of cadmium exposure, the level records a significant decrease. This response persisted until the end of the experiment (96 h) (Figure 1). The fish exposed to cadmium for 7 days exhibited a decrease in plasma calcium level. There-

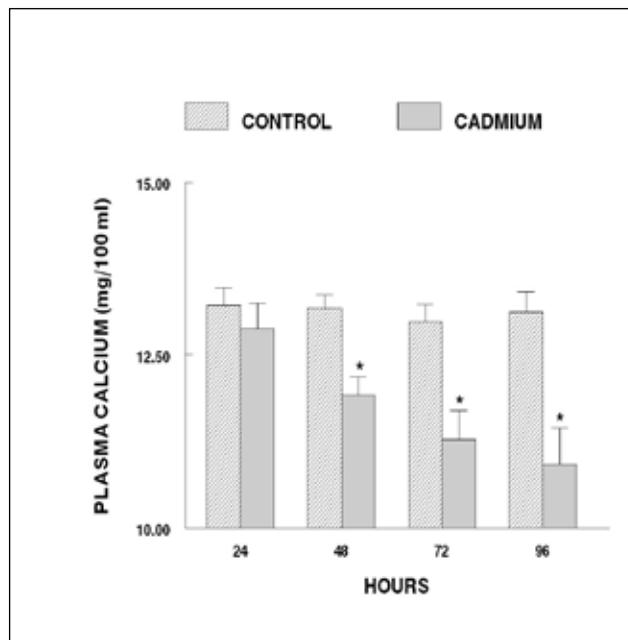


Figure 1. Plasma calcium levels of short-term cadmium chloride treated fish. Values are mean \pm S.E. of six specimens. Asterisk indicates significant differences ($P < 0.05$) from control.

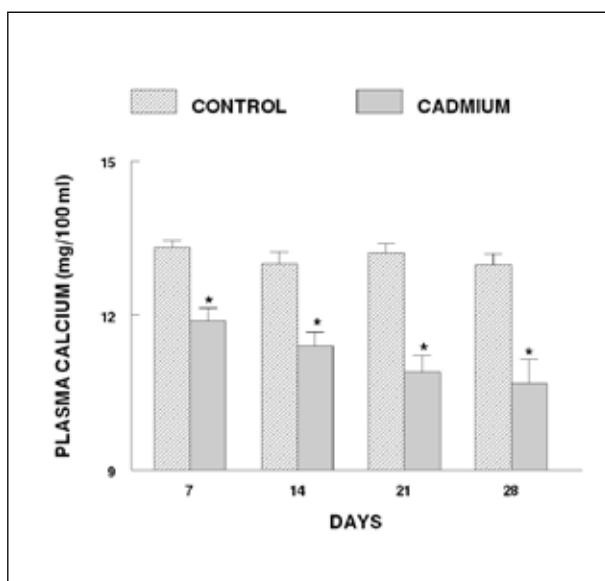


Figure 2. Plasma calcium levels of long-term cadmium chloride treated fish. Values are mean \pm S.E. of six specimens. Asterisk indicates significant differences ($P < 0.05$) from control.

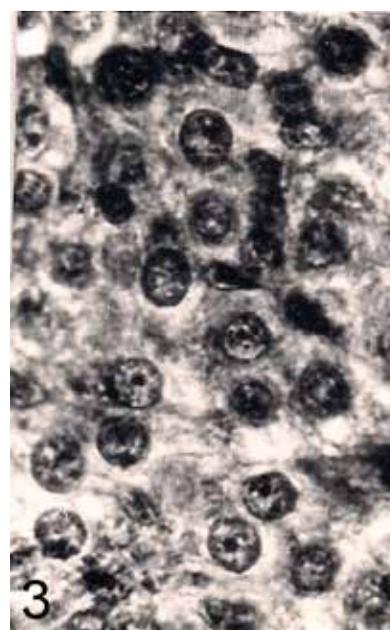


Figure 3. Prolactin cells of control fish. Herlant tetrachrome x 800.

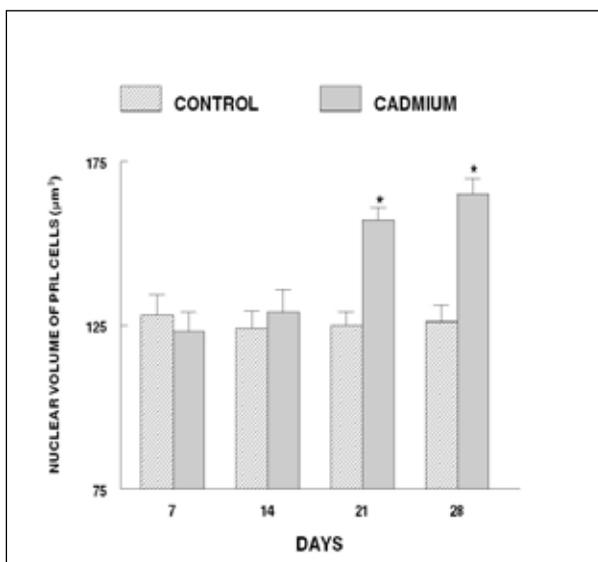


Figure 4. Nuclear volume of prolactin cells of long-term cadmium chloride exposed fish. Each value represents mean \pm S.E. of six specimens. Asterisk indicates significant differences ($P < 0.05$) from control.

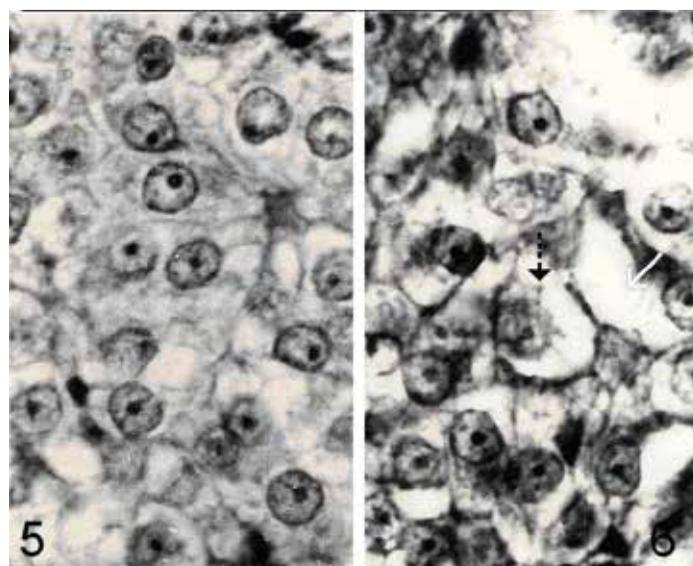


Figure 5. Prolactin cells of 21 days cadmium chloride treated fish exhibiting degranulation. Herlant tetrachrome x 800.

Figure 6. Prolactin cells of 28 days cadmium chloride exposed *Heteropneustes fossilis* showing vacuolization (arrow) and cytolysis. (broken arrow). Herlant tetrachrome x 800.

after, the levels progressively decrease until the end of the experiment (28 days; Figure 2). In control fish, the prolactin cells possess indistinct cell boundaries (Figure 3). However, the nuclei are distinct with dense chromatin granules. The cytoplasm is scanty and azocar-

minophilic and erythrosinophilic in nature. No change in the histological structure and nuclear volume of prolactin cells of cadmium exposed fish has been noticed throughout the short term experiment. In cadmium treated fish the prolactin cells remain unchanged till 14 days. On day

21, the nuclear volume of these cells exhibited a significant increase (Figure 4) and the cells degranulated (Figure 5). These changes increased profoundly on day 28. In addition, vacuolization and cytolysis were also encountered on day 28 following cadmium treatment (Figure 6).

Discussion

Cadmium exposed fish exhibited degranulation and increased nuclear volume of prolactin cells. Prolactin cell activity in response to toxicants has been reported by James and Wigham (1986), Fu *et al.* (1989), Mishra *et al.* (2008, 2011) and Srivastav *et al.* (2010). The present study is in agreement with the observations of earlier investigators who have reported hyperactivity of prolactin cells after exposure of fish to toxicants- cadmium (Fu *et al.* 1989), metacid (Mishra *et al.* 2008), cypermethrin (Mishra *et al.* 2011) and deltamethrin (Srivastav *et al.* 2010). However, James and Wigham (1986) noticed no effect on prolactin cell activity following cadmium injection to rainbow trout. The reports of Meredith *et al.* (1999), Thangavel *et al.* (2005, 2010) and Ramesh *et al.* (2009) supports the observations of this study as elevated levels of prolactin in fish has been recorded after exposure to toxicants. Moreover, it has also been reported that lead exposure to fish *Catla catla* caused a decrease in calcium and phosphate content of bones (Palaniappan *et al.* 2010). Bone demineralization has been reported in cadmium exposed carp (Koyama and Itazawa 1977; Muramoto 1981).

Prolactin has been implicated to produce hypercalcemia in various species of fishes (Pang *et al.* 1978; Wendelaar Bonga and Flik 1982; Flik *et al.* 1986; 1994; Wendelaar Bonga and Pang 1991) mainly by controlling the gill epithelium permeability (Dharmamba and Maetz 1972; Clark and Bern 1980; Wendelaar Bonga *et al.* 1983). In teleosts, prolactin has been reported to control ion uptake mechanisms (Pickford and Phillips 1959; Sakamoto and McCormick 2006). Sakamoto and McCormick (2006) have suggested that prolactin has the ability to control proliferation, differentiation and necrosis/apoptosis of chloride cells. In the present study an increased activity of prolactin cells in cadmium treated *H. fossilis* is indicative of possible action of prolactin on gills, kidney and bones to restore the ionic content of blood.

References

Bervoets L., Blust R., Verheyen R. Accumu-

lation of metals in the tissues of three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) from natural fresh waters. *Ecotoxicology & Environmental Safety*. 2001;48:117-127.

Brunelli E., Mauceri A., Maisano M., Bernabo I., Giannetto A., De Domenico E., Corapi B., Tripepi S., Fasulo S. Ultrastructural and immunohistochemical investigation on the gills of the teleost, *Thalassoma pavo* L., exposed to cadmium. *Acta Histochemica*. 2011;113:201-213.

Chan P.K., Cheng S.H. Cadmium-induced ecotoxic apoptosis in zebrafish embryos. *Archives of Toxicology*. 2003;77:69-79.

Clark W., Bern H.A. Comparative endocrinology of prolactin. In: *Hormonal Proteins and Peptides*, vol. 8 (Li, C.H., ed.), Academic Press, New York; 1980. p. 105-197.

Dharmamba M., Maetz J. Effects of hypophysectomy and prolactin on the sodium balance of *Tilapia mossambica* in freshwater. *General & Comparative Endocrinology*. 1972;19:175-183.

Flik G., Fenwick J.C., Kolar Z., Mayer-Gostan N., Wendelaar Bonga S.E. Effects of ovine prolactin on calcium uptake and distribution in the freshwater cichlid teleost fish, *Oreochromis mossambicus*. *American Journal of Physiology*. 1986;250:161-166.

Flik G., Rentier-Delrue F. Wendelaar Bonga S.E. Calcitropic effects of recombinant prolactins in *Oreochromis mossambicus*. *American Journal of Physiology*. 1994;266:1302-1308.

Fu H., Lock R.A.C. Wendelaar Bonga S.E. Effect of cadmium on prolactin cell activity and plasma electrolytes in the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus*. *Aquatic Toxicology*. 1989;14:295-306.

Hilmy A.M., Shabana M.B., Daabees A.Y. Bioaccumulation of cadmium: toxicity in *Mugil cephalus*. *Comparative Biochemistry & Physiology*. 1985;81:39-144.

Isani G., Andreani G., Cocchioni F., Fedeli D., Carpena E., Falcioni G. Cadmium accumulation and biochemical responses in *Sparus aurata* following sublethal cadmium exposure. *Ecotoxicology & Environmental Safety*. 2009;72:224-230.

- James V.A., Wigham T. The effects of cadmium on prolactin cell activity and plasma cortisol levels in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquatic Toxicology. 1986;8:273-280.
- Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. British Medical Bulletin. 2003;68:167-182.
- Jia X., Shi C., Liu X. Effects of cadmium on oxidative stress and metallothionein of liver of frog, *Rana nigromaculata*. Shengtai Xuebao/Acta Ecologica Sinica. 2010;30:416-420.
- Johansen P., Mulvad G., Pedersen H.S., Hansen J.C. Riget F. Accumulation of cadmium in livers and kidneys in Greenlanders. Science of the Total Environment. 2006;372:58-63.
- Kalman J., Riba I., DelValls T.A., Blasco J. Comparative toxicity of cadmium in the commercial fish species *Sparus aurata* and *Solea senegalensis*. Ecotoxicology & Environmental Safety. 2010;73:306-311.
- Koyama J. Itazawa Y. Effects of oral administration of cadmium on fish. I. Analytical results of the blood and bones. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish. 1977;43:523-526.
- Lacroix A., Hontela A. A comparative assessment of the adrenotoxic effects of cadmium in two teleost species, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and yellow perch, *Perca flavescens*. Aquatic Toxicology. 2004;67:13-21.
- Meredith H.O., Richman N.H., Collier J.T., Seale A.P., Riley L.G., Ball C.H., Shimoda S.K., Stetson M.H., Grau E.G. Pesticide effects on prolactin release from the rostral pars distalis and their effects on growth in the tilapia. In: Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment, 8th Volume, Henshel DS, Black MC, Harrass MC (eds), American Society for Testing and Materials (ASTM), STP 1364, West Conshohocken, PA; 1999. p. 239-253.
- Metz C.J., Treble R.G., Krone P.H. Accumulation and elimination of cadmium in larval stage zebrafish following acute exposure. Ecotoxicology & Environmental Safety. 2005;66:44-48.
- Mishra D., Rai R., Srivastav S.K., Srivastav A.K. Histological alterations in the prolactin cells of a teleost *Heteropneustes fossilis* after exposure to cypermethrin. Environmental Toxicology. 2011;26:359-363.
- Mishra D., Srivastav S.K., Srivastav A.K. Effects of insecticide cypermethrin on plasma calcium and ultimobranchial gland of the teleost *Heteropneustes fossilis*. Ecotoxicology & Environmental Safety. 2005;60:193-197.
- Mishra D., Srivastav S.K., Suzuki N. Srivastav A.K. Prolactin cells of a teleost *Heteropneustes fossilis* intoxicated with metacid-50. International Journal of Biological & Chemical Sciences. 2008;2:339-345.
- Muramoto S. Vertebral column damage and decrease of calcium concentrations in fish exposed experimentally to cadmium. Environmental Pollution (Ser. A). 1981;24:125-133.
- Othman M.S., Khonsue W., Kitana J., Thirakhupt K., Robson M.G., Kitana N. Cadmium accumulation in two populations of rice frogs (*Fejervarya limnocharis*) naturally exposed to different environmental cadmium levels. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology. 2009;83:703-707.
- Palaniappan P.R., Krishnakumar N., Vadivelu M., Vijayasundaram V. The study of the changes in the biochemical and mineral contents of bones of *Catla catla* due to lead intoxication. Environmental Toxicology. 2010;25:61-67.
- Pang P.K.T., Schreiber M.P., Balbontin F., Pang R.K. Prolactin and pituitary control of calcium regulation in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. General & Comparative Endocrinology. 1978;36:306-316.
- Pickford G.E., Phillips J.G. Prolactin, a factor promoting survival of hypophysectomized killifish in freshwater. Science. 1959;130: 454-455.
- Pillai A., Laxmi Priya P.N., Gupta S. Effects of combined exposure to lead and cadmium on pituitary membrane of female rats. Archives of Toxicology. 2002;76:671-675.
- Poleksic V., Lenhardt M., Jaric I., Djordjevic D., Gacic Z., Cvijanovic G. Raskovic B. Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube starlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). Environmental & Toxicological Chemistry. 2010;29:515-521.

- Ramesh M., Saravanan M., Kavitha C. Hormonal responses of the fish, *Cyprinus carpio*, to environmental lead exposure. *African Journal of Biotechnology*. 2009;17:4154-4158.
- Rani A.U. Cadmium-induced bioaccumulation in the selected tissues of a freshwater teleost, *Oreochromis mossambicus* (tilapia). *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;919:318-320.
- Rashed M.N. Cadmium and lead levels in fish (*Tilapia nilotica*) tissues as biological indicator for lake water pollution. *Environmental Monitoring & Assessment*. 2001;68:75-89.
- Sakamoto T., McCormick S.D. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *General & Comparative Endocrinology*. 2006;147:24-30.
- Senger M.R., Rosenberg D.B., Rico E.P., de Bem Arizi M., Dias R.D. Bogo M.R., Bonan C.D. In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicology*. 2006;20:954-958.
- Sparling D.W., Fellers G.M. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Toxicology & Chemistry*. 2009;28:1698-1703.
- Srivastav A.K., Srivastava S.K., Mishra D., Srivastav S., Srivastav S.K. Ultimobranchial gland of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* in response to deltamethrin treatment. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*. 2002;68:584-591.
- Srivastav A.K., Srivastava S.K., Mishra D., Srivastav S.K., Suzuki N. Effects of deltamethrin on serum calcium and corpuscles of Stannius of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 2009;91:761-772.
- Srivastav A.K., Srivastava S.K., Tripathi S., Mishra D., Srivastav S.K. Chlorpyrifos based commercial formulation: Alterations in corpuscles of Stannius of catfish. *International Journal of Environmental Health*. 2010;4:323-332.
- Srivastav A.K., Srivastava S.K., Mishra D., Srivastav S.K. Deltamethrin-induced alterations in serum calcium and prolactin cells of a freshwater teleost, *Heteropneustes fossilis*. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 2010;92:1857-1864.
- Szebedinszky C., McGeer J.C., McDonald D.G., Wood C.M. Effects of chronic Cd exposure via the diet or water on internal organ-specific distribution and subsequent gill Cd uptake kinetics in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology & Chemistry*. 2001;20: 597-607.
- Thangavel P., Sumathirai K., Karthikeyan S., Ramaswamy M. Endocrine response of the freshwater teleost, *Sarotherodon mossambicus* (Peters) to dimecron exposure. *Chemosphere*. 2005;61:1083-1092.
- Thangavel P., Sumathirai K., Maheshwari S., Rita S., Ramaswamy M. Hormone profile of an edible, freshwater teleost, *Sarotherodon mossambicus* (Peters) under endosulfan toxicity. *Pesticide Biochemistry & Physiology*. 2010;97:229-234.
- Wendelaar Bonga S.E. Flik G. Prolactin and calcium metabolism in a teleost fish *Sarotherodon mossambicus*. In: *Comparative Endocrinology of Calcium Regulation*, Oguro, C. and Pang, P.K.T., eds. *Jpn. Sci. Soc. Press, Tokyo*, 1982. p. 19-26.
- Wendelaar Bonga S.E. Pang P.K.T. Control of calcium regulating hormones in the vertebrates: Parathyroid hormone, calcitonin, prolactin and stanniocalcin. *International Review of Cytology*. 1991;128:139-213.
- Wendelaar Bonga S.E. The stress response in fish. *Physiological Review*. 1997;77:591-625.
- Wendelaar Bonga S.E., Lowik C.J.M., Van der Meij J.C.A. Effects of Mg^{2+} and Ca^{2+} on branchial osmotic water permeability and prolactin secretion in the teleost fish *Sarotherodon mossambicus*. *General & Comparative Endocrinology*. 1983;52:222-231.
- Wu S.M., Jong K.J., Lee Y.J. Relationships among metallothionein, cadmium accumulation and cadmium tolerance in three species of fish. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*. 2009;76:595-600.

REVISIONES

Etanol e isopropanol: genotoxicidad y teratogénesis evaluada aplicando el modelo de *Drosophila melanogaster*

Ethanol and isopropanol: genotoxicity and teratogenicity evaluated using *Drosophila melanogaster* as a model system

Palermo, Ana María^{1*}; Mudry, Marta Dolores²

¹CITEDEF (Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa), JB de La Salle 4397, Villa Martelli, Buenos Aires. Argentina; ²GIBE (Grupo de Investigación en Biología Evolutiva); FCEyN; UBA; IEGEBA-CONICET (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires; Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires; Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas). Ciudad Universitaria, Intendente Güiraldes 2620, Pabellón 2, 4to. Piso, Labs 43-46; (1428EHA) Buenos Aires, Argentina.
apalermo@citedef.gob.ar

Recibido: 13 de noviembre de 2013

Aceptado: 23 de febrero de 2014

Resumen. El etanol y el isopropanol son, de los alcoholes alifáticos de cadena corta, los más frecuentemente asociados a la actividad humana tanto a nivel industrial como en el entorno doméstico. En este trabajo se presentan los principales hallazgos reportados en la literatura para ensayos de genotoxicidad y teratogénesis en modelos experimentales de distinto nivel de complejidad, con especial énfasis en *Drosophila melanogaster*. El metabolismo de estos alcoholes es semejante en *Drosophila* y en humanos por lo cual la mosca es un buen modelo *in vivo* para la evaluación de sus potenciales efectos tóxicos, genotóxicos y teratogénicos.

Palabras clave: Etanol; Isopropanol; Genotoxicidad; Teratogénesis.

Abstract. Ethanol and isopropanol are two of the short chain aliphatic alcohols more frequently associated to the human environment, both in the industrial and domestic conditions. The aim of this work was to present the main findings reported in the literature about their genotoxicity and teratogenicity in experimental models of different level of complexity, with special emphasis in *Drosophila melanogaster*. Taking into account that the metabolism of both alcohols in *Drosophila* and humans is similar, the fly is a good model for the evaluation of their potentially toxic, genotoxic and teratogenic effects.

Keywords: Ethanol; Isopropanol; Genotoxicity; Teratogenicity.

Introducción

La exposición a etanol (EtOH) ocurre principalmente por ser ingrediente activo de bebidas que forman parte de la dieta humana y comparte con el isopropanol (IPA) su uso como solvente y desinfectante. La exposición ambiental no se considera peligrosa para la salud humana ni para el ecosistema, por degradarse ambos fácilmente tanto en aire como en aguas subterráneas y superficiales (Amstrong 1999). Sin embargo, el riesgo ocupacional asociado a la producción de estos alcoholes o sus derivados a nivel industrial, lo mismo que el uso del EtOH como aditivo de naftas y pesticidas, debe ser tenido en cuenta al momento de evaluar los riesgos de su uso. Por otra parte, desde que Jones y Smith (1973) describieron el

síndrome alcohólico fetal (SAF), se considera la primera causa prevenible de defectos congénitos y deficiencia mental.

El metabolismo de estos alcoholes, que es oxidativo, es semejante en *Drosophila melanogaster* y en humanos. Las enzimas del metabolismo hepático (el principal) y extrahepático en humanos son básicamente equivalentes a las de la mosca, con la diferencia de que en esta última ocurre en cada una de las células ya que no poseen un órgano equivalente al hígado (para una revisión completa del metabolismo del etanol en humanos, Aragon y col. 2002; Zakhari 2006). En particular, el modelo del insecto ha sido ampliamente validado para el estudio de adicciones en humanos, con particular atención al etanol por las seme-

janzas entre los sistemas metabólicos de ambos organismos (Guarnieri y Heberlein 2003; Devineni y Heberlein 2012 y 2013; Robinson y col. 2013)

Asimismo, el sistema respiratorio del insecto, que llega directamente a la intimidad de los tejidos, y el carácter volátil de los alcoholes hacen de éste un excelente modelo *in vivo* para la evaluación de los potenciales efectos, genotóxicos y teratogénicos de los alcoholes, sobre todo si se compara con los sistemas bacterianos o los ensayos de corto plazo *in vitro*, que requieren de sistemas de activación metabólica artificiales.

El conocimiento de los efectos genéticos relacionados con la exposición a alcoholes alifáticos de cadena corta como el EtOH y el IPA, es escaso y a veces contradictorio a pesar de su uso muy difundido en el ambiente doméstico (Household Products Database, www.hss.gov) En este trabajo se presentan los principales hallazgos reportados en la literatura para ensayos de genotoxicidad y teratogénesis de ambos alcoholes en modelos experimentales de distinto nivel de complejidad, con especial énfasis en *Drosophila*.

Características principales del modelo

Drosophila melanogaster ha sido por muchos años una herramienta básica en los estudios

de genética y mutagénesis que derivaron en numerosos ensayos para detectar mutágenos y carcinógenos. Si bien las pruebas en bacterias son parte de los sistemas de relevamiento más rápidos, la mayor ventaja de *Drosophila* es su carácter de organismo eucarionte con una organización genética que permite inferencias más fácilmente aplicables al hombre. La activación metabólica de promutágenos y procarcinógenos ocurre en cada una de las células de la mosca y los eventos mutacionales se cuentan como segregaciones reflejando alteraciones genéticas nucleares y eliminando la posibilidad de que sean eventos no nucleares o no mutacionales (Kilbey y col. 1981; Valencia y col. 1984). Su tiempo de generación corto (10 días a 25°C), los caracteres morfológicos fácilmente identificables, la existencia de una diversidad de mutantes y de cepas bien caracterizadas, la facilidad para criar un número grande de individuos con medios de cultivo económicos e instalaciones sencillas, la posibilidad de tratar adultos o larvas y la disponibilidad de diferentes vías de administración (ingestión, inhalación o inyección) son ventajas adicionales (Palermo 2006). La Figura 1 ilustra las fases del ciclo de vida de *Drosophila* y las diferencias que permiten distinguir hembras de machos para realizar cruzamientos controlados.

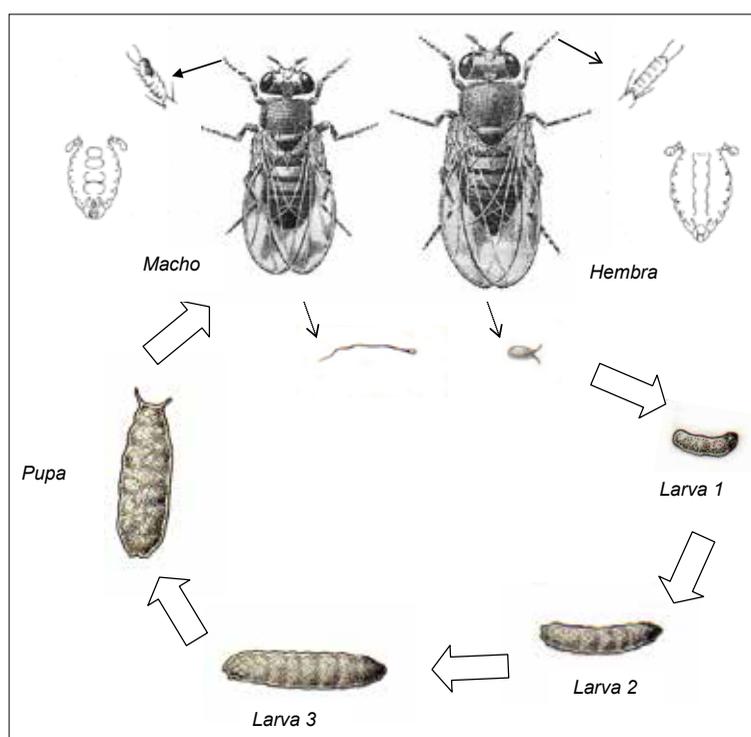


Figura 1. Ciclo de vida de *D. melanogaster*

Tabla 1. Enfermedades de origen relacionado con mutaciones somáticas.

Enfermedad	Tejido(s) involucrado(s)	Gen	Cr.	Mutación(es)
Probadas				
Neurofibromatosis 1	Piel, SNP	<i>Neurofibromina</i>	17	1 micro, 1 macro deleción
Neurofibromatosis 2	SNC	<i>NF2</i>	22	2 sin sentido, 2 de corrimiento de marco de lectura
McCune–Albright	Piel, huesos, SE	<i>GNAS1</i>	20	8 sin sentido, Arg201X
Hemoglobinuria nocturna paroxística	Sangre	<i>PIG-A</i>	X	6 de corrimiento de marco de lectura, 2 sin sentido, 1 de sitio, 1 indel
Incontinentia pigmenti (en ♂)	Piel, ojos, dientes, SNC	<i>NEMO</i>	X	3 reordenamientos intracromosó-micos que eliminan los exones 4-10
Probables				
Proteus	Vascular, huesos	---	---	---
Klippel-Trenaunay	Vascular	---	---	---
Maffucci	Huesos	---	---	---
Mutación en línea somática y germinal				
Osteogénesis imperfecta II	Hueso	<i>COL1A1</i>	17	3 sin sentido
Distrofia muscular de Duchenne	Músculo	<i>Distrofina</i>	X	Deleciones proximales aumentadas en mosaico comparadas con muta-ciones en línea germinal
Síndrome de Hunter	T. conectivo	<i>IDS</i>	X	1 sin sentido
Neurofibromatosis 2	SNC	<i>NF2</i>	22	1 sin sentido
Aracnodactilia contractural congénita	T. conectivo	<i>FBN2</i>	5	1 sitio de procesamiento (“splice”)
Hemofilia	Sangre	<i>HEMA</i>	X	Transiciones CpG
Mosaicismos revertantes				
Epidermolisis bullosa	Piel	<i>COL17A1</i>	10	Conversión génica
Inmunodeficiencia severa combinada para adenosina deaminasa	Linfocitos	<i>ADA</i>	20	Reversión verdadera
Inmunodeficiencia severa combinada liga-da al X	Linfocitos	<i>IL2RG</i>	X	Reversión verdadera
Wiskott-Aldrich	Linfocitos	<i>WAS</i>	X	Inserción de 6pb delecionadas
Fanconi A	SH, riñón, corazón, miembros	<i>FANCA</i>	16	Corrimiento de marco de lectura corregido por 2º corrimiento
Fanconi C	SH, riñón, corazón, miembros	<i>FANCC</i>	9	1 recombinación mitótica y 2 conversiones génicas

Abreviaturas utilizadas: Cr.=cromosoma; SNP=sistema nervioso periférico; SNC=sistema nervioso central; SE=sistema endócrino; SH=sistema hematopoyético; indel=inserción/deleción; Para una descripción de los síntomas de cada enfermedad ver Erickson, 2003.

Drosophila como modelo para el estudio de patologías humanas

La aplicación de enfoques combinados con tecnologías genómicas sugieren que *Drosophila* tiene aún mucho para ofrecer en la investigación de procesos celulares básicos implicados en el desarrollo de cáncer, afecciones neurológicas del tipo Alzheimer o Parkinson, acción de hormonas (insulina), ritmos circadianos, sueño y regulación de apoptosis o respuesta inmune (Lasko 2002; Tickoo y Russell 2002; Hendricks y Sehgal 2004; Kanggo-Singh y Halder 2004; Marshy Thompson 2004). Un análisis detallado de la base de datos *Online Mendelian Inheritance in Man* mostró que el 75% de las enfermedades genéticas tienen secuencias importantes en común con genes de *Drosophila* (Reiter y col. 2001). Los ensayos para la detección de mutación y recombinación somática (*SMART*) desarrollados en la mosca, no sólo permiten caracterizar genotóxicos, sino que son potencialmente útiles para estudiar enfermedades de origen o desarrollo relacionado con mutación y recombinación somática. Ambos procesos pueden tener efectos importantes en las células en las que ocurren: la mutación puede ser letal para la célula o puede desencadenar en ella procesos de transformación; la recombinación puede cambiar las capacidades bioquímicas de la células tal como ocurre en el origen de las inmunoglobulinas o puede poner de manifiesto mutaciones preexistentes que desencadenen procesos de transformación celular (Yu y Lieber 2003). La *Tabla 1* resume las enfermedades originadas en los más diversos tipos de mutaciones somáticas que resultan en mosaicismos, incluidos o no en la línea germinal (Erickson 2003).

Drosophila como modelo para toxicidad

La Toxicología se ocupa del estudio de los efectos adversos de sustancias químicas o agentes físicos sobre los organismos vivos (Toxicology Tutorials en <http://sis.nlm.nih.gov/enviro/toxtutor.html>). En el siglo XX, el descubrimiento del ADN y el estudio de la regulación bioquímica de todas las funciones corporales, llevó a reconocer que virtualmente todos los efectos tóxicos sobre células u órganos son debidos a cambios en moléculas específicas. Los estudios de sustancias que afectaban al ADN o a otros blancos celulares implicados en la división, dieron origen a la Toxicología Genética que vincula los princi-

pios de la Genética con los fundamentos de la Toxicología. Finalmente, los últimos avances en el campo molecular y genético han dado origen a una nueva rama de la Toxicología, la Toxicogenómica, que ha sido definida como “el estudio de las relaciones entre la estructura y la actividad del genoma (el complemento de genes de la célula) y los efectos biológicos de agentes exógenos” (Aardema y MacGregor 2002; Waters y col. 2003).

Es importante tener en cuenta que, cuando se propone estudiar los efectos genotóxicos de un agente, primero debe establecerse cuál es su toxicidad. Para cada agente puede obtenerse una curva dosis-respuesta y a partir de ella extrapolar la toxicidad de una dosis específica, teniendo en cuenta que una toxicidad muy alta puede enmascarar el efecto genotóxico del agente en estudio (Palermo 2006). En *Drosophila* se trabaja en general con la dosis de exposición salvo que se utilice la vía inyectable (dosis administrada) o que se haga dosimetría mediante el uso de compuestos marcados (dosis absorbida). El esquema general de los pasos a seguir en los estudios de toxicidad en *Drosophila* se indica en la *Figura 2*.

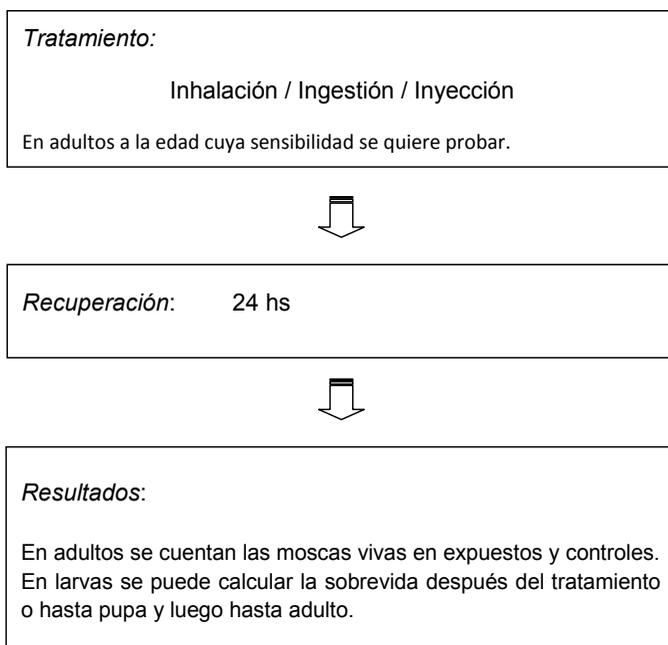


Figura 2. Prueba de toxicidad en *D. melanogaster*

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

Drosophila como modelo en Toxicología Genética

Drosophila es un modelo excelente para estudiar los mecanismos de mutagénesis, con ella se han desarrollado una variedad de ensayos de corto plazo (*ECP*) notablemente útiles para la caracterización de efectos mutágenicos, teratogénicos y/o carcinogénicos. Hasta mediados de los '80, estos ensayos estuvieron restringidos al análisis de daño genético en línea germinal (principalmente masculina), siendo el más utilizado el test de letales recesivos ligados al sexo (*SLRL*: sex-linked recessive lethals), para el que existe una base de datos de más de 750 químicos (Vogel y col. 1999). Otros ensayos disponibles permiten detectar un amplio espectro de daño genético: mutaciones letales recesivas; mutaciones letales dominantes; mutaciones visibles; translocaciones; pérdida o ganancia de cromosomas; no disyunción cromosómica; mutación y recombinación somática (Palermo 2006). Las bases de datos Flybase, (a database of *Drosophila* genes and genomes) y Fruitfly (Berkeley *Drosophila* Genome Project) tienen información genética sobre este organismo.

Los *ECP* de desarrollo más reciente en este organismo estuvieron dirigidos a la detección de mutación y recombinación somática y de aneuploidías, procesos que resultan en cambios cualitativos y/o cuantitativos del genoma de la célula afectada. A partir de los años '80 se reconoció la importancia de la recombinación como mecanismo capaz de originar daño genético (cuando es desigual o cuando actúa como mecanismo post-replicativo de reparación), o de producir pérdida de heterocigosis para el alelo normal de un gen y así, poner de manifiesto mutaciones deletéreas preexistentes. La aneuploidía es un mecanismo que también produce pérdida de heterocigosis en un solo paso y, como la recombinación, se ha convertido en objetivo frecuente de las evaluaciones de genotoxicidad. Por otra parte en el complejo proceso de carcinogénesis se ha reconocido la importancia de la aparición de homocigosis o hemicigosis para mutaciones recesivas deletéreas, como fenómeno temprano o tardío en el proceso de transformación (Graf y col. 1984, 1994, 1998). El ejemplo mejor conocido es el caso del retinoblastoma familiar (Griffith y col. 2002).

Etanol e isopropanol como agentes genotóxicos

La base de datos ChemIDplus Advanced Specialized Information Services, incluida en la red TOXNET, Toxicology Data Network, provee información completa sobre las propiedades fisicoquímicas de estos alcoholes y su toxicidad en diferentes organismos. Asimismo, la red incluye otras bases donde se pueden encontrar referencias de su potencial carcinogénico, teratogénico o mutagénico, aunque en lo que hace a estos aspectos la información no siempre está actualizada.

Etanol

La más reciente revisión disponible en la literatura sobre genotoxicidad del EtOH es la de Phillips y Jenkinson (2001). En ella los autores resumen la información existente para diferentes sistemas de ensayo y concluyen que la mayoría de los estudios son incompletos, sin activación metabólica, con número de dosis insuficiente o concentración ensayada muy alta y que son muy pocos los estudios hechos con protocolos aceptables como para evaluar la genotoxicidad de este alcohol como producto industrial. Sin embargo, el EtOH ha sido propuesto como mutágeno clase 2 por la Comisión MAK y el European Chemical Bureau (documento No. ECBI/74/95-Add 3).

La mayoría de los resultados de ensayos en bacterias son negativos (test de Ames con/sin activación; Zeiger y col. 1992; Phillips y Jenkinson 2001). Solamente De Flora y col. (1984 a y b) informan resultados positivos aunque débiles.

En hongos el EtOH no induce mutaciones o daño cromosómico en *Aspergillus nidulans* aunque causa disturbios en la segregación cromosómica que resultan en aneuploidías y poliploidías (Crebelli y col. 1989). En *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito un aumento en la frecuencia de mutaciones mitocondriales (petite) pero no conversiones génicas (Ristow y col. 1995).

Las pruebas de aberraciones cromosómicas (AC) *in vitro* muestran resultados negativos en cultivo de linfocitos humanos, líneas celulares linfoides humanas, células HeLa, células de hámster chino y cuando el EtOH se usa como solvente en experiencias con linfocitos humanos, CHO y CHL con/sin activación metabólica (Phillips y Jenkinson 2001). Los ensayos con otras células de mamíferos, células S49 (Friederich y Naas 1983) y células L5178y (*tk+ / tk-*) de linfoma de ratón, dan resultados negativos (Wangenheim y Bolcsfoldi 1988).

No existen evidencias concluyentes de que el EtOH induzca micronúcleos (MN) en roedores, siendo las respuestas negativas en tratamientos crónicos a ratones o ratas con concentraciones de 5% a 40% (Chaubey y col. 1977; Tates y col. 1980; Balansky y col. 1993). Solamente aparecen en la literatura dos informes de resultados positivos, Baraona y col. (1981) con un aumento pequeño aunque significativo en la frecuencia de MN en médula ósea para tratamientos de 6 semanas (12-16 g/kg/día) y Badr y col. (1977) que refieren un aumento de MN no dosis-dependientes por tratamientos inyectables. Por otra parte las pruebas AC *in vivo* también reportan resultados negativos.

Los resultados de ensayos de letalidad dominante en roedores son contradictorios y la mayoría cuestionables por no incluir suficientes animales o por no utilizar métodos adecuados para determinar la incidencia de mortalidad fetal, sin embargo los estudios más confiables, muestran resultados negativos (Phillips y Jenkinson 2001).

Otros efectos genéticos del EtOH tales como formación de aductos de ADN (Izzotti y col. 1998) o el intercambio de cromátidas hermanas (ICH) *in vitro* también son negativos (Phillips y Jenkinson 2001). Sin embargo, estudios equivalentes *in vivo* muestran efectos positivos aunque menores al doble de la frecuencia de control, lo que podría deberse a un efecto indirecto del alcohol a través de algún metabolito activo, probablemente el acetaldehído. Estudios *in vitro* en linfocitos y en células de mucosa gastrointestinal mediante el ensayo del cometa indicarían que el EtOH induce roturas de cadena en el ADN (Blasiak y col. 2000), lo que sugiere un efecto directo del alcohol sobre el ADN, aunque los autores no descartaron que el efecto pueda deberse a alteraciones en la estructura del ácido nucleico consecuencia de las condiciones del ensayo. Posteriormente, otros estudios indicaron también que el EtOH es en sí mismo genotóxico (Lamarche y col. 2003, 2004; Kido y col. 2006). Finalmente, Kayani y Parry (2010) utilizando el ensayo *in vitro* CBMN (micronúcleos con bloqueo de la citocinesis) y de kinetocoros marcados por inmunofluorescencia, pudieron establecer que tanto el etanol como el acetaldehído producen aumentos en la frecuencia de MN que son significativos y dosis dependiente. El análisis de kinetocoros permitió establecer que los MN inducidos

por etanol se originaban por mecanismos de aneugénesis mientras que el acetaldehído lo hacía por clastogénesis.

En plantas, la mayoría de los resultados respecto de la inducción de daño cromosómico es positiva. Esto indicaría que los vegetales son más sensibles que las células de mamífero al efecto del EtOH como clastógeno o que tienen la capacidad metabólica para transformar al alcohol en un clastógeno activo (Phillips y Jenkinson 2001). Darroudi y Natarajan (1987) encontraron que extractos vegetales podían potenciar el efecto del EtOH en células de mamíferos *in vivo*.

Un aspecto interesante a tener en cuenta son los numerosos hallazgos que indican aumentos estadísticamente significativos en los niveles de AC, ICH y MN en alcohólicos, efectos que desaparecen luego de un período de abstinencia (Obe y Anderson 1987; Castelli y col. 1999). Tanto que las AC y los MN han sido propuestos como biomarcadores de abuso de alcohol a ser incluidos en los programas de prevención de cáncer en alcohólicos (Maffei y col. 2002). Sin embargo no puede concluirse que el EtOH es el responsable directo de este efecto porque los alcohólicos tienen hábitos dietarios, nutrición y metabolismo alterados, las bebidas alcohólicas tienen otros componentes además del alcohol y el hábito está generalmente asociado al tabaquismo (Reidy y col. 2011). Además, las concentraciones de acetaldehído que se producen como consecuencia de su metabolismo son altas y es éste el compuesto altamente reactivo que produce diversos aductos cuando interactúa con las proteínas o con el ADN (Zakhari 2006; Guo y Ren 2010; Brooks y Zakhari 2014). Por otra parte se ha observado que también puede influir el genotipo para polimorfismos de la acetaldehído dehidrogenasa 2, ALDH2 (Ishikawa y col. 2006)

En los estudios de inducción, de no disyunción y aneuploidía por tratamientos con EtOH aparece una mayor frecuencia de resultados positivos. Se ha encontrado aumento de aneuploidías en linfocitos de alcohólicos (Mitelman y Wadstein 1978; Kucheria y col. 1986) y se ha asociado el alcoholismo con una mayor frecuencia de esperma aneuploide en hombres jóvenes (Robbins y col. 1997). En roedores se han informado resultados positivos en células germinales (espermatocitos) y somáticas (embriones) originados a partir de machos tratados con EtOH (Barilyak y Koza-

chuk 1981; Alvarez 1983; Hunt 1987), aunque en línea germinal masculina de hamster chino no se encontraron efectos aneugénicos inducidos por EtOH. El tratamiento de huevos *in vitro* y el estudio de mórulas en hembras que habían sido tratadas con EtOH al momento del apareamiento, dio aumentos significativos en la incidencia de aneuploidías lo que llevó a postular que la no disyunción inducida por este alcohol era responsable de parte de los abortos espontáneos en humanos (Kaufmann 1983; Kaufman y Bain 1984).

Isopropanol

En los últimos 10 años no han aparecido estudios nuevos del potencial mutagénico del IPA (Palermo y Mudry 2011). Los resultados de mutagénesis inducida en sistemas bacterianos con/sin activación metabólica (*Salmonella typhimurium* y *E.coli* WP2 UvrA) son negativos (Shimizu y col. 1985; Zeiger y col. 1992; IARC 1999). También son negativos los efectos en sistemas *in vitro* de células V79 con/sin activación S-9 (von der Hude y col. 1987) y en células CHO/gen HGPRT así como la inducción de MN en médula ósea de ratón *in vivo* (Kapp y col. 1993; 1996) y de no disyunción meiótica en *Neurospora crassa* (Brockman y col. 1984).

En *D. melanogaster* ambos alcoholes presentan semejanzas en cuanto a sus efectos genotóxicos. El EtOH no modifica las frecuencias de SLRL, de translocaciones recíprocas y de pérdidas cromosómicas en células posmeióticas en machos, tampoco aumenta la frecuencia de mutación y recombinación somática en larvas, sin embargo aumenta significativamente la frecuencia de no disyunción para el cromosoma X si se tratan hembras antes de cruzarlas (Muñoz 1990; Rey y col. 1992; Palermo y col. 1994). El principal efecto del IPA en la mosca es el aumento de ND, aunque para producirlo debe estar presente en el momento de continuación de la meiosis después de la fertilización, por otra parte el alcohol no afectaría directamente al ADN ya que no induce mutaciones recesivas ligadas al sexo y sólo aumenta levemente la mutación somática. El efecto del IPA podría deberse a alteraciones en la membrana nuclear (Palermo y Mudry 2011).

El EtOH se clasifica en el Grupo 1 (carcinógeno humano) (IARC 1988; Baan y col. 2007) ya que se ha podido establecer una asociación causal entre el consumo de alcohol y el

cáncer de cavidad oral, faringe, laringe, esófago, hígado, colon, recto, y de mama (en mujeres) y se sospecha una asociación con cáncer de páncreas y de pulmón (Boffetta y Hashibe 2006). El IPA se incluye en el Grupo 3 (no calificable respecto de su carcinogénesis en humanos) por ser inadecuada la evidencia disponible tanto en animales como en humanos. Los aumentos en la incidencia de cáncer de senos paranasales y de laringe en trabajadores que participan en la fabricación de IPA por el proceso ácido, incluyen el proceso en el Grupo 1 (IARC 1999).

Si bien la capacidad de un compuesto para inducir mutaciones presagia su potencial como carcinógeno, la existencia de mutágenos no carcinógenos indicaría que la mutación es uno (o más) de los pasos en el proceso de múltiples pasos involucrados en la carcinogénesis en mamíferos (Zeiger 2001).

Teratogénesis

Desde los años 70 el EtOH es reconocido como teratógeno en humanos (Adams y col. 2002). El consumo de alcohol en humanos y ratones durante la preñez tiene efectos adversos sobre el desarrollo del feto (síndrome alcohólico fetal), altera la fertilidad y el ciclo reproductivo, aumenta la frecuencia de abortos, de retrasos en el desarrollo intrauterino y de nacimientos prematuros y/o de bajo peso al nacer (Grodstein y col. 1994; Connor y Streissguth 1996; Cebal y col. 2000; Hannigan y Armand 2000). En modelos murinos el tratamiento de hembras poco antes o después del apareamiento produce hipoploidías, reabsorciones, muerte post-implantacional o anomalías anatómicas en los fetos resultantes (Washington y col. 1985; Soltes y col. 1996). En ratones CF-1 la ingestión sub-crónica de alcohol produce anomalías espermáticas y nucleares en oocitos, probablemente debidas a su efecto genotóxico (Cebal y col. 2011). En *Drosophila* el EtOH disminuye la fertilidad de las hembras, altera el desarrollo larval normal y aumenta significativamente la frecuencia de malformaciones congénitas (Rey y col. 1992; Palermo y col. 1994).

La información sobre los efectos de desarrollo y reproductivos del IPA es conflictiva (Nelson y col. 1988; WHO 1990; Tyl y col. 1994). Kapp y col. (1996) revisaron la toxicidad del IPA y concluyeron que este alcohol secundario tiene un grado bajo de toxicidad aguda y crónica, no produce efectos adversos sobre

la reproducción, no es teratógeno, ni tóxico para el desarrollo embrionario, ni neurotóxico. Faber y col. (2008), en su revisión de la toxicidad reproductiva y de desarrollo, concluyen que el IPA no afecta el índice de apareamiento ni la fertilidad de machos, aunque en hembras puede disminuir la sobrevivencia de la descendencia. Los datos sobre fertilidad en hembras son escasos, en *Drosophila* este alcohol disminuye el número de descendientes por hembra aunque los efectos no son irreversibles, sin embargo no es teratogénico (Palermo y Mudry 2011).

Drosophila se ha convertido en un modelo ampliamente aceptado para hacer el relevamiento preliminar de sustancias con efectos sobre el desarrollo y/o teratogénicos con posible acción incluso en el hombre (Vogel y Nivard 2000; Palermo y col. 2004). El modelo también es útil, como se mencionó antes, para el estudio de afecciones neurológicas,

acción de hormonas, ritmos circadianos y sueño, tumorigénesis y otros. Un caso particular es el del retinoblastoma humano familiar en el que, si el individuo es portador del alelo recesivo para la enfermedad ($rb+/rb$), por mecanismos de pérdida de heterocigosis se puede originar un clon homocigoto para rb que dará lugar a un retinoblastoma en el ojo del paciente (Griffith y col. 2002). Otro ejemplo es el que ilustra la *Figura 3* con la aparición de un clon sin color en el ojo rojo de *Drosophila* comparable al clon claro en el ojo humano, ambos originados por pérdida de heterocigosis. Mecanismos semejantes pueden resultar en la inactivación de genes supresores de tumores o en la activación de proto-oncogenes. De hecho, en células de pacientes que sufren enfermedades que predisponen al cáncer, las frecuencias de recombinación y de reordenamientos genómicos aparecen elevadas (Livingstone y col. 1992; Meyn 1993; Ellis 1996).

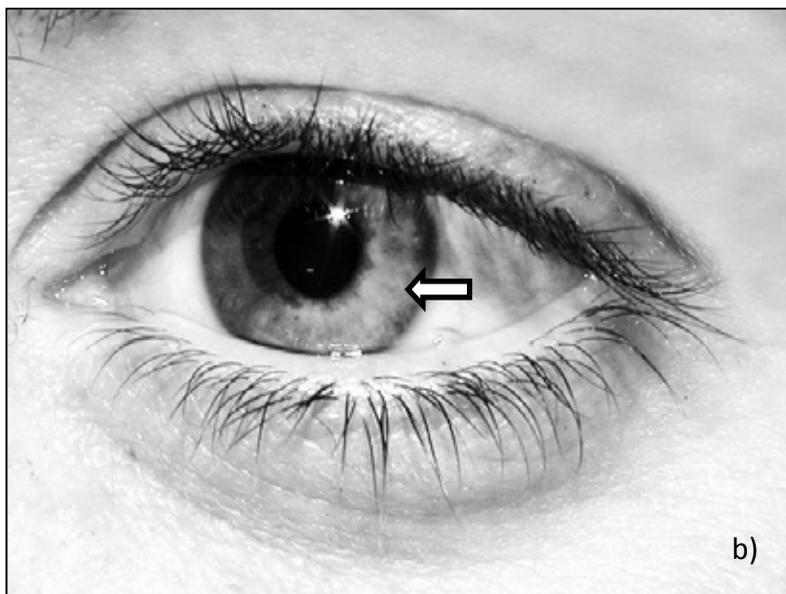
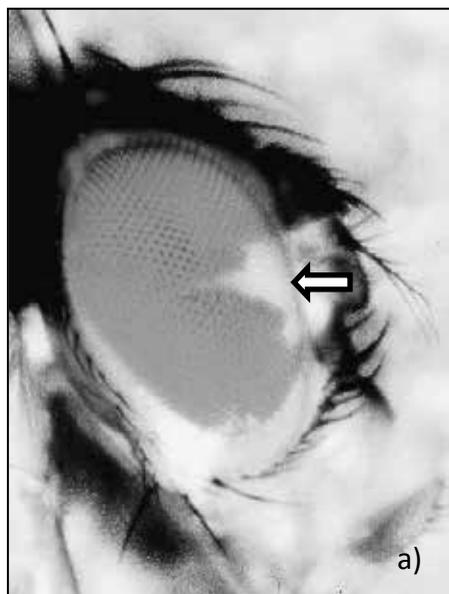


Figura 3. a) mancha blanca en el ojo de *Drosophila melanogaster* (adaptado de Vogel y col., 2000); b) mancha clara en ojo humano.

Bibliografía citada

Aardema M.D., MacGregor J.T. Toxicology and Genetic in the new era of 'toxicogenomics': impact of "-omics" technologies. *Mutat Res.* 2002;499:13-25.

Adams J., Bittner P., Buttar H.S., Cham-

bers C.D., Collins T.F.X., Daston G.P., Filkins K., Flynn T.J., Graham J.M. Jr., Jones K.L., Kimmel C., Lammer E., Librizzi R., Mittala J., Polifka J.E. Statement of the Public Affairs Committee of the Teratology Society on the Fetal Alcohol Syndrome. *Teratology.* 2002;66:344-347.

- Alvarez M.R. Numerical chromosome variation in mouse spermatogonia resulting from alcohol consumption. *J Hered.* 1983;74:58.
- Amstrong S.R. Ethanol, Brief Report on its Use in Gasoline. Cambridge Environmental Inc. Cambridge MA. England.1999.
- Aragón C., Miguel M., Correa M., Sanchis-Segura C. Alcohol y Metabolismo Humano. En: Gual A. Monografía Alcohol, Adicciones 2002;14 (Supp1):25-44.
- Baan R., Straif K., Grosse Y., Seretan B., El Ghissassi F., Bouvard V., Altieri A., Cogliano V. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *The Lancet.* 2007;8:292-293.
- Badr F.M., Badr R.S., Asker R.L., Hussain F.H. Evaluation of the mutagenic effects of ethyl alcohol by different techniques. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1977;85(A):25-46.
- Balansky R.M., Blagoeva P.M., Mircheva Z.I., De Flora S. Co-clastogenicity of ethanol with cigarette smoke in rat erythroblasts and anti-clastogenicity in alveolar macrophages. *Cancer Lett.* 1993;72:183-189.
- Baraona E., Guerra M., Lieber C.S. Cytogenetic damage of bone marrow cells produced by chronic ethanol consumption. *Life Sci.* 1981;29:1797-1802.
- Barilyak I.R., Kozachuck S.Y. Effects of ethanol on the genetic apparatus of mammalian germ cells. *Tsitol Genet.* 1981;17:57-60.
- Blasiak J., Trzeciak A., Malecka-Panas E., Drzewoski J., Wojewódzka M. *In vitro* genotoxicity of ethanol and acetaldehyde in human lymphocytes and in the gastrointestinal tract mucosa cells. *Toxicol in vitro.* 2000;14:287-295.
- Boffetta P., Hashibe M. Alcohol and cancer. *The Lancet.* 2006;7:149-156.
- Brockman H.E., de Serres F.J., Ong T.M., DeMarini D.M., Katz A.J., Griffith A.J., Stafford R.S. Mutation Tests in *Neurospora crassa*. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 1984;133:87-134.
- Brooks P.J., Zakhari S. Acetaldehyde and the genome: beyond nuclear DNA adducts and carcinogenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2014;55:77-91.
- Castelli E., Hrelia P., Maffei F., Fimognari C., Foschi F.G., Caputo F., Cantarelli-Forti G., Stefanini G.F., Gasbarrini G.. Indicators of genetic damage in alcoholics: reversibility after alcohol abstinence. *Hepato-Gastroenterol.* 1999;46:1664-1668.
- Cebral E., Abrevaya X.C., Mudry M.D. Male and female reproductive toxicity induced by sub-chronic ethanol exposure in CF-1 mice. *Cell Biol Toxicol.* 2011;27:237-48.
- Cebral E., Lasserre A., Rettori V., De Gimeno M.A. Alteration in pre implantation *in vivo* development after preconceptual chronic moderate alcohol consumption in female mice. *Alcohol Alcohol.* 2000;35: 336-343.
- Chaubey R.C., Kavi B.R., Chauhan P.S., Sundaram K. Evaluation of the effect of ethanol on the frequency of micronuclei in the bone marrow of Swiss mice. *Mutat Res.* 1977;43:441-444.
- ChemIDplus Advanced. Specialized Information Services. [en línea] US National Library of Medicine, TOXNET, Toxicology Data Network, [actualizado a noviembre 2013; consulta diciembre 2013]. Disponible en <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus>.
- Connor P.D., Streissguth A.P. Effects of prenatal exposure to alcohol across the life span. *Alcohol Health Res World.* 1996;20:170-174.
- Crebelli R., Conti G., Conti L., Carere A. A comparative study of ethanol and acetaldehyde as inducers of chromosome malsegregation in *Aspergillus nidulans*. *Mutat Res.* 1989;215: 187-195.
- Darroudi F., Natarajan A.T. Induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchange in CHO cells by mutagenic metabolites activated by plant microsomal extract. *Biol Zentralbl.* 1987;106(2):169-174.
- De Flora S., Camoirano A., Zancacchi P., Benicelli C. Mutagenicity testing with *Salmonella typhimurium* strains TA97 and TA102

of 30 DNA-damaging compounds negative with other Salmonella strains. *Mutat Res.* 1984b;134:159-165.

De Flora S., Zanicchi P., Camoirano A., Benicelli C., Badolati G.S. Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in bacterial DNA repair test. *Mutat Res.* 1984a;133:161-198.

Devineni A.V., Heberlein U. Acute ethanol responses in *Drosophila* are sexually dimorphic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012;109(51):21087-21092.

Devineni A.V., Heberlein U. The Evolution of *Drosophila melanogaster* as a model for alcohol research. *Annu. Rev. Neurosci.* 2013;36:121-138.

Ellis N.A. Mutation-causing mutations. *Nature.* 1996;381: 110-111.

Environmental Health and Toxicology. Specialized Information Services. [en línea] U.S. Department of Health and Human Services [actualizado a diciembre de 2009, consulta octubre de 2013]. Disponible en <http://sis.nlm.nih.gov/Tox/ToxTutor.html>

Erickson R.P. Somatic gene mutation and human disease other than cancer. *Mutat Res.* 2003;543:125-136.

Faber W.D., Pavkov K.L., Gingell R. Review of reproductive and developmental toxicity studies with isopropanol. *Birth Defects Res B, Dev Reprod Toxicol.* 2008;83:459-476.

Flybase. A database of *Drosophila* genes and genomes [en línea], [actualizado a enero 2014, consulta febrero 2014]. Disponible en <http://flybase.bio.indiana.edu/>

Friedrich U., Naas G. Evaluation of a mutation test using S49 lymphoma cells and monitoring simultaneously the induction of dexamethasone resistance, 6-thioguanine resistance and ouabain resistance. *Mutat Res.* 1983;110:147-162.

Fruitfly. Berkeley *Drosophila* Genome Project [en línea], [actualizado a diciembre de 2013]. Disponible en <http://www.fruitfly.org>

Graf U., Abraham S.K., Guzmán-Rincón J., Würgler F.E. Antigenotoxicity Studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* 1998;402:203-209.

Graf U., Alonso Moraga A., Castro R., Diaz Carrillo E. Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test, *Food Chem Toxicol.* 1994;32 (5):423-430.

Graf U., Würgler F.E., Katz A.J., Frei H., Juon H., Hall C.B., Kale P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen.* 1984;6:153-188.

Griffith A.S.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., Gelbart W.M. *Genética*, 7a. Ed. 2002; Mc Graw Hill – Interamericana. Madrid. P. 665.

Grodstein F., Goldman M.B., Cramer C.W. Infertility in women and moderate alcohol use. *Am J Public Health.* 1994;84:1429-1432.

Guarnieri D.J., Heberlein U. *Drosophila melanogaster*, a genetic model system for alcohol research. *Int Rev Neurobiol.* 2003;54:199-228.

Guo R., Ren J. Alcohol and acetaldehyde in Public Health: from marvel to menace. *Int J Environ Res Public Health.* 2010;7:1285-1301.

Hannigan J.H., Armand D.R. Alcohol in pregnancy and neonatal outcome. *Semin Neonatol.* 2000;5:243-254.

Hendricks J.C., Sehgal A. Why a fly? Using *Drosophila* to understand the genetics of circadian rhythms and sleep. *Sleep.* 2004;27:334-342.

Household Products Database [en línea] U.S. Department of Health and Human Services [actualizado a diciembre de 2013, consulta febrero de 2014] Disponible en <http://householdproducts.nlm.nih.gov/>.

Hunt P.A. Ethanol-induced aneuploidy in male germ cells of the mouse. *Cytogenet and Cell Genet.* 1987;44:7-10.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 7, Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating

of IARC Monographs Volumes 1 to 42, Lyon. 1987;P.229. [consulta febrero de 2014]. Disponible en <http://monographs.iarc.fr/>.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks Humans, Alcohol Drinking. Lyon, France; Vol 44.1988. [consulta febrero de 2014]. Disponible en <http://monographs.iarc.fr/>.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. 1999; Vol.77, pp.1027-1036. [consulta febrero de 2014]. Disponible en <http://monographs.iarc.fr/>.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Review of Human Carcinogenesis Monographs Vol 100 [en línea], [actualizado a junio 2012, consulta octubre 2013]. Disponible en <http://monographs.iarc.fr/>.

Ishikawa H., Miyatsu Y., Kurihara K., Yokoyama K. Gene-environment interactions between alcohol-drinking behaviour and ALDH2 and CYP2E1 polymorphisms and their impact on micronuclei frequency in human lymphocytes. *Mutat Res.* 2006;594:1-9.

Izzotti A., Balansky R.M., Blagoeva P.M., Mircheva Z.I., Tulimiero L., Cartiglia C., De Flora S. DNA alterations in rat organs after chronic exposure to cigarette smoke and/or ethanol ingestion. *FASEB J.* 1998;12:753-758.

Jones K.L., Smith D.W. Recognition of the Fetal Alcohol Syndrome in early infancy. *The Lancet.* 1973;302:999-1001.

Kango-Singh M., Halder G. *Drosophila* as an emerging model to study metastasis. *Genome Biol.* 2004;5:216.

Kapp R.W., Jr., Marino D.J., Gardiner T.H., Masten L.W., McKee R.H., Tyler T.R., Ivett J.L., Young R.R. *In vitro* and *in vivo* assays of isopropanol for mutagenicity. *Environ Mol Mutagen.* 1993;22:93-100.

Kapp R.W.Jr., Bevan C., Gardiner T.H., Banton M.I., Tyler T.R., Wright G.A. Isopropanol: Summary of TSCA Test Rule Studies and Re-

levance to Hazard Identification. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1996;23:183-192.

Kaufman M.H., Bain L.M. Influence of ethanol on chromosome segregation during the first and second meiotic divisions in the mouse egg. *J Exp Zool.* 1984;230:315-320.

Kaufmann M.H. Ethanol-induced chromosomal abnormalities at conception. *Nature.* 1983;302:258-260.

Kayani M.A., Parry J.M. The *in vitro* genotoxicity of ethanol and acetaldehyde. *Toxicol in vitro.* 2010;24:56-60.

Kido R., Sato I., Tsuda S. Detection of *in vivo* DNA damage by ethanol in multiple organs of pregnant mice using the alkaline single cell gel electrophoresis (COMET) assay. *J Vet Med Sci.* 2006;68:41-47.

Kilbey B.J., MacDonald D.J., Auerbach C., Sobels F.H., Vogel E.W. The use of *Drosophila melanogaster* in tests for environmental mutagens. *Mutat Res.* 1981;85:141-146.

Kucheria K., Taneja N., Mohan D. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in chronic male alcoholics. *Indian J Med Res.* 1986;83:417-421.

Lamarche F., Gonthier B., Singnorini N., Eyseric H., Barret L. Acute exposure of cultured neurons to ethanol results in reversible DNA single strand breaks; whereas exposure causes loss of cell viability. *Alcohol Alcohol.* 2003;38:550-558.

Lamarche F., Gonthier N., Signorini N., Eyseric H., Barret L. Impact of ethanol and acetaldehyde on DNA and cell viability of cultured neurons. *Cell Biol Toxicol.* 2004;20: 361-374.

Lasko P. Diabetic flies? Using *Drosophila melanogaster* to understand the causes of monogenic and genetically complex diseases. *Clin Genet.* 2002;62:358-367.

Livingstone L.R., White A., Sprouse J., Livanos E., Jacks T., Tlsty T.D. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell.* 1992;70:923-935.

Maffei F., Cantelli Forte G., Castelli E., Stefa-

nini G.F., Mattioli S., Hrelia P. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutat Res.* 2002;514:49-58.

Marsh J.L., Thompson L.M. Can flies help humans treat neurodegenerative diseases? *Bioassays* 2004;26:485-496.

Meyn MS. High spontaneous intrachromosomal recombination rates in Ataxia Telangiectasia. *Science.* 1993;260:1327-1330.

Mitelman F., Wadstein J. Chromosome aberrations in chronic alcoholics. *The Lancet.* 1978;1:216.

Muñoz E.R., Effect of ethanol pretreatment on genetic damage induced by X-rays in *Drosophila melanogaster* sperm. *Mutat Res.* 1990;232:3-10.

Nelson B.K., Brightwell W.S., MacKenzie-Taylor D.R., Khan A., Burg J.E., Weigel W.W., Goad P.T. Teratogenicity of n-propanol and isopropanol administered at high inhalation concentrations to rats. *Food Chem Toxicol.* 1988;26:247-254.

Obe G., Anderson D. Genetic effects of ethanol. *Mutat Res.* 1987;186:177-200.

Palermo A.M. *Drosophila melanogaster* como modelo en estudios de mutagénesis y recombinagénesis ambiental. En: *Genética Toxicológica*. Mudry M.D. y Carballo M.A. (Eds.). Editorial de los Cuatro Vientos. Buenos Aires, Argentina. Capítulo XIII. 2006; P. 339-358.

Palermo A.M., Mudry M.D. Evaluation of genotoxic damage induced by isopropanol in germinal and somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* 2011;726:215- 22.

Palermo A.M., Rey M., Muñoz E.R. Protective effect of ethanol on X-ray induced mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen.* 1994;24:137-142.

Palermo A.M., Reynoso A.S., López Nigro M., Carballo M., Mudry M.D. Teratogenic evaluation of metronidazole and ornidazole using *Drosophila melanogaster* as an experimental model. *Birth Defects Res. Part A.* 2004;70:157-162.

Phillips BJ, Jenkinson P. Is ethanol genotoxic? A review of published data. *Mutagenesis* 2001;16:91-102.

Reidy J., McHugh E., Stassen L.F.A. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *The Surgeon.* 2011;9:278-283.

Reiter L.T., Potoki L., Chien S., Gribskov M., Bier E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 2001;11:1114-1125.

Rey M., Palermo A.M., Muñoz E.R. Non-disjunction induced by ethanol in *Drosophila melanogaster* females. *Mutat Res.* 1992;268:95-104.

Ristow H., Seyfarth A., Lochmann E.R. Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field gel electrophoresis. *Mutat Res.* 1995;326:165-170.

Robbins W.A., Vine M.F., Truong K.Y., Everson R.B. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ Mol Mutagen.* 1997;30:175-183.

Robinson B.G., Khurana S., Atkinson N.S. *Drosophila* larvae as a model to study physiological alcohol dependence. *Communicative & Integrative Biol.* 2013;6:2.

Shimizu H., Suzuki Y., Takemura N., Goto S., Matsushita H. The results of microbial mutation test for forty-three industrial chemicals. *Jpn J Ind Health.* 1985;27:400-419.

Soltes B.A., Robert Anderson R., Radwanska E. Fetus-placenta-newborn: morphologic changes in offspring of female mice exposed to ethanol before conception. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;175:1158-1162.

Tates A.D., De Vogel N., Neuteboom I. Cytogenetic effects in hepatocytes, bone marrow cells and blood lymphocytes of rats exposed to ethanol in the drinking water. *Mutat Res.* 1980;124:145-151.

Tickoo S., Russell S. *Drosophila melanogaster*

ter as a model system for drug discovery and pathway screening. *Curr Opin Pharmacol.* 2002;2:555-560.

Toxicology Tutorials. Environmental Health and Toxicology. [en línea]. [consulta febrero de 2014]. Disponible en <http://sis.nlm.nih.gov/enviro/toxtutor.html>.

TOXNET, Toxicology Data Network, US National Library of Medicine, [en línea]. [consulta febrero de 2014]. Disponible en <http://toxnet.nlm.nih.gov>.

Tyl R.W., Masten L.W., Marr M.C., Mayers C.B., Slauter R.W., Gardiner T.H., Strother D.E., Mac Kee R.H., Tyler T.R. Developmental toxicity of isopropanol by gavage in rats and rabbits, *Fundam Appl Toxicol.* 1994;22:139-151.

Valencia R., Abrahamson S., Lee W.R., Von Halle E.S., Woodruff R.C., Würzler F.E., Zimmering S. Chromosome mutation tests for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 1984;134:61-88.

Vogel E.W., Graf U., Frei H.J., Nivard M.M. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci Publ.* 1999;146:427-470.

Vogel E.W., Nivard M.J. Parallel monitoring of mitotic recombination, clastogenicity and teratogenic effects in eye tissue of *Drosophila*. *Mutat Res.* 2000;455:141-153.

Von der Hude W., Scheutwinkel M., Gramlich U., Fissler B., Basler A. Genotoxicity of three-

carbon compounds evaluated in the SCE test *in vitro*. *Environ Mutag.* 1987;9:401-410.

Wangenheim J., Bolcsfoldi G. Mouse lymphoma L5178y thymidine kinase locus assay of 50 compounds. *Mutagenesis.* 1988; 3:193-205.

Washington W.J., Cain K.T., Cacheiro N.L.A., Generoso W.M. Ethanol-induced late fetal death in mice exposed around the time of fertilization. *Mutat Res.* 1985;147:205-210.

Waters MD, Olden K, Tennant RW. Toxicogenomic approach for assessing toxicant-related disease. *Mutat Res.* 2003;544:415-424.

World Health Organization (WHO). Environmental Health Criteria 103: 2-Propanol, Office of Publications, WHO, Geneva, Switzerland, 1990.

Yu K., Lieber M.R. Nuclei acid structures and enzymes in the immunoglobulin class switch recombination mechanism. *DNA Repair.* 2003;2:1163-1174.

Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health.* 2006;29:245-254.

Zeiger E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or faulty tests? *Mutat Res.* 2001;492(1-2):29-38.

Zeiger E., Anderson B., Haworth S., Lawlor T., Mortelmans K. Salmonella mutagenicity tests: V. Results from the testing of 311 chemicals. *Environ Mol Mutag.* 1992;19 (Suppl. 21):2-141.

REPORTES DE CASOS

Serie de casos de intoxicación fatal por ingesta intencional de fosfuro de aluminio Aluminium phosphide poisonings: case reports with fatal evolution

Docampo, Patricia C.*; Spera, Marina; Voitzuk, Ana P.

Centro Nacional de Intoxicaciones, Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas. Av. Marconi e Illía S/N°, El Palomar, Bs. As. 4658-7777, 4654-6648, 0800-333-0160. cniposadas@intramed.net
*cynthidocampo@hotmail.com

Recibido: 19 de mayo de 2013
Versión final recibida: 29 de mayo de 2014
Aceptado: 29 de mayo de 2014

Resumen. El fosfuro de aluminio (AIP) es un plaguicida fumigante de bajo costo, cuyo único uso permitido es el control de plagas en granos almacenados. En contacto con la humedad del aire libera gas fosfina (PH₃), altamente tóxico, inflamable y explosivo, pero que se disipa rápidamente. En todas las presentaciones, 3 g de la formulación genera 1 g de gas fosfina. La exposición a 1000 ppm durante 30 minutos es fatal. Presentamos una serie de casos de intoxicación severa por ingesta intencional de fosfuro de aluminio, con desenlace fatal, con el objetivo de asesorar e informar sobre los mecanismos de intoxicación y el manejo adecuado del paciente intoxicado.

Palabras clave: Fosfuro de aluminio; Gas fosfina; Intoxicación con fosfuro de aluminio; Mecanismo de acción.

Summary. Aluminium phosphide (AIP) is a fumigant pesticide inexpensive; whose only permitted use is for stored grain pest control. On contact with moisty air, it releases phosphine gas (PH₃), highly toxic, flammable and explosive, but that quickly dissipates. For all presentations, a 3 g formulation generates 1 g of phosphine gas. Exposure to 1000 ppm for 30 minutes is lethal. We present a series of cases of severe poisoning with AIP, in order to advise and inform on the mechanisms of toxicity and proper management of the poisoned patient.

Keywords: Aluminium phosphide; Phosphine gas; Aluminium phosphide poisoning; Mechanism of action.

Introducción

El fosfuro de aluminio ha sido utilizado como plaguicida desde 1940. Produce formación de fosfina, gas altamente tóxico, existiendo en la bibliografía reporte casos fatales a causa de su utilización como plaguicida en un cargamento de trigo (Ziipf y col 1967; Wilson 1980). Es un plaguicida fumigante muy eficaz, utilizado para la preservación de granos, que se comercializa como pastillas fumígenas. El gas fosfina se libera cuando el fosfuro de aluminio toma contacto con el aire y la humedad (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 2011). El gas es incoloro e inodoro en estado puro y por la presencia de difosfina y otras impurezas del producto, posee un olor aliáceo. Es extremadamente inflamable y explosivo

pero se disipa rápidamente. (Chefurka y col. 1976; Singh y col. 2006; Wax 2006; Zuryn y col. 2008). Las preparaciones comerciales contienen un 40% de carbonato de amonio, el cual libera amonio y dióxido de carbono en presencia de agua. Esto genera una mezcla gaseosa que no es inflamable ni explosiva. La exposición a 1000 ppm durante 30 minutos es fatal. (Chefurka y col. 1976; Singh y col. 2006; Wax 2006; Zuryn y col. 2008). La dosis letal en humanos, calculada para un peso de 70 Kg, es de 150 a 500 mg (20 mg/Kg) (ATSDR 2011; Occupational Safety and Health Administration (OSHA) 2011). Su toxicidad se debe a la acción inhibitoria sobre la cadena respiratoria mitocondrial (Chefurka y col. 1976; Singh y col. 2006; Wax 2006; Zuryn y col. 2008).

La ingesta de fosforo de aluminio produce síntomas casi inmediatos, esta descrito en la mayoría de los casos sintomatología gastrointestinal seguida de falla multiorgánica y shock refractario a todo tratamiento, ocasionando la muerte en un período entre 24 horas hasta 4 días después de su ingesta. (Wax 2006; Singh y col. 2006; Micromedex 2010; Mathai y col. 2010).

En el Centro Nacional de Intoxicaciones durante los años 2007 a 2010 se recibieron 6 consultas telefónicas por ingesta intencional de este plaguicida. Los casos provinieron de áreas rurales o sus alrededores; todas ellas con desenlace fatal. En dichas oportunidades la consulta consistió tanto en el asesoramiento en la asistencia del intoxicado como en evitar la contaminación del personal de salud. El objetivo de esta comunicación es dar a conocer una serie de casos de intoxicación por fosforo de aluminio con evolución desfavorable, así como

asesorar e informar sobre los mecanismos de toxicidad y el manejo adecuado del paciente intoxicado, para prevenir exposiciones del personal que asiste al paciente.

Casos clínicos

Seis pacientes entre 15 y 67 años de edad, dos de ellos ingresan a la guardia con deterioro del sensorio e hipotensión arterial, tres pacientes presentaron vómitos, epigastralgia y dolor abdominal y uno de ellos solo presentó vómitos. En todos los casos surgió como antecedente la ingesta intencional de una a tres pastillas fumígenas de fosforo de aluminio, entre los 30 minutos a dos horas previas al ingreso. Evolucionaron con descompensación hemodinámica, requerimiento de inotrópicos seguido de paro cardiorrespiratorio y muerte de los seis pacientes entre las 2 y 36 horas del ingreso. Se detallan en la siguiente tabla las características más relevantes de cada paciente (*Tabla 1*).

Tabla 1. Casos clínicos de ingesta intencional de fosforo de aluminio, registrados telefónicamente durante los años 2007 a 2010 en el Centro Nacional de Intoxicaciones.

Caso	1	2	3	4	5	6
Edad	36 años	15 años	21 años	17 años	27 años	67 años
Sexo	Masculino	Masculino	Masculino	Femenino	Masculino	Masculino
Cantidad ingerida	1	1	1	1	1	3
Demora en la consulta	1 hora	3 horas	2 horas	1 hora	30 minutos	30 minutos
Clínica	Coma Pupilas mióticas Shock FC 63 pm	Vómitos Shock Palidez cutaneomucosa Coma asistencia respiratoria mecánica (ARM)	Vómitos Epigastralgia Dolor abdominal	Dolor abdominal Vómitos con estrías de sangre	Vómitos Epigastralgia Dolor abdominal	Vómitos
Evolución	Convulsión tónica clónica generalizada. Fallece a la hora del ingreso	A las 10 horas Acidosis metabólica, hipoglucemia e insuficiencia renal aguda, requiriendo hemodiálisis. A las 16 horas lúcido, extubado y con inotrópicos en descenso. A las 24 horas síndrome de distrés respiratorio (SDRA) refractario a todo tratamiento. Fallece a las 36 horas del ingreso	Evoluciona con deterioro del sensorio, hipotensión. Fallece a las 24 horas del ingreso	Fallece a las 3 horas de su ingreso	Fallece a las 6 horas de su ingreso	Colapso cardiovascular refractario a todo tratamiento. Fallece a las 4 horas de su ingreso

Discusión

En el Centro Nacional de Intoxicaciones en el año 2011 se registraron 3885 consultas por plaguicidas, de las cuales 191 fueron por plaguicidas de uso agrícola. Con fosforo de aluminio 20 casos, con una tentativa suicida. En la serie de casos aquí presentada, la intoxicación con fosforo de aluminio ocurrió por la ingesta intencional de pastillas fumígenas generándose gas fosfina en el estómago por contacto con el ácido clorhídrico (Chefurka y col. 1976; Singh y col. 2006; Wax 2006; Zuryn y col. 2008). Este gas se une a los endotelios, estimula la fosfolipasa lo que genera degradación de la membrana celular, formación de radicales libres e ingreso de calcio (segundo mensajero) al interior de la célula. Esto, a su vez, provoca la inhibición de enzimas y bloqueo de la cadena respiratoria mitocondrial (Chefurka y col. 1976; Singh y col. 2006; Wax 2006; Zuryn y col. 2008). En estos casos las manifestaciones clínicas fueron inmediatas con síntomas gastrointestinales y evolución de moderada a severa, en coincidencia con lo descrito en la literatura para la ingesta de fosforo de aluminio (Singh y col. 1996; Nocera y col. 2000; Singh y col. 2006; Wax 2006; Micromedex 2010). Todos presentaron inicialmente compromiso gastrointestinal y multiorgánico evolucionando con shock refractario a todo tratamiento. La muerte se produjo debido al compromiso cardiovascular y por SDRA y, en este caso, puede retrasarse hasta 4 días (Singh y col 2006; Wax 2006; Mathai y col 2010; Micromedex 2010). La mortalidad global varía del 37 al 100% dependiendo de la vía de ingreso, el tiempo de exposición, las medidas de descontaminación y la respuesta al tratamiento instaurado. Después de la ingestión, las manifestaciones clínicas son náuseas, vómitos, diarrea, cefalea, dolor abdominal y taquicardia, pudiendo evolucionar a coma, shock refractario, insuficiencia cardíaca congestiva, miocarditis, pericarditis, trastornos de la conducción, y arritmias cardíacas. SDRA, acidosis metabólica, hipo o hipermagnesemia. Otros hallazgos poco comunes son hemólisis, insuficiencia suprarrenal aguda, hepatitis, necrosis tubular aguda, metahemoglobinemia y coagulación intravascular diseminada. (Gurjar y col. 2011, Moghamnia 2012, Soltaninejad 2013). Los hallazgos post-mortem son edema pulmonar, congestión de la mucosa gastrointestinal, hemorragias petequiales en la superficie de hígado y cerebro, degeneración vacuolar de los hepatocitos.

Las medidas a tomar por el personal de salud varían según se trate de pacientes intoxicados por exposición a vapores de fosforo de aluminio o por ingesta del mismo. En la primer situación, existe controversia respecto a si el personal de salud que atiende a los pacientes intoxicados con fosforo de aluminio, está en riesgo por la inhalación de los vapores que emanan de aquellos que están recibiendo dicha atención (Anger y col. 2000). Las víctimas expuestas sólo al gas fosfina no suponen un peligro considerable de contaminación secundaria al personal, fuera de la zona caliente (Anger y col. 2000). Las víctimas expuestas al fosforo sólido, que reacciona con la humedad para producir fosfina, pueden representar un riesgo; su presencia en la ropa, la piel o el cabello; por lo que el personal debe protegerse mediante el uso de guantes de goma y delantales (ATSDR 2011). Se recomienda en situaciones que implican la exposición a niveles potencialmente peligrosos de fosfina, el uso de equipo autónomo de respiración a presión positiva (SCBA) (ATSDR 2011), guantes y mascarillas aprobadas por las Normas NIOSH/OSHA; teniendo presente las mismas medidas en la evaluación *post mortem*.

La descontaminación a realizarse en las víctimas sería, cepillar todas las partículas visibles de la ropa, la piel y el cabello. Retirar y colocar en doble bolsa la ropa contaminada y pertenencias personales. Lavar completamente (preferentemente bajo la ducha) la piel expuesta y el cabello con agua de 3 a 5 minutos, luego lavar con un jabón suave y enjuagar con abundante agua.

Si el fosforo de aluminio fue ingerido considerar la probabilidad de vómitos durante el traslado del paciente intoxicado al hospital preparando la ambulancia con bolsas de plástico para limpiar rápidamente y aislar el vómito (ATSDR 2011). En la sala de emergencias, si el paciente no ha sido descontaminado se procederá de igual forma que lo descrito previamente (ATSDR 2011). A diferencia de los clínicos y el personal de salud, la exposición de los patólogos o médicos forenses, al contacto con fallecidos intoxicados ha sido muy discreta. En un estudio (India) sobre resultados de informes realizados en 115 autopsias por ingestión de fosforo de aluminio (Singh y col. 1996), no hubo ninguna mención de las consecuencias adversas a los que pudieron estar involucrados ni preocupación acerca de esa posibilidad.

El diagnóstico se basa en los datos obtenidos del interrogatorio, de antecedentes epidemiológicos y del examen físico del paciente. La prueba del nitrato de plata en el aspirado gástrico se realiza calentando el contenido gástrico en un matraz, manteniendo un papel de nitrato de plata en la boca del frasco, si la fosfina está presente el papel se vuelve negro debido al fosfato de plata (Gurjar y col. 2011).

En el tratamiento de esta intoxicación, no existe antídoto específico. En algunos reportes se ha vinculado el vómito provocado en forma precoz con sobrevida. El lavado gástrico con permanganato de potasio, bicarbonato de sodio, carbón activado y catártico disminuyen la absorción y la hidratación y hemodiálisis aumentan la excreción (Singh y col. 2006; Wax 2006; Micromedex 2010). El permanganato de potasio oxidaría la fosfina a fosfato no tóxico. Hallazgos experimentales in vitro sugieren que la grasa, el aceite de coco y parafina líquida inhiben la liberación de fosfina. (Gurjar y col. 2011).

Cinco de los seis pacientes presentaron vómitos no pudiéndose descartar en el primer caso por haber ingresado en coma. Las medidas de rescate no fueron realizadas por el tiempo transcurrido en algunos casos y en otros por los vómitos o compromiso del sensorio. Todos recibieron tratamiento de sostén hemodinámico pero sin respuesta y evolución fatal.

Estudios experimentales sugieren que el sulfato de magnesio, N-acetil cisteína (NAC), glutatión, vitamina C, beta carotenos, el aceite de coco y la melatonina podrían jugar un rol importante en reducir la oxidación de la fosfina (Moghadamnia A.2012).

En cuanto a la legislación vigente, el fosforo de aluminio es un producto autorizado por SENASA (Resolución 256/03. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) para el control de plagas en granos almacenados en lugares herméticos y está prohibida su aplicación durante la carga o tránsito, salvo que se realice la ventilación de 96 horas. Además, este producto debe ser comercializado y aplicado bajo receta fitosanitaria, emitida por un ingeniero agrónomo debidamente registrado como asesor fitosanitario, y los comercios expendedores deben llevar un estricto control de las entradas y salidas del mismo, archivando copia de la receta por un plazo mínimo de dos años. La Resolución del Ministerio de Salud 456/09, deroga la Res. N° 774/04, y destaca, en su Artículo 1°: Prohíbese en todo el país, la producción, importación, comercialización,

cesión gratuita y/o uso, para cualquier fin que invoque la protección de la salud humana, de los siguientes compuestos químicos: fosforo de zinc, fosfina, fosforo de aluminio.

En el caso particular de la provincia de Córdoba, la legislación vigente es más estricta en este aspecto, por medio de la Resolución N° 304 / 2010, el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentos prohibió en el ámbito provincial, el tratamiento con fosforo de aluminio en camiones, vagones y durante el tránsito hasta destino. Además, obliga a los titulares de la carga de granos, productos y subproductos de cereales y oleaginosas, a confeccionar y suscribir una Declaración Jurada que certifique que se traslada libre de pesticidas. El mencionado documento permitirá salvaguardar la integridad física del trabajador y podrá ser solicitado al transportista o responsable junto a la Carta de Porte, tanto por los fiscalizadores de la cartera agropecuaria como por la Policía Caminera.

En caso de que se detecte fosforo de aluminio, el control deberá dirigir el vehículo hasta un sitio conveniente y esperar hasta las 96 horas de ventilación necesarias indicadas para que se evapore el gas del fosforo. Posteriormente, se aplicarán las sanciones previstas en la Ley 9164 de Productos Químicos y Biológicos de Uso Agropecuario, que van desde el apercibimiento hasta el arresto efectivo.

Conclusión

La intoxicación aguda por plaguicidas es una causa importante de morbi mortalidad. El aumento en el uso de fosforo de aluminio se debe a su bajo costo y fácil acceso, debido a esto se reconocen múltiples usos como el control de roedores y granos almacenados en el transporte de carga, así como su ingesta intencional con fines suicidas (Wax 2006).

La ingesta de pastillas fumígenas es altamente tóxica, ocasionando rápidamente compromiso multisistémico y muerte. Los casos registrados en el CNI se presentaron con compromiso neurológico y gastrointestinal inicial evolucionando rápidamente al colapso cardiovascular y muerte, lo cual habla de la agresividad y rápida acción de este plaguicida.

La toxicidad del fosforo de aluminio se debe a la formación de gas fosfina, debido a la alta mortalidad del cuadro una vez instalado, es necesario establecer estrategias de prevención. Estudios experimentales sugieren que el sulfato de magnesio, N-acetil cisteína (NAC), glutatión,

tion, vitamina C, beta carotenos, el aceite de coco y la melatonina podrían jugar un rol importante en reducir la oxidación de la fosfina (Moghadamnia 2012). A fin de evitar este tipo de intoxicaciones, la bibliografía recomienda el control estricto de la comercialización, el envasado en paquetes que no permita retirar las pastillas para la deglución e incorporación de un emético en las tabletas (Singh y col. 2006; Wax 2006; Micromedex 2010).

Bibliografía citada

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Aluminium Phosphine. ATSDR, U.S. Department for Human Health Services. Atlanta, GA, 1999.

Anger F., Paysant F., Brousse F. Normand I.L., Develay P., Gaillard Y. Fatal aluminum phosphide poisoning. *J Anal Toxicol.* 2000;24:90-92.

Chefurka W., Kashi P., Bond E.J. The effect of phosphine on electron transport in mitochondria. *Pestic Biochem Physiol.* 1976;6:65-84.

Mathai A., Bhanu M.S. Acute aluminium phosphide poisoning: Can we predict mortality?. *Indian J Anaesth.* 2010;54:302-7.

Micromedex. Poisindex Managements. Phosphine. Copyright 1974-2010 [en línea] Thomson Healthcare. [Consulta 10 de agosto de 2011] Disponible en: <http://thomsonhc.com>.

Moghadamnia A. An update on toxicology of aluminum phosphide. *Daru.* 2012;20(1):25.

Nocera A., Levitin H.W., Hilton J.M.N. Dangerous bodies: a case of fatal aluminium phosphide poisoning. *Med J.* 2000;173:133-135.

Occupational Safety and Health Administration (OSHA). Phosphine. Related. Information: Chemical Sampling. [en línea] [Consulta 10 de agosto de 2011] Disponible en: www.OSHA.gov

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Resolución 256/03. [en línea] [consulta 7 de septiembre de 2011]. Disponible en: <http://magya.cba.gov.ar>.

Singh S., Bhalla A., Verma S.K., Kaur A., Gill K. Cytochrome-c oxidase inhibition in 26 aluminium phosphide poisoned patients. *Clin Toxicol.* 2006;44:155-158.

Singh S., Singh D., Wig N., Jit I., Sharma B.K. Aluminum phosphide ingestion – A clinicopathologic study. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1996; 34:703-706.

Soltaninejad K., Nelson L.S., Bahreini S.A., Shadnia S. Fatal aluminum phosphide poisoning in Tehran-Iran from 2007 to 2010. *Indian J Med Sci.* 2012;66(3-4):66-70.

Wax P. Phosphine. Flomembraum N.E., Goldfrank LR y col. En: Goldfrank's toxicologic emergencies, Nueva York, McGraw-Hill. 2006. P: 869-870.

Wilson R., Lonejoy F.M., Jaeger R.J., Landrigan P.L. Actue Aluminium phosphide poisoning aboard a grains freighter -epidemiologic, clinical and pathological findings. *JAMA.* 1980;2114:148-150.

Ziipf K., Arndt T., Heintz R. Clinical observation of a case of phostoxin poisoning. *Arch Toxicol.* 1967;22(4):209-12.8.

Zuryn S., Kuang J., Ebert P. Mitochondrial modulation of phosphine toxicity and resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol Sci.* 2008;102:179-186.

Toxicidad pulmonar por inyección intravenosa de eugenol Pulmonary toxicity due to an intravenous administration of eugenol

de Souza Viera Morales, Raquel*; Méndez Gura, Mónica

Departamento de Toxicología. Facultad de Medicina. Hospital de Clínicas. Montevideo. Uruguay
*ildrakel@hotmail.com

Recibido: 6 de julio de 2013
Aceptado: 27 de enero de 2014

Resumen. Se presenta el caso clínico de una paciente que instaló edema pulmonar no cardiogénico, luego de la inyección intravenosa de eugenol requiriendo un tratamiento agresivo de soporte de las funciones vitales en una Unidad de Cuidados Intensivos.

Palabras claves: Intoxicación por eugenol; Vía intravenosa; Edema pulmonar no cardiogénico; Automedicación.

Abstract. It is presented the case of a patient, who developed a non-cardiogenic pulmonary edema, after the intravenous administration of eugenol, requiring aggressive supportive measures in an Intensive Care Unit.

Keywords: Clove oil poisoning; Intravenous route; Non-cardiogenic pulmonary edema; Self-medication.

Introducción

El eugenol, $C_{10}H_{12}O_2$, es un derivado fenólico. Es uno de los principios activos del aceite esencial del clavo de olor, *Syzygium aromaticum*, que también se puede extraer de la nuez moscada, la pimienta, la canela y hojas de laurel. Es un líquido oleoso, de color amarillo pálido, poco soluble en agua y soluble en solventes orgánicos (alcohol). Es un producto utilizado en odontología debido a sus múltiples propiedades farmacológicas: anestésico, analgésico, antiinflamatorio, entre otras. Produce bloqueo de la conducción nerviosa, inhibición de la ciclooxigenasa, de la quimiotaxis de los neutrófilos, de la peroxidación lipídica inducida por los radicales libres; también inhibe la agregación plaquetaria y la síntesis de tromboxanos. Todos estos efectos explican sus propiedades anestésica, analgésica, antiinflamatoria, antioxidante y antitrombótica (González 2002).

En el Uruguay existen preparaciones comerciales de eugenol en pasta y en solución. Frascos por 30-60-70 y 100 ml con una concentración de 90 % de eugenol y 10% de aceite de oliva como vehículo. La dosis tóxica en humanos no

ha sido bien establecida (Micromedex Healthcare 2009). Los estudios en animales han determinado la dosis letal 50 oral en ratas en 1930 mg/kg. Una dosis de 0,25 mg/kg administrado a perros provoca síntomas digestivos y neurológicos. Con dosis mayores a 0,5 g/kg se produce la muerte en 24 horas. Con la inyección intravenosa se observó edema pulmonar (Kirsch y col. 1990; Haddad 1998). Ingerido en cantidad suficiente es responsable de graves complicaciones incluyendo falla respiratoria, falla hepática y depresión del SNC (Hartnoll y col. 1993; González 2002; Janes y col. 2005). La formación de un intermediario metabólico hepatotóxico mediante el sistema enzimático de la citocromo P450 es uno de los mecanismos propuestos para explicar la citotoxicidad del eugenol. Estudios *in vivo* en hepatocitos de rata documentan la depleción del glutatión hepático y su conjugación con glutatión sulfato y ácido glucurónico (Hartnoll y col. 1993; Eisen y col. 2004; Janes y col. 2005; Micromedex 2009). El eugenol también produce inhibición de la migración celular y modifica la síntesis de prostaglandinas. La capacidad de desacoplar la fosforilación oxidativa afecta la

respiración celular a nivel mitocondrial. Esto produce cambios en la actividad enzimática de la membrana celular (Damiani y col. 2003).

Caso clínico

Paciente de 34 años, de sexo femenino, con antecedentes de hipertensión arterial gestacional, depresión y cefaleas crónicas consultó en el Departamento de Emergencia por cefaleas. Recibió tratamiento analgésico por vía parenteral. Fue derivada a domicilio con circuito venoso para continuar el tratamiento en forma ambulatoria. Al día siguiente concurrió nuevamente a la emergencia con tendencia al sueño, secreciones asalmonadas y disnea. Refirió haberse inyectado 10 ml de solución de eugenol como analgésico. Al examen se encontraba lúcida, con tendencia al sueño, polipneica, sudorosa, con frialdad periférica, con una presión arterial de 90/40 mm Hg y con una frecuencia cardíaca de 130 cpm. Estertores crepitantes en los dos tercios inferiores de ambos campos pulmonares. La gasometría constató hipoxemia y acidosis metabólica (PO₂ 49 %, pH 7,14, BE-18). Laboratorio al ingreso: K 2,67 mmol/L, Na 133 mmol/L, tasa de protrombina 53 %. Se aspiraron secreciones asalmonadas. Requirió

intubación endotraqueal y asistencia ventilatoria mecánica. Se comenzó con inotrópicos y suero bicarbonatado. Fue trasladada a Unidad de Cuidados Intensivos.

La radiografía de tórax mostró edema pulmonar bilateral. ECG: taquicardia sinusal de 120 cpm. El ecocardiograma mostró una buena función sistólica ventricular izquierda, FEVI 60 %. En la evolución, presentó insuficiencia renal con diuresis conservada y normopotemia (Tabla 1). Se produjo un descenso de los valores de hemoglobina. Requirió asistencia respiratoria mecánica por 8 días. Se recuperó sin secuelas.

Discusión

La mayoría de los reportes de toxicidad del eugenol se refiere a reacciones locales y a efectos sistémicos debido a su uso en odontología. Hay algunos casos de severa toxicidad por ingestión, sobretodo en niños, donde se destaca la hepatotoxicidad y la coagulopatía. (Lane y col. 1991; Hartnoll y col. 1993; Eisen y col. 2004; Janes y col. 2005). La toxicidad pulmonar del eugenol se ha reportado en humanos y en animales. Se produjo edema pulmonar no cardiogénico en una mujer que voluntariamente se inyectó por vía endo-

Tabla 1. Valores de laboratorio

Días desde el ingreso	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°
Hematíes (x 10 ¹² /L)	5,95	4,36	3,53		3,12	3,33	3,01	3,05
Leucocitos (x 10 ⁹ /L)	26,4	17,9	13,1	9	7,28	11,90	10,10	10,40
Hemoglobina (g%)	17,4	12,7	10,1		9,03	9,57	8,79	8,74
Hematocrito (%)	50,3	36,6	29,6	31	26,40	28	25,5	26
Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	392	211	180		208	238	280	316
TP (%)	53	43			68,7	74,6		
INR	1,52	1,70			1,23	1,17		
Sodio (mmol/L)	133	138	138	136	138	139	139	139
Potasio (mmol/L)	2,67	5	4,4	4,4	4,60	4,9	5	4,10
Azoemia (g/L)	0,43	0,76	0,94		0,75	0,77	0,73	0,58
Creatininemia (mg%)	1,59	2,62	2,98		1,98	1,54	1,33	1,21
Bilirrubina total (mg%)	0,44	0,33	0,5		0,40	0,44		
Bilirrubina indirecta (mg%)	0,18	0,22	0,36		0,10	0,34		
Bilirrubina directa (mg%)	0,26	0,11	0,14		0,30	0,10		
AST (UI/L)	38	33	21		20	50		
ALT (UI/L)	16	16	12		18	44		
LDH (UI/L)					896			
GGT (UI/L)					100			

AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanino aminotransferasa; LDH: lactato deshidrogenasa; GGT: gamma glutamiltransferasa; TP: tasa de protrombina; INR: razón normalizada internacional.

venosa aceite de clavo (Kirsch y col. 1990). El mecanismo por el cual el eugenol causa edema pulmonar no cardiogénico es desconocido. En un estudio en ratas se demostró que el eugenol intravenoso causó distress respiratorio agudo y edema pulmonar hemorrágico con secuestro intrapulmonar de neutrófilos. Se sugiere que el mecanismo de injuria pulmonar estaría mediado por un mecanismo oxidativo (Kirsch y col. 1990; Wright y col. 1995; Haddad 1998; Goulet y col. 2011). La paciente desarrolló un cuadro clínico de edema pulmonar, con hipoxemia severa e imágenes radiológicas compatibles. La falta de factores cardiovasculares predisponentes, sumado a una silueta cardíaca normal en la radiografía y la evidencia ecocardiográfica de una función ventricular izquierda normal, nos llevan a plantear el diagnóstico de edema pulmonar no cardiogénico. Debido a la ausencia de una enfermedad previa u otra condición que ocasione edema pulmonar no cardiogénico, consideramos la inyección intravenosa de eugenol como la causa más probable. Las alteraciones clínicas sistémicas que se presentan cuando la vía de entrada es intravenosa, difieren de la presentación clínica cuando el eugenol es ingerido, en cuyo caso predomina la hepatotoxicidad. Esta paciente presentó descenso del hematocrito, del recuento plaquetario y de la tasa de protrombina. Estas alteraciones hematológicas pueden explicarse por el efecto antitrombótico del eugenol y por otros mecanismos de toxicidad aún no dilucidados (Hartnoll y col. 1993). El toque hepático con aumento no significativo de LDH y GGT ocurrió al sexto día de la evolución, a diferencia de lo que se ve cuando el eugenol es ingerido, que es precoz (Eisen y col. 2004). Las otras alteraciones bioquímicas que presenta la paciente se dan dentro del contexto de un paciente con un cuadro clínico grave. Se presentó un caso clínico grave, de intoxicación aguda producido por una sustancia que es causa infrecuente de intoxicación. Esto, en el contexto de una paciente que se automedica utilizando por vía parenteral un preparado de uso tópico odontológico. Cabe destacar, el fácil acceso a esta sustancia y la inusual vía de ingreso utilizada por la propia paciente. Esto último fue facilitado por una indicación médica que deriva a la paciente con un acceso venoso a domicilio para recibir tratamiento ambulatorio por personal de salud. Se debe priorizar las medidas de prevención

educando a la población en el uso seguro de los medicamentos.

Bibliografía citada

Damiani C.E., Rossoni L.V., Vassallo D.V. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. *Vascul Pharmacol.* 2003;40(1):59-66.

Eisen J.S., Koren G., Juurlink D.N., Ng V.L. N-acetylcysteine for the treatment of clove oil-induced fulminant hepatic failure. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2004;42(1):89-92.

González Escobar, Raimara. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Rev Cubana Estomatol.* 2002;39(2):139-156.

Goulet F., Vachon P., Hélie P. Evaluation of the Toxicity of Eugenol at Anesthetic Doses in Africa Clawed Frogs (*Xenopus laevis*) *Toxicol Pathol.* 2011;39(3):471-477.

Haddad L.M. The volatile oils. En: *Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose.* 3rd Ed. 1998. p. 1176-1177.

Halcomb S.E. Essential Oils. En: *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*, Flomenbaum, Neal E.; Goldfrank, Lewis R.; Hoffman, Robert S.; Howland, Mary Ann; Lewin, Neal A.; Nelson, Lewis. 8th Edition 2006. p. 658-659.

Hartnoll G., Moore D., Douek D. Near fatal ingestion of oil of cloves. *Arch Dis Child.* 1993;69(3):392-3.

Janes S.E., Price C.S., Thomas D. Essential oil poisoning: N-acetylcysteine for eugenol-induced hepatic failure and analysis of a national database. *Eur J Pediatr.* 2005;164(8):520-2. Epub 2005 May 14.

Kirsch C.M., Yenokida G.G., Jenen W.A., Wendland R., Suh H., Bourgault M. Non-cardiogenic pulmonary oedema due to the intravenous administration of clove oil. *Thorax.* 1990;45(3):235-236.

Lahlou S., Interaminense L.F., Magalhães P.J., Leal-Cardoso J.H., Duarte G.P. Cardiovascular effects of eugenol, a phenolic compound present in many plant essential oils, in normotensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;43(2):250-7.

Lane B.W., Ellenhorn M.J., Hulbert T., McCarron M. Clove Oil Ingestion in an Infant. *Human & Experimental Toxicology*. 1991;10(4):291-294.

MICROMEDEX ® 2.0 2012-2014 Truven Health Analytics Inc. [consulta en abril de

2013]. Disponible en: <http://www.micromedexsolutions.com>

Wright S.E., Baron D.A., Heffner J.E. Intravenous eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: proposed oxidant mechanisms. *J Lab Clin Med*. 1995;125(2):257-64.

COMUNICACIONES BREVES

***Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria, Nostocales) productora de microcistinas en Corrientes, Argentina**

***Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria, Nostocales) producing microcystins in Corrientes, Argentina**

Otaño, Silvia*; Bogarín, Cinthia

Laboratorio Central. Aguas de Corrientes S.A. Gobernador Pampín 115 (CP 3400), Corrientes, Argentina.

*silviaotano@gmail.com

Recibido: 7 de marzo de 2014

Aceptado: 2 de julio de 2014

Resumen. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya et Subba Raju 1972 es una especie capaz de generar diversas toxinas que impactan negativamente sobre la calidad del agua destinada al consumo humano así como a otros usos de la misma. Cepas del hemisferio norte producen la hepatotoxina cilindrospermopsina, mientras que las sudamericanas generan las toxinas neurotóxicas saxitoxinas. No se ha reportado hasta el momento la producción de microcistinas por parte de esta especie. El objetivo del presente estudio fue analizar la presencia de microcistinas en el agua del Arroyo Yatay en Corrientes, Argentina, y de cilindrospermopsina, saxitoxinas y microcistinas en cepas de *C. raciborskii* aisladas del mismo, mediante el ensayo por Inmuno Absorción Ligado a Enzimas (ELISA). Los resultados dieron negativos para microcistinas en el agua cruda, así como de cilindrospermopsina y saxitoxinas en el cultivo algal. Sin embargo, en el agua del cultivo se detectaron concentraciones de 2,34-2,50 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de microcistina-LR, confirmándose posteriormente su presencia mediante su análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). En estudios posteriores se deberán realizar análisis moleculares a los fines de establecer la caracterización genética de la cepa en estudio e investigar su relación filogenética con otras cepas provenientes de diversos ambientes a nivel mundial.

Palabras clave: Cultivo de algas; *Cylindrospermopsis raciborskii*; Microcistinas; Toxinas.

Abstract. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszyńska) Seenayya et SubbaRaju 1972 is a species capable of generating toxins that negatively impact on drinking water quality as well as other water uses. Northern strains can produce the hepatotoxin cylindrospermopsin, while southern strains can produce the neurotoxin saxitoxins. Microcystins production by this species has not been reported to date. The aim of this study was to analyze the presence of microcystins in raw water of Steam Yatay in Corrientes, Argentina, and cylindrospermopsin, saxitoxins and microcystins in strains of *C. raciborskii* isolated from that stream, by means of Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA). Results were negative for microcystins in raw water, as well as for cylindrospermopsin and saxitoxins in algal culture. Microcystins were detected in algal culture by ELISA test, at concentrations of 2.34-2.50 $\mu\text{g. L}^{-1}$ of microcystin-LR, and subsequent confirmation by means of High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Molecular studies should be carried out in the future to establish the genetic characterization of the strain under study and investigate their phylogenetic relationship with other strains from diverse environments.

Keywords: Algae culture; *Cylindrospermopsis raciborskii*; Microcystins; Toxins.

Introducción

Muchas especies de Cianobacterias son bien conocidas como formadoras de floraciones algales, las cuales pueden producir olores y sabores desagradables y diversas toxinas. Entre las toxinas hepatotóxicas se encuentran las microcistinas, la nodularina y la cilindrospermopsina, y entre las neurotoxinas las anatoxinas y las saxitoxinas (Chorus y Bartram 1999; Li y col. 2001; Namikoshi y col. 2003).

En el nordeste de Argentina se han detectado varias especies productoras de toxinas, entre ellas *Microcystis aeruginosa*, productora de microcistina, *Dolichospermum spiroides* y *Dolichospermum circinalis*, productoras de anatoxina-a, y *Cylindrospermopsis raciborskii*. Esta especie puede generar cilindrospermopsina, saxitoxinas, y la neurotoxina excitotóxica beta-metil amino alanina (BMAA) (Chorus y Bartram 1999; Fristachi y Sinclair 2008).

C. raciborskii es una especie de origen tropical altamente invasora que se ha dispersado a nivel mundial hacia zonas templadas. Puede desarrollarse en aguas con baja o alta intensidad lumínica, posee gran capacidad de almacenar fósforo, y es tolerante a un amplio rango de temperaturas, características que le permiten su adaptación a ambientes muy diversos (Jones y Sauter 2005; Fabre Iturburúa 2011).

Se ha encontrado que las cepas de Europa, Australia, Asia y África son productoras de cilindrospermopsina (Li y col. 2001; Wiedner y col. 2007; Fathalli y col. 2011). En las cepas sudamericanas no se ha detectado hasta el momento la generación de cilindrospermopsina. Lagos y col. (1999) registraron por primera vez la producción de saxitoxinas en cepas provenientes de dos reservorios del Estado de San Pablo, Brasil, extendiéndose estos registros hacia otras regiones de ese país (Yunesy col. 2003), así como en Uruguay (Piccini y col. 2011).

En el nordeste de Argentina se detectó por primera vez la producción de saxitoxinas en aguas conteniendo gran abundancia de *C. raciborskii* (Otaño 2009), predominando las gonyautoxinas GTX1 (53,90 µg.L⁻¹) y GTX5 (46,84µg.L⁻¹). Con el objetivo de conocer la producción de toxinas por parte de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* presente en el Arroyo Yatay (Corrientes, Argentina), se analizaron cilindrospermopsina, saxitoxinas y microcistinas

Material y métodos

Se recolectaron muestras de agua superficiales en la desembocadura del Arroyo Yatay, afluente del Río Uruguay, en la localidad de Paso de los Libres, Corrientes, Argentina, en marzo del 2012 (Figura 1).



Figura 1. Localización del sitio de estudio.

Se efectuó la identificación de especies por observación al microscopio óptico, utilizando claves y manuales taxonómicos (Huber-Pestalozzi 1938; Dvořák y Hašler 2007; Komárek 2013).

Las muestras fueron concentradas mediante red de fitoplancton de 20 µm de apertura de malla, e inoculadas en frascos Erlenmeyer de 50 mL conteniendo medio de cultivo BG11 sin adición de nitratos (Rippka y col.1979). Los cultivos se mantuvieron a 27 °C con un fotoperíodo de 12/12.

Las especies dominantes fueron reemplazadas paulatinamente por *Cylindrospermopsis raciborskii*, lográndose un cultivo monoalgal de esta especie mediante su inoculación en forma repetida en medios de cultivo frescos.

Se efectuó el recuento de organismos cada dos o tres días, mediante la técnica de la gota de Lackey (1938), determinándose su tasa de crecimiento, tiempo de duplicación y divisiones por día, de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned} \mu &= \text{Ln}(x_1/x_0) / t_1 - t_0 \\ \text{TD} &= \text{Ln}2/\mu \\ D &= \mu / \text{Ln}2 \end{aligned}$$

Donde μ es la tasa de crecimiento (días⁻¹), Ln es el logaritmo natural, x_0 y x_1 es la abundancia inicial y final de células, t_0 y t_1 el tiempo inicial y final, TD el tiempo de duplicación (días), y D divisiones por día.

En el agua del Arroyo Yatay se realizaron análisis de microcistinas por triplicado mediante la técnica ELISA (Chu y col. 1990), y en el agua del cultivo algal análisis de microcistinas, cilindrospermopsina y saxitoxinas, utilizando los kits Envirologix para microcistinas, R-Biopharm Ridascreen Fast Saxitoxin para saxitoxinas y Beacon para cilindrospermopsina.

No se efectuaron análisis de saxitoxinas en el agua cruda debido a la baja abundancia de las especies potenciales productoras de dichas toxinas.

Se extrajeron alícuotas del agua cruda y del cultivo, las cuales fueron repetidamente frizadas y desfrizadas, y luego filtradas, para la determinación de toxinas totales. Alícuotas del cultivo algal fueron filtradas por filtros de membrana de 0,45 µm para la determinación de toxinas extracelulares.

Posteriormente en el agua del cultivo algal se efectuaron análisis de microcistinas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con extracción en fase sólida y método de detección acetonitrilo: metanol: ácido trifluoroacéti-

co 0,01 M (80:10:10) a una longitud de onda de 238 nm

Resultados

La tasa de crecimiento media de *C. raciborskii* fue de 0,054 día⁻¹, y la máxima de 0,285 día⁻¹, con un tiempo de duplicación de 2,434 días, y 0,41 divisiones por día.

En el agua cruda no se detectó la presencia de *C. raciborskii* ni de microcistinas.

El primer análisis del agua del cultivo algal mediante la técnica ELISA resultó negativo para cilindrospermopsina y saxitoxinas. Sin embargo se detectó una concentración de 2,5 µg.L⁻¹ de microcistinas, ante una concentración de 5.856.000 cél.mL⁻¹ de *C. raciborskii*.

En un segundo análisis del agua del cultivo de algas, se detectó la presencia de microcistinas en concentraciones de 2,34 µg.L⁻¹ para microcistinas totales, de 2,21 µg.L⁻¹ para microcistinas extracelulares y de 0,13 µg.L⁻¹ para microcistinas intracelulares, correspondiente a una abundancia de *C. raciborskii* de 5.168.000 cél.mL⁻¹.

Los análisis efectuados por cromatografía líquida en el agua del cultivo algal resultaron en una concentración de 2,14 µg.L⁻¹ de microcistina-LR.

Discusión

La tasa de crecimiento máximo de *C. raciborskii* registrada en el presente estudio es menor que las registradas por otros autores quienes encontraron tasas entre 0,30 y 0,80 día⁻¹ (Leal Carneiro y col. 2009; Piccini 2011). Esto podría deberse a las condiciones del cultivo con diferentes requerimientos de temperatura, luz y nutrientes. Además, se utilizó un medio de cultivo deficiente en nitrógeno, fomentando de esta manera la formación de células especializadas y la fijación del nitrógeno atmosférico. Esto constituye un consumo energético importante, lo cual produciría una disminución en las velocidades de crecimiento de las poblaciones (Fabre Iturburúa 2011).

La presencia de microcistinas se detectó solamente en cultivos con elevadas concentraciones de *C. raciborskii*, abundancias que en el ambiente natural se alcanzarían solamente durante la formación de floraciones.

Estudios moleculares efectuados por Fathalli y col. (2011) en la cepa de *C. raciborskii* CYL-BM-07, aislada de un reservorio de Túnez en el año 2008, mostraron que la misma no produce cilindrospermopsina, saxitoxinas ni microcistinas. Sin embargo, reportaron por primera vez la presencia de *mcyA* y *mcyE*, dos de los seis

genes característicos sintetizadores de microcistinas presentes en todas las cepas que producen microcistinas. Estos genes en particular fueron genéticamente más similares a las secuencias homólogas encontradas en especies de *Microcystis* que en aquellas encontradas en otros géneros de cianobacterias.

En estudios futuros deberían realizarse análisis moleculares de la cepa aislada en el presente estudio a los fines de establecer su caracterización genética e investigar su relación filogenética con otras cepas provenientes de diversos ambientes a nivel mundial.

Hasta el momento, la legislación en Argentina no contempla el control de toxinas en agua potable. Solamente algunas plantas potabilizadoras en el país realizan como rutina la identificación y el recuento de algas y el análisis de microcistinas y, en general, las restantes toxinas no son tenidas en cuenta. La gran cantidad de especies potenciales productoras de toxinas registradas en todo el país, y el aumento en la frecuencia e intensidad de las floraciones de algas nocivas, generan la imperiosa necesidad de incorporar el control de algas y de toxinas como parámetros de calidad de agua para consumo humano.

Bibliografía citada

Chorus I., Bartram J. Toxic Cyanobacteria in Water. World Health Organization. London, England. 1999.

Chu F.S., Huang X. Wei R.D. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. J. Assoc. Analyt. Chem. 1990;73(3):451-456.

Dvořák P., Hašler P. Occurrence and morphological variability of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosz) Seenayya et Subba Raju (Cyanophyta, Nostocales) near Olomouc in 2006. Fottea. 2007;7(1):39-42.

Fabre Iturburúa M.A. Flexibilidad fenotípica de la cianobacteria invasora *Cylindrospermopsis raciborskii* en un gradiente lumínico. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Universidad de la Republica. Montevideo, Uruguay. 2011.

Fathalli A., Ben Rejeb Jenhani A., Moreira C., Azevedo J., Welker M., Romdhane M., Antunes A., Vasconcelos V. Genetic variability of the invasive cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* from Bir M'cherga reservoir (Tunisia).

Arch Microbiol. 2011;193:595–604.

Fristachi A., Sinclair J.L. Occurrence of Cyanobacterial Harmful Algal Blooms Workgroup Report. Chapter 3. En: Kenneth Hudnell H., editor. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. Springer, New York, USA. 2008; p.45-103.

Huber-Pestalozzi G. Das phytoplankton des Süßwassers. Allgemeiner Teil. Blaualgen. Bakterien. Pilze. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Erwin Nägele). Stuttgart. Band XVI. Teil. 1938.

Jones W. y Sauter S. Distribution and Abundance of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Indiana Lakes and Reservoirs. School of Public and Environmental Affairs. Indiana University. USA. 2005.

Komárek J. Heterocystous Genera. Süßwasserflora von Mitteleuropa. III Cyanoprokaryota. Büdel B., Gärtner G., Krienitz L., Schagerl M. Eds. Springer Spektrum, Berlin. 2013. 584 pp.

Lackey J.B. The manipulation and counting of river plankton and changes in some organisms due to formalin preservation. Pub. Health Rep. 1938;53:2080.

Lagos N., Onodera H., Zagatto P.A., Andriolo D., Azevedo S., Oshima Y. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brasil. Toxicon. 1999;37(10):1359-1373.

Li R., Carmichael W.W., Brittain S., Eaglesham G.K., Shaw G.R., Liu Y, Watanabe M.M. First Report of the Cyanotoxins *Cylindrospermop-*

sin and Deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). J Phycol. 2001;37:1121-1126.

Namikoshi M., Murakami T., Watanabe M.F., Oda T., Yamada J., Tsujimura S., Nagai H., Oishi S. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. Toxicon. 2003;42:533-538.

Otaño S.H. Saxitoxins in Argentinean Inland Waters. Harmful Algae News. 2009;39:19.

Piccini C., Aubriot L., Fabre A., Amaral V., González-Piana M., Giani A., Figueredo C., Vidal L., Kruk C., Bonilla S. Genetic and eco-physiological differences of South American *Cylindrospermopsis raciborskii* isolates support the hypothesis of multiple ecotypes. Harmful Algae. 2011;10:644–653.

Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 1979;111:1–61.

Wiedner C., Rücker J., Stüken A., Preubel K., Fastner J., Chorus I., Nixdorf B. *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Cylindrospermopsin* in Lakes of the Berlin Area: Occurrence, Causes and Consequences. Kompetenzzentrum Wasser Berlin Publication Series. 2007; Volume 6.

Yunes J.S., Cunha N.T., Barros L.P., Proença L.A.O., Monserrat J.M. Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazilian freshwater. Taylor & Francis Health Sciences. Comments on Toxicology. 2003;9:103-115.

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, imágenes, 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.

Las imágenes en Toxicología pueden corresponder a imágenes relacionadas con la toxicología, desde lo artístico a los aspectos biológicos: plantas tóxicas, hongos tóxicos, animales venenosos, animales ponzoñosos, floraciones algales, químicos, alteraciones ambientales, casos clínicos, diagnóstico por imágenes (radiografía, electrocardiogramas, ecografías, angiografía, tomografía, resonancia magnética, microscopía óptica o electrónica, etc.).

El objetivo de la Sección Imágenes en Toxicología es la publicación de imágenes originales (1-2 figuras de alta calidad) o clásicas intere-

santes o hallazgos inusuales que faciliten el diagnóstico clínico, de laboratorio o eco-epidemiológico de causas con origen toxicológico.

Las imágenes pueden no ser excepcionales, pero sí ilustrativas.

El título debe ser corto y descriptivo. Si la imagen es una imagen clínica, el texto debería ser una descripción de la presentación del paciente seguida por puntos relevantes explicativos y el diagnóstico final. Las imágenes deberían incluir una leyenda descriptiva. Si la imagen corresponde a otros puntos de la toxicología, se debe incluir una breve descripción del contexto de la misma en el texto.

Por favor, utilice flechas o signos para identificar los puntos de interés en la imagen. En los casos clínicos remueva cualquier información de identificación del paciente.

El máximo de palabras recomendado es: resumen 200, texto 1000 y no más de 12 referencias.

Se aceptará un máximo de 3 autores por imagen.

En caso que la imagen no sea original, debe acompañarse de la autorización del propietario o de quien posea los derechos de la misma, lo que debe estar indicado en la nota que se presente al Comité Editorial de *Acta Toxicológica Argentina*.

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 cambios o aceptar para su publicación el trabajo sometido a su consideración. La identidad de autores y revisores se mantendrá en forma confidencial.

Envío de manuscritos

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.

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, 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 con una calidad suficiente (mínimo 300 dpi) para asegurar una buena reproducción. Se aceptarán fotografías en 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, images, 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.

Images in Toxicology may be images related with Toxicology from the artistic to the biological and medical aspects: toxic plants, toxic fungi, venomous animals, poisonous animals, algal bloom, chemicals, environmental ecotoxicological alterations, clinic cases, diagnostic images (radiograph, electrocardiogram, echography, angiography, tomography, magnetic resonance Image, optic or electron microscopy, etc).

The objective of the Section of Images in Toxicology is the publication of original images (1-2 high quality figures) of classic, interesting or unusual findings that facilitate the clinical, laboratorial or eco-epidemiological diagnosis of toxicological origin.

Such images should be not necessarily excep-

tional, but illustrative.

The title should be short and descriptive. If the image is a clinic image, text should be a description of the patient presentation, followed by relevant explicative points and the final diagnosis. Images should include a descriptive legend. If the image is of other fields of the toxicology, a brief description of the context should be included in the text.

Please use labels and arrows to identify points of interest on the image. In clinical cases remove any identifying patient information.

Maximum word guidance: abstract 100 words, text 1000 words. The number of references should not be over 12.

No more than three authors may be listed.

If the image is not original, the authorization of the author or whom poses the copyright must be added in the presentation letter to be presented to the Editorial Committee of *Acta Toxicológica Argentina*.

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>

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, 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 superscript 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.

Photographs should have proper quality and a minimum resolution of 300 dpi. JPEG and GIF are accepted file formats for photographs and figures. 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, imagens, 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.

Imagens em Toxicologia podem corresponder a imagens relacionadas com a toxicologia, desde o artístico aos aspectos biológicos: plantas tóxicas, fungos tóxicos, animais venenosos, animais peçonhentos, florações de algas, químicos, alterações ambientais, casos clínicos, diagnóstico por imagens (radiografia, eletrocardiogramas, ecografias, angiografia, tomografia, ressonância magnética, microscopia óptica ou eletrônica, etc.).

O objetivo da Sessão Imagens em Toxicologia é a publicação de imagens originais (1-2 figuras de alta qualidade) ou clássicas interessantes

ou achados pouco usuais que facilitem o diagnóstico clínico, laboratorial ou eco epidemiológico de causas com origem toxicológica.

As imagens não devem ser excepcionais, mas sim ilustrativas.

O título deve ser curto e descritivo. Se a imagem é uma imagem clínica, o texto deveria ser uma descrição da apresentação do paciente seguida por pontos relevantes explicativos e o diagnóstico final. As imagens deveriam incluir uma legenda descritiva. Se a imagem corresponde a outros pontos de toxicologia, se deve incluir uma breve descrição do contexto da mesma no texto.

Por favor, utilize flechas ou símbolos para identificar os pontos de interesse na imagem. Nos casos clínicos remova qualquer informação de identificação do paciente.

O máximo de palavras recomendado é: Resumo 200, Texto 1000 e não mais de 12 referências.

Não deve haver mais de três (3) autores.

No caso que a imagem não seja original, deve ser acompanhada de autorização do proprietário ou de quem possua os direitos da mesma, o que deve estar indicado na nota que apresentada ao Comitê Editorial da *Acta Toxicológica Argentina*.

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.

Aspectos gerais na preparação do trabalho como artigo original

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

Na primeira página deverá estar indicado: título do trabalho, 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 superíndices 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 com qualidade suficiente (mínimo 300 dpi) para assegurar uma boa reprodução. 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 Referências, 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.htm>Article.

b. Página de internet

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

c. Parte de uma página de internet

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

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