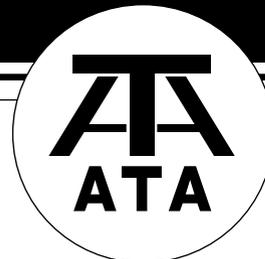


ISSN 0327-9286

Acta
Toxicológica
Argentina

Publicación oficial de la Asociación Toxicológica Argentina



Volumen 7
Nº 1
Julio 1999



ASOCIACION
TOXICOLOGICA
ARGENTINA

Personería Jurídica N° 331/90

**Acta
Toxicológica
Argentina**

Asociación Toxicológica Argentina

Comisión Directiva

Presidente

Alberto A. Gurni

Vicepresidente

Marta Ana Carballo

Secretario

Teodoro Stadler

Tesorera

Graciela Beatriz Bassols

Vocales Titulares

Patricia Quiroga
Susana García
Lucrecia Ferrari

Vocales Suplentes

Cristina Rubio
Héctor Mosto
Noemí Verrengia Guerrero

Tribunal de Honor

Norma Vallejo
Ana Fulginiti
Adriana Ferrero

Comité Científico

Nelson F. Albiano
Héctor M. Godoy
Otmaro E. Roses
Alfredo Salibián
Eduardo Zerba

Organo de Fiscalización

Miembros Titulares

Carlos Damin
Adriana Ridolfi

Miembro Suplente

María Eugenia García

Acta Toxicológica Argentina

Director Editor

Otmaro Enrique Roses

Comité de Redacción

Clara M. López
Raúl Alzogaray
Edda C. Villaamil
Gerardo D. Castro

Comité Editorial 1999

Juan M. Berman
E. de Camargo Fonseca Moraes (Brasil)
José A. Castro
Antonio Colombi (Italia)
Heraldo Donnewald
Ricardo Duffard
Ana S. Fulginiti
Veniero E. Gambaro (Italia)
Carlos A. García
Juan C. García Fernández
Estela Gimenez
Héctor Godoy
Irma Rosas Pérez (México)
Carlos Reale
Félix G. Reyes (Brasil)
Alfredo Salibian
Marta Salseduc
Edward Smith (Naciones Unidas)
Roberto Tapia Zuñiga (Chile)
Enrique Tourón
Norma Vallejo
Gastón Vettorazzi (España)
Edgardo J. Wood
Eduardo N. Zerba

Acta Toxicológica Argentina (ISSN 0327-9286), órgano oficial de la Asociación Toxicológica Argentina (ATA).
Se publica semestralmente. Registro de la Propiedad Intelectual N° 983265.

Alsina 1441 Of. 302 (1088) Buenos Aires - Argentina. Tel/Fax: 54-11 4381-6919

INDICE
(CONTENTS)

Editorial	3
Comportamiento de las enzimas colinesterasa y alanin transaminasa en ratones B6D2F1 expuestos a Fentión. <i>Cholinesterase and alanin transaminase activities in mice B6D2F1 exposed to Fenthion.</i> Laria Lamela R. E.; Fong Lores O.; Betancourt Hernández J. E.; Colón Suarez, M.; Alvarez Fontanet E.; Pascual Simón J. R.	4
Lesiones locales y sistémicas inducidas por veneno de <i>Bothrops alternatus</i> (víbora de la cruz) de Argentina. <i>Local and sistemic lesions induced by Bothrops alternatus venom (víbora de la cruz) of Argentine.</i> Teibler P.; Acosta de Pérez O.; Maruñak S.; Ruiz R.; Koscinczuk P.; Sánchez Negrette M.; Mussart de Coppo N.	7
Rabdomiólisis aguda por exposición percutanea a un herbicida en dos pacientes atendidos en Rosario, Argentina. <i>Rhabdomyolisis after acute skin exposure to a herbicide. Report of two clinical cases.</i> Piola, J. C.; Prada, D. B.; Ezpeleta, D. C.	11
Criterio de Salud Ambiental (OMS) Nº 164 Cloruro de metileno. <i>Enviromental Health Criteria (WHO) Nº 164 Methylene chloride.</i>	16
Criterio de Salud Ambiental (OMS) Nº 156 Hexaclorobutadieno. <i>Enviromental Health Criteria (WHO) Nº 156 Hexachlorobutadiene.</i>	20
Criterio de Salud Ambiental (OMS) Nº 170. Evaluación del riesgo de sustancias químicas para el ser humano. Extrapolación de los valores guía para límites de exposición basado en los criterios de salud. <i>Enviromental Health Criteria (WHO) Nº 170. Assessing human health risks of chemicals. Derivation of guidance values for health-based exposure limits.</i>	23
Obituario - <i>Obituary</i>	24
Indice de autores, Indice Temático, Agradecimientos <i>Authors index, Subject Index, Acknowledgements</i>	25
Instrucciones para los autores de contribuciones <i>Instructions to the contributors</i>	26

Acta Toxicológica Argentina está indexada en el Chemical Abstracts. Dicha entidad ha fijado como abreviatura de esta revista la siguiente: "**Acta Toxicol. Argent.**"

**La página de Internet de Acta Toxicológica Argentina, es la siguiente: <http://www.hva.org.ar>
sitio: hospital virtual de argentina**

EDITORIAL

TOXICOLOGÍA Y ECOTOXICOLOGÍA: ¿UNA O DOS CIENCIAS?

La definición de la Toxicología como rama de la ciencia ha ido evolucionando con el tiempo para dar lugar a innumerables polémicas. Los primeros intentos por definirla hacían referencia a la disciplina "que trata sobre los venenos" y se decía "que un veneno es cualquier sustancia que administrada a un organismo vivo le produce un efecto nocivo".

Actualmente el concepto de "veneno" suena anticuado y está asociado con efectos tóxicos agudos, habida cuenta de los avances científicos que han demostrado la inexistencia de sustancias inocuas. Todo compuesto químico, de origen natural o sintético, presenta un riesgo potencial para los organismos vivos y la seguridad pasa por un manejo correcto de los mismos. Baste como ejemplo las estimaciones realizadas de mortalidad infantil originada por intoxicaciones accidentales, de las cuales un 15 % corresponde a las causadas por salicilatos, particularmente aspirina (E. Hodgson y P. Levi, *Modern Toxicology*, Appleton & Lange, 1997).

En la actualidad el campo de acción de la Toxicología es de "amplio espectro" y abarca el estudio de toda interacción nociva que se produzca entre agentes químicos y físicos y los seres vivos. Esta incumbencia es tan amplia que un audaz autor aseveró que la Farmacología es una rama de la Toxicología. Suele ocurrir que la aparición de una nueva rama de alguna disciplina científica que estudia de problemas preocupantes para la sociedad, le confiere a esa novedosa área del conocimiento, no sólo entidad propia, sino también preeminencia sobre la ciencia que le dio origen.

Cuando en 1962 Raquel Carson publicó en los EE.UU su célebre libro "Silent spring" (Hamish Hamilton, London) la sociedad tomó conciencia de que estaba frente a un nuevo y grave problema: el impacto ambiental causado por el uso irracional de plaguicidas inadecuados. Este impacto ambiental cabía perfectamente en la concepción moderna de las incumbencias toxicológicas. Se estaba en presencia de interacciones nocivas entre agentes químicos (los plaguicidas) y los seres vivos (mamíferos salvajes, aves, peces, etcétera; componentes de la fauna en riesgo).

No obstante, surgió un nuevo enfoque de la Toxicología. En 1969, Truhaut le dio identidad propia a este enfoque bajo el nombre de Ecotoxicología y publicó en 1977 su primera definición formal (Truhaut R., *Ecotoxicol. Env. Safety*, 1, 151-173 (1977)). Así nació esta nueva disciplina como una extensión natural de la Toxicología. En ella, las interacciones nocivas entre los agentes químicos y los organismos vivos tienen como nuevo escenario la contaminación ambiental y los ecosistemas. Es así que para este nuevo abordaje, los conocimientos básicos sobre ecología se vuelven indispensables.

No hay dudas que la Toxicología, planteada a partir de su definición general, es una única ciencia que se aboca a las referidas "interacciones nocivas", sea entre un fármaco mal dosificado y un ser humano, o entre un insecticida derramado en un río y la fauna acuática que lo habita.

El gran desafío para el futuro consiste en mantener a la Toxicología como una gran ciencia abarcadora, nutrida de la mayor cantidad de profesiones que tengan algo para aportar al enfoque científico mas amplio posible. Si así fuera, el intercambio profesional multidisciplinario hará fuertes y útiles a todas las ramas de la Toxicología, incluso la Ecotoxicología. La concepción "divide y reinarás" es una aberración en términos de pensamiento científico. Sólo el intercambio de conocimientos y los enfoques multidisciplinarios permitirán que la Toxicología sea lo que debe ser, una ciencia al servicio del hombre, ya sea para resolver problemas de salud humana o de contaminación de ecosistemas.

E.N.Z.

COMPORTAMIENTO DE LAS ENZIMAS COLINESTERASA Y ALANIN TRANSAMINASA EN RATONES B6D2F1 EXPUESTOS A FENTHION.

¹Laria Lamela, Raico Ernesto; ¹Fong Lores, Onel; ²Betancourt Hernández, Juan Esmérico; ¹Colón Suarez, Merceidís; ¹Alvarez Fontanet, Ernesto; ²Pascual Simón, José Ramón.

¹Departamento de Bioquímica Clínica; ²Departamento Anatomía Patológica; ³Departamento Toxicometría - Centro de Toxicología y Biomedicina, Autopista Nacional Km. 1 1/2 Apartado Postal 4033, Santiago de Cuba 90400. Teléfono 4-38-38. Fax (53) (226) 86200. e-mail: toximed@toxi.scu.sld.cu

RESUMEN: Laria Lamela R. E.; Fong Lores O.; Betancourt Hernández J. E.; Colón Suarez, M.; Alvarez Fontanet E.; Pascual Simón J. R. **Comportamiento de las enzimas Colinesterasa y Alanin Transaminasa en ratones B6D2F1 expuestos a Fentión.** *Acta Toxicológica Argentina. (1999) 7 (1): 4-6.* Las actividades enzimáticas de la Colinesterasa y la Alanin Transaminasa, así como las pruebas histológicas de hígado, fueron monitoreadas a las 0, 8, 16, 24 y 48 horas de la administración de 80 mg/Kg. de Fentión a ratones de la línea B6D2F1 por vía oral. En los resultados obtenidos se observó una inhibición significativa de la enzima Colinesterasa y un aumento de la actividad Alanin Transaminasa en los grupos de ratones tratados con el insecticida, no encontrándose una correlación significativa entre los comportamientos de ambas enzimas. Los estudios histopatológicos de las muestras de hígado de los ratones tratados con Fentión corroboraron la presencia de daños celulares en este órgano.

PALABRAS CLAVES: Fentión; Colinesterasa; Alanin Transaminasa; Hígado

ABSTRACT: Laria Lamela R. E.; Fong Lores O.; Betancourt Hernández J. E.; Colón Suarez, M.; Alvarez Fontanet E.; Pascual Simón J. R. **Cholinesterase and Alanin Transaminase activities in mice B6D2F1 exposed to Fenthion.** *Acta Toxicológica Argentina. (1999) 7 (1): 4-6.* Enzymes activities of Cholinesterase and Alanin Transaminase and liver histopathology were monitored at 0, 8, 16, 24 and 48 hours after oral administration of Fenthion (80 mg/Kg.) in mice B6D2F1. Results showed a decrease in Cholinesterase activity and an enhancement in Alanin Transaminase activity in mice treated with the organophosphorus compound. No correlation between both parameters was observed. Histopathology from mice treated with Fenthion showed cellular damage in this organ.

KEY WORDS: Fenthion; Cholinesterase; Alanin Transaminase; liver.

INTRODUCCIÓN

El Fentión (O, O-dimetil-O-(4-metil mercapto) -3-metilfeniltiofosfato) es un organofosforado del grupo de los ditiofosfatos usado ampliamente en el control de vectores y en la eliminación de plagas, y a su vez uno de los más citados en los casos de intoxicación o envenenamiento por tales compuestos. Es bien conocido como inhibidor de las colinesterasas⁽¹⁾ y produce efectos tóxicos debido a su alta persistencia ambiental y capacidad de acumularse en el tejido adiposo.⁽²⁾

En los laboratorios clínicos una forma de determinar el riesgo de exposición y el potencial neurotóxico de los organofosforados es mediante la evaluación de la actividad colinesterasa presente en la sangre y/o el plasma.

Aunque la inhibición de la actividad de las colinesterasas es el mecanismo de acción reconocido para los organofosforados, muchas preguntas quedan por contestar al considerar el uso de la inhibición de las mismas como un elemento crítico para establecer el riesgo de intoxicación por pesticidas. Entre las preguntas está si la inhibición de la colinesterasa por organofosforados se relaciona con los efectos clínicos que estos puedan causar en cualquier órgano o tejido.⁽³⁾

El estudio de las enzimas del plasma tiene su máxima utilidad en el diagnóstico clínico de las enfermedades hepáticas.⁽⁴⁾ Para hacer el diagnóstico de los pacientes afectados de enfermedades hepáticas es útil la determinación de la variación de las actividades en el plasma de las transaminasas, siendo la alanin transaminasa una de las más empleadas en los laboratorios clínicos.

Los ensayos clínicos de actividad colinesterasa han sido útiles en la diferenciación de las enfermedades del hígado, siendo empleada como un indicador sensible de la disfunción hepática en el síndrome de sepsis sistémica,⁽⁵⁾ así como para diferenciar cirrosis hepática de la hepatitis crónica, y para identificar grupos de alto riesgo de carcinomas hepatocelulares.⁽⁶⁾

El presente trabajo tiene como finalidad evaluar el

comportamiento de los indicadores bioquímicos colinesterasa y alanin transaminasa como indicadores de la exposición y daño hepático y correlacionar los comportamientos de ambas enzimas en muestras de plasma obtenida de ratones de la línea B6D2F1 tratados con Fentión, para profundizar en la utilidad clínica de estos indicadores bioquímicos en presencia de un compuesto organofosforado.

Se realizaron pruebas histológicas en las muestras de hígado de estos ratones ya que para los estudios que implican sustancias que pueden ocasionar daño a nivel del hígado, u otro órgano o tejido, la evaluación histopatológica de este forma parte del diagnóstico de certeza que se pueda dar.^(7,8,9)

MATERIALES Y METODOS

Se emplearon 40 ratones hembras de la línea B6D2F1 procedentes de CENPALAB (Cuba) con pesos corporales entre 15 y 20 g. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con Ratonina y agua acidulada y se mantuvieron a una temperatura de 23° C ± 2° C y humedad de 61.3%, con períodos de iluminación/oscuridad de 12 horas, durante todo el tiempo que duró el experimento.

El insecticida fue preparado por pesada y disuelto en aceite mineral por agitación en vórtex hasta lograr completa disolución. Antes de cada administración la solución fue agitada por vórtex nuevamente.

Diseño del estudio

Cinco grupos de ratones hembras de la línea B6D2F1, escogidos al azar fueron tratados con una dosis de Fentión de 80 mg/Kg. administrada por vía oral en un volumen de 0.1 ml de aceite mineral. Como controles negativos se emplearon cinco grupos de ratones a los que se les administró 0.1 ml de aceite mineral. Las determinaciones se realizaron a las 0, 8, 16 y 24 horas de administración; para el caso de las 48 horas a los ratones se les administró la misma dosis de Fentión repeti-

da cada 24 horas hasta las 48 horas y 3 horas antes de ser sacrificados.⁽²⁾

Los animales fueron anestesiados con éter, y las muestras de sangre se obtuvieron por punción intracardíaca.⁽¹⁰⁾ La eutanasia se realizó por dislocación cervical. La sangre colectada en tubos con heparina fue centrifugada a 2000 r.p.m. durante 10 minutos para extracción del plasma. Inmediatamente después de la extracción de sangre se extrajo el hígado, se pesó y se sumergió en formalina al 10 % para su conservación hasta realizar las pruebas histológicas.

Se determinaron las actividades colinesterasa por el método de la Huerga modificado para la determinación de actividad colinesterasa sérica⁽¹¹⁾ y transaminasa (ALAT) según el método de Reitman y Frankel⁽¹¹⁾ en las muestras de plasma obtenidas.

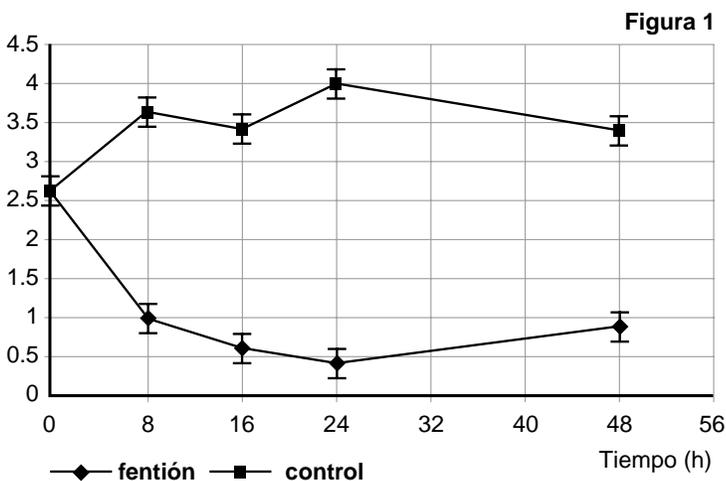
Las muestras de hígado fueron fijadas en formalina neutra 10 % y alcohol 70 %. Se utilizó el método de inclusión en parafina para realizar los cortes. Las preparaciones se tiñeron por hematoxilina/eosina.

Con el objetivo de hallar las diferencias significativas entre los tratamientos aplicados a los diferentes grupos de ratones se realizó un análisis de varianza de clasificación doble usando un diseño aleatorizado de efectos aleatorios para las variables colinesterasa y transaminasa. En el caso de encontrarse diferencias significativas, se realizó el test de Duncan de comparación de medias para determinar las medias significativas. Estas pruebas se realizaron con el empleo del paquete de programas estadísticos Stat sobre MS Dos. El coeficiente de correlación entre las actividades de ambas enzimas y las rectas de correlación se obtuvieron con el empleo del paquete de programas estadístico sobre Microsoft Excel para Windows 95.

RESULTADOS Y DISCUSION

Actividad Colinesterasa y Alanin transaminasa (ALAT)

La figura 1 refleja una disminución de la actividad Colinesterasa de los ratones tratados con Fentiión con respecto a los controles. Esto se corrobora con el análisis estadístico de los datos obtenidos, que muestran una di-



Comportamiento en el tiempo de la actividad colinesterasa en los grupos de ratones controles y los tratados con Fentiión

ferencia muy significativa ($p < 0.05$) entre los grupos de ratones controles y los tratados con el insecticida.

Tabla 1. Comportamiento de la actividad ALAT en el tiempo en los grupos de ratones controles y los tratados con Fentiión

Tiempo (h)	Actividad ALAT (U/L)				
	0	8	16	24	48
Grupo Control	4.3 ± 2.5	7.2 ± 3.8	9.67 ± 6.2	11.6 ± 2.7	10.3 ± 5.8
Grupo Fentiión	4.4 ± 2.3	10.9 ± 3.1	15.9 ± 2.1 ^a	10.5 ± 2.4	14.12 ± 2.0 ^b

Los valores son la media ± SD (n = 3-5)

Todos los valores de actividad ALAT encontrados en el grupo de ratones tratados con el insecticida difieren significativamente de los valores encontrados para el grupo control ($p < 0.05$)

(a) y (b) difieren significativamente del resto de los valores de actividad ALAT reportados para el grupo de ratones tratados con el insecticida ($p < 0.05$)

En la tabla 1 se observa un incremento de la actividad ALAT en los ratones tratados con el Fentiión comparado con los controles. El análisis estadístico de los datos mostró una diferencia significativa en los valores de actividad de la enzima entre los grupos controles y los tratados con el insecticida ($p < 0.05$). Al analizar el efecto de los diferentes tiempos de determinación sobre la actividad ALAT se encontró una diferencia significativa entre estos ($p < 0.05$). Las pruebas de comparación de medias arrojó que los valores más significativos se encuentran a las 16 y 48 horas para los ratones tratados con Fentiión (15.9 + 2.1; 14.12 + 2.0 U/l), mientras que para los ratones controles no se encontraron diferencias significativas entre las actividades de la enzima para los diferentes tiempos.

Correlación entre actividad colinesterasa y transaminasa

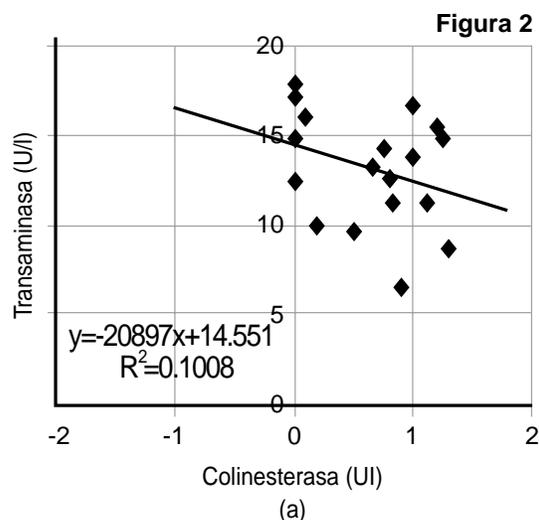
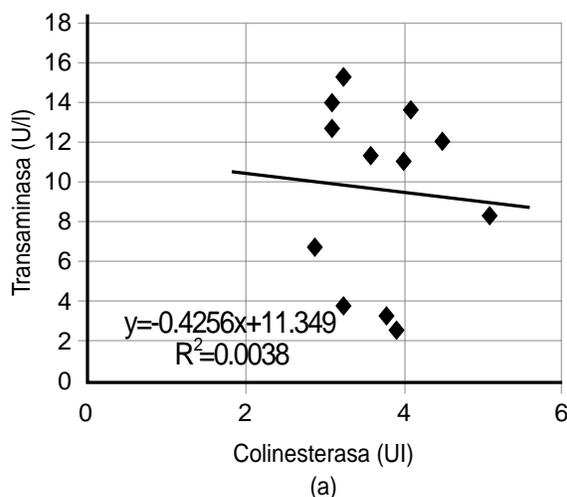
Este análisis se realizó teniendo en cuenta los valores de actividad ALAT y Colinesterasa obtenidos para los grupos controles y los tratados con Fentiión en los diferentes tiempos empleados (figura 2).

Se encontró que tanto para los controles como los tratados con el Fentiión no existe una correlación significativa ($p > 0.05$) entre las actividades de las enzimas al ser no significativos los coeficientes de correlación calculados en cada caso (-0.062; -0.42).

Sin embargo puede apreciarse que en los grupos donde se aplicó el organofosforado hay un coeficiente de correlación más elevado (-0.42) que en los controles.

Este aumento en el coeficiente de correlación se debe a la presencia de lesiones hepáticas provocadas por el pesticida, y pudiera estar dado por un aumento en la concentración de la colinesterasa en plasma.

Existen evidencias de otros trabajos realizados en aves con malatión que la presencia de este tipo de compuestos o sus metabolitos en el hígado puede conducir al aumento de las concentraciones de esta enzima en el plasma por liberación de la misma desde los hepatocitos dañados, pero este incremento está enmascarado por la inhibición global de la enzima en los animales expuestos⁽¹²⁾, razón por la cual no se aprecia un coeficiente de correlación significativo entre las enzimas en los grupos tratados con el insecticida.



Correlación entre las actividades colinesterasa y ALAT para los grupos de ratones controles (a) y los tratados con Fentión (b).

Análisis Histopatológicos

Los análisis histopatológicos mostraron que el Fentión es capaz de producir un daño en el hígado, fundamentalmente en las regiones periportal y centrolobulillar coincidiendo esto con los criterios planteados por Badr⁽¹³⁾, el cual refiere que estas sustancias químicas causan un daño en el hígado localizado en las regiones periportal o centrilobulillar del lóbulo hepático. Las principales manifestaciones que se encontraron fueron del tipo necrosis con infiltración de células mononucleares, fundamentalmente a las 8 y 16 horas de la administración del compuesto.

CONCLUSION

Con este análisis se demuestra que la inhibición de la Colinesterasa es un buen indicador de la exposición a Fentión siendo severamente inhibida y los cambios en la actividad alanin transaminasa constituyen un indicador de la presencia de lesiones hepáticas provocado por este insecticida, aunque no existe una correlación significativa entre los comportamientos de ambas enzimas. De esta forma los cambios en la actividad de la enzima colinesterasa provocados por el Fentión no reflejan los daños producidos por este compuesto a nivel hepático producto de la inhibición que sufre la enzima en presencia de este tipo de compuestos. Es importante señalar además que el ensayo de actividad colinesterasa no refleja los cambios producidos en la concentración de la enzima en el plasma.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Christenson, W.R (1994). Interlaboratory cholinesterase determinations and the effect on the results of statistical evaluation of cholinesterase inhibition. *Toxicology Letters*, 7, 139-150.
- Bagchi, D (1995). In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology*, 104, 129-140.
- Padilla, S (1995). Regulatory and research issues related to cholinesterase inhibition. *Toxicology*, 102 (1-2), 215-220.
- Henley, KS (1968). *Enzimas en el suero y su valor diagnóstico*. Versión española. Edición Expax, Barcelona, 79-101.
- al - Kassab, A.S. y Vijayacumar, E (1995). Profile of serum cholinesterase in systemic sepsis syndrome (septic shock) in intensive care unit patients. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 33 (1), 11-14.
- Ohkura, T (1994). Increase of fucosylated serum cholinesterase in relation to high risk groups for hepatocellular carcinomas. *Cancer. Res.*, 54 (1), 55-61.
- Travlos, G.S (1995). Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histopathology findings in 13-weeks toxicity studies in rats. *Toxicology*, 107, 17-29.
- Irausquin, H (1992). The value of clinical chemistry data in animal screening studies for safety evaluation. *Toxicol. Pathol.*, 20, 515-518.
- Weissinger, J (1992). Clinical pathology testing in preclinical safety assessment: regulatory concerns. *Toxicol. Pathol.*, 20, 509-514.
- Kunec-Vajic, E., Pivac, K. y Muacevic-Katanec, D (1991). Enhancement of pseudocholinesterase activity by acetylsalicylic acid in the rat: further evidence for similarities in the mechanism of action of acetylsalicylic acid and certain hipolipidaemic drugs. *Med. Sci. Res.*, 19, 235-240.
- Okulov, D (1991). *Bioquímica en Gastroenterología*. Editorial Pueblo y Educación. Cuba, pp 17.
- Khattab, Ahmed D (1994). An ELISA for avian serum butyrylcholinesterase: a biomarker for organophosphates. *Environ. Tox. and Chem.*, 13 (10), 1661-1667.
- Badr, M Z (1994). Controversial role of intracellular iron in the mechanisms of chemically-induced hepatotoxicity. *J. Biochem Toxicol.*, 9 (1), 25-29.

Los números de Acta Toxicológica Argentina se pueden consultar en los archivos de la Biblioteca Nacional.

LESIONES LOCALES Y SISTEMICAS INDUCIDAS POR VENENO DE *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) DE ARGENTINA

Teibler, Pamela; Acosta de Pérez, Ofelia; Maruñak, Silvana; Ruiz, Raquel; Koscinczuk, Patricia; Sánchez Negrette, Marcial; Mussart de Coppo, Norma.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste-UNNE, Sgto. Cabral 2139 (3400) Corrientes.
Tel/fax 0783-25753. E-mail: Patmed@vet.unne.edu.ar

RESUMEN: Teibler P.; Acosta de Pérez O.; Maruñak S.; Ruiz R.; Koscinczuk P.; Sánchez Negrette M.; Mussart de Coppo N. **Lesiones locales y sistémicas inducidas por veneno de *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) de Argentina.** *Acta Toxicológica Argentina.* (1999) 7 (1): 7-10. Se inocularon ratas de 220 ± 20 g de peso, en grupos de 5 animales, con 800 µg de veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina desecado y homogeneizado, diluido en 0,1 ml de solución salina, por vía intramuscular. Para la obtención de sangre y su posterior sacrificio, se anestesiaron a las 3, 9 y 24 horas, tomándose muestras del músculo inoculado, hígado y riñón. Se realizaron determinaciones enzimáticas y los tejidos se procesaron para histopatología.

A las 3 horas, se observaron necrosis de fibras musculares confirmadas por métodos histoquímicos, hemorragia e infiltrado inflamatorio, los que se intensificaron a las 9 y 24 horas. Paralelamente se observó un incremento plasmático de las actividades enzimáticas de creatin fosfoquinasa (CPK), aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT); siendo máximo el aumento de CPK entre las 3 y 9 horas.

La respuesta inflamatoria estudiada en ratón, mostró una reacción rápida cuya recuperación fue lenta. La necrosis de fibras musculares fue acompañada por peroxidación de lípidos y precipitación de calcio en las células.

Las lesiones de tejido hepático no fueron relevantes y en riñón se detectaron alteraciones en zona yuxtamedular y en el intersticio cortical.

PALABRAS CLAVES: *Bothrops alternatus*, edema, mionecrosis, hemorragia.

SUMMARY: Teibler P.; Acosta de Pérez O.; Maruñak S.; Ruiz R.; Koscinczuk P.; Sánchez Negrette M.; Mussart de Coppo N. **Local and systemic lesions induced by *Bothrops alternatus* venom (víbora de la cruz) of Argentine.** *Acta Toxicológica Argentina.* (1999) 7 (1): 7-10. Rats (220 ± 20 g body weight) were injected with 800 µg desiccated and homogenized *Bothrops alternatus* of Argentina venom diluted in 0,1 ml of saline solution, by intramuscular route (5 animals. Per group). Rats were anesthetized at 3, 9 and 24 hours to obtain blood samples. Then, they were sacrificed and injected. Muscle, liver and kidney samples were taken for histopathology.

Three hours after venom injection, muscular fibers necrosis was confirmed by histochemistry. In addition, hemorrhage and inflammatory infiltrate, were observed. They were increased at 9 and 24 hours after injection. At the same time, plasmatic activities of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and creatine kinase (CPK) were enhanced. Maximum level for CPK was found between 3 and 9 hours after injection.

Inflammatory response, studied in nice, mouse showed a rapid reaction with slow recovery. Muscular fibers necrosis was accompanied by lipid peroxidation and calcium precipitation in cells.

Liver injury was not relevant but kidney showed alterations in the yuxtamedullar area and in the cortex interstice.

KEY WORDS: *Bothrops alternatus*, edema, myonecrosis, hemorrhage.

INTRODUCCIÓN

En Argentina hay varios géneros de ofidios venenosos. Entre ellos *Bothrops* (yará) es el responsable de la mayor parte de los accidentes ofídicos. Dentro de este género los más frecuentes son aquellos causados por *Bothrops neuwiedii* diporus, siguiendo en orden de importancia *Bothrops alternatus*, la víbora de la cruz o yará grande⁽¹⁾.

En el sitio de inoculación del veneno se produce un daño inmediato tisular con mionecrosis, hemorragia y edema. La mionecrosis es causada por acción directa del veneno, por alterar la permeabilidad de membrana celular y por la isquemia que resulta de las drásticas alteraciones de la microvasculatura y las arterias intramusculares^(2,3). La hemorragia local es producida por la acción de metaloproteinasas que actúan directamente sobre los vasos sanguíneos capilares induciendo a extravasación⁽⁴⁾. El edema local es un hecho típico y se debe a la acción directa de los componentes del veneno sobre la microvasculatura, incrementando la permeabilidad de capilares y vénulas⁽⁴⁾. También intervienen mediadores endógenos liberados por estímulos del veneno tales como histaminas, prostaglandinas, kininas y las anafilotoxinas C3a C5a del sistema del complemento⁽⁵⁾.

En el accidente botrópico se pueden presentar alteraciones cardiovasculares, especialmente hemorragia y shock hipovolémico⁽⁶⁾, desórdenes de la coagulación, más frecuentemente desfibrinación⁽⁷⁾ y alteraciones renales que pueden conducir a una falla renal aguda^(6,8).

Por los intensos efectos locales causados por el veneno de serpientes del género *Bothrops* es necesario caracterizar a los componentes del mismo y estudiar su mecanismo de acción, ya que el tratamiento específico con los antivenenos no

es eficiente para atenuar la reacción inflamatoria⁽⁹⁻¹¹⁾. De allí la importancia de conocer la evolución de la respuesta inflamatoria, las posibles causas de la misma y la acción del veneno sobre órganos vitales como el hígado y el riñón.

MATERIAL Y METODOS

Se obtuvo veneno crudo procedente de ejemplares de *Bothrops alternatus* del serpentario de la ciudad de Corrientes, Argentina, desecado y conservado a -20° C. Previo a su uso, el veneno se disolvió en solución salina amortiguada a pH 7,2 (PBS). La concentración final fue de 800 µg de veneno en 0,1 ml.

Se inocularon ratas de la cepa Wistar de 200 ± 20 g de peso en el músculo gastrocnemio derecho en tres grupos de 5 animales cada uno. Sus respectivos controles se inocularon con 0,1 ml de PBS. Los animales se anestesiaron a las 3, 9 y 24 horas posteriores a la inyección del veneno, para extraer sangre de la vena cava posterior y el músculo inoculado. Las muestras de hígado y riñón se obtuvieron a las 9 y 24 horas. El material fue fijado en Bouin y procesado por las técnicas histológicas clásicas y coloreado con hematoxilina-eosina. En otro grupo de animales, utilizando el diseño antes señalado, se obtuvieron muestras del músculo gastrocnemio a las 24 horas de inoculado para efectuar técnicas histoquímicas para detección de peroxidación de lípidos y precipitación de calcio. En este caso las muestras fueron congeladas a -80°C y la peroxidación de lípidos fue valorada por la reacción de Schiff-aldehídos⁽¹²⁾ y la detección de calcio con el método de rojo de alizarina⁽¹³⁾. Con el suero se efectuaron las siguientes determinaciones enzimáticas: aspartato aminotransferasa (AST); alanina aminotransferasa (ALT), método de Reitman y Frankel

(Boehringer Mannheim, Argentina) y Creatin fosfoquinasa (CPK) que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la creatina a pH 9, para formar creatinmonofosfato. El fósforo liberado por hidrólisis, proporcional a la actividad de la enzima, se determinó mediante la reacción colorimétrica (con kits "Fosfatemia W"- Wiener lab).

Para el estudio de la reacción inflamatoria se inocularon ratones de la cepa CF1 en la almohadilla plantar, con 50 µg de veneno en 0.05 ml de PBS, el miembro opuesto fue inoculado con igual volumen de PBS. Se conformaron grupos de 5 animales para los siguientes tiempos de exposición al veneno: 30 y 60 minutos, 3 y 2 horas, 2 a 9 días. En estos tiempos los animales fueron sacrificados con éter para extraer los miembros posteriores. Para controlar el peso del miembro inoculado con veneno respecto al opuesto, fueron pesados en balanza analítica y los resultados fueron expresados como porcentaje.

RESULTADOS

Determinaciones enzimáticas: se observó elevación enzimática de ALT, con valores máximos a las 24 horas de la inoculación del veneno de *Bothrops alternatus*. La tasa sérica en los animales controles fue de 8 ± 1.2 mU/ml. En los inoculados se detectaron valores medios de 9.2 ± 5 mU/ml, a las 3 horas; 18.6 ± 1.9 mU/ml a las 9 horas y 19 ± 3.3 mU/ml a las 24 horas. El análisis de la varianza arrojó un valor de $P < 0.0001$ (Figura 1).

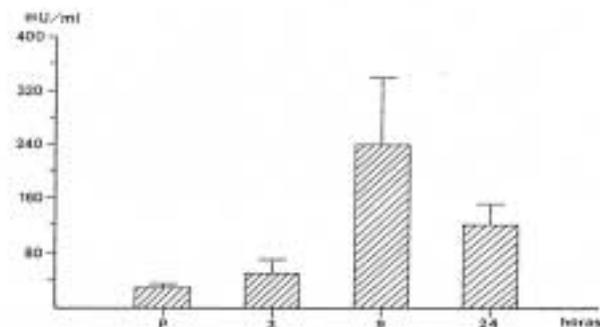


Figura 1: Variaciones en la determinación de ALT en ratas inoculadas por vía intramuscular con 800 µg/200 g de veneno de *Bothrops alternatus* vehiculizado en 0.1 ml de PBS.

También se observó elevación en la tasa sérica de AST, cuyo pico máximo se presentó a las 9 horas. En los controles se obtuvieron valores de 32 ± 10 mU/ml, mientras que en los inoculados las tasas fueron de 65 ± 16 mU/ml a las 3 horas, 270

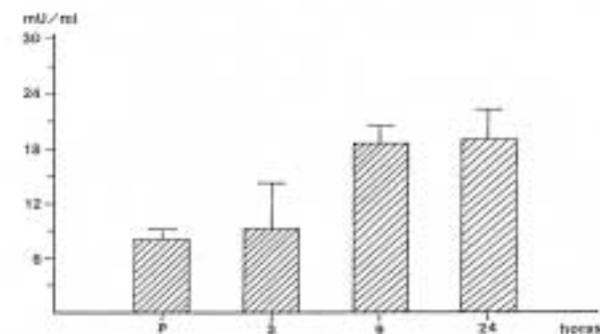


Figura 2: Variaciones en la determinación de AST en ratas inoculadas por vía intramuscular con 800 µg/200 g de veneno de *Bothrops alternatus* vehiculizado en 0.1 ml de PBS.

± 95 mU/ml a las 9 horas y 135 ± 24 mU/ml a las 24 horas. El incremento de esta enzima fue considerable con una significación de $P < 0.0001$ (Figura 2).

La creatinfosfoquinasa también se modificó, el mayor aumento se presentó entre las 3 y las 9 horas posteriores a la inoculación.

Los animales controles presentaron un valor medio de 165 ± 30 mU/ml y los inoculados 1416 ± 248 mU/ml a las 3 horas, 1276 ± 407 mU/ml a las 9 horas y 182 ± 52 mU/ml a las 24 horas con una significación de $P < 0.0001$ (Figura 3).

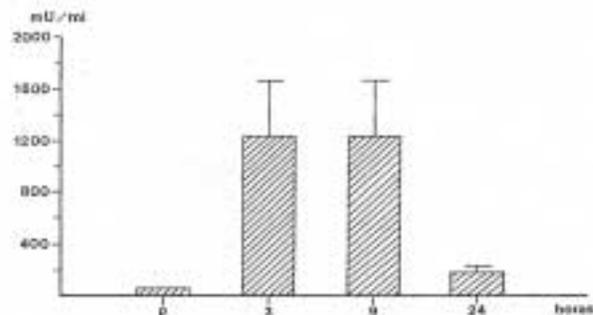


Figura 3: Variaciones en la determinación de CPK en ratas inoculadas por vía intramuscular con 800 µg/200 g de veneno de *Bothrops alternatus* vehiculizado en 0.1 ml de PBS.

Análisis histológico: a las 3 horas de exposición al veneno la histopatología evidenció hemorragia y necrosis muscular de tipo miolítica y coagulativa, acompañada de edema e infiltrado inflamatorio intersticial. En los animales expuestos durante 9 horas, el edema y la hemorragia interfibrilar fueron mayores, al igual que la necrosis de fibras musculares. A las 24 horas, la hemorragia disminuyó, coincidiendo con un aumento de pigmentos de hemosiderina y el infiltrado leucocitario compuesto principalmente por polimorfonucleares neutrófilos, en tanto que las áreas de necrosis musculares fueron mayores (Figura 4). En este tiempo, la técnica histoquímica para la de-

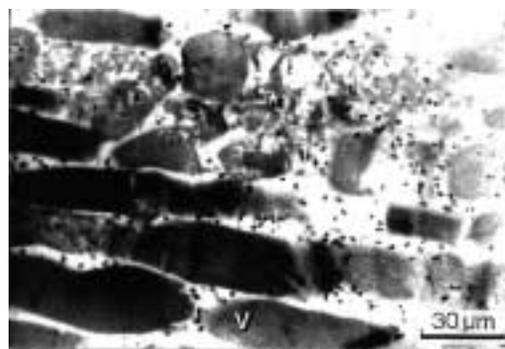


Figura 4: Corte histológico de músculo gastrocnemio de rata inoculada con veneno de *Bothrops alternatus* (800 µg/0.1 ml de PBS), 9 horas de exposición. Se observa intenso edema y hemorragia interfibrilar, fibras musculares con necrosis miolítica (*) y necrosis coagulativa (V). (Hematoxilina-Eosina).

tección de Ca^{2+} en el citoplasma de las fibras musculares dio reacción positiva (Figura 5). La reacción histoquímica de Schiff que revela peroxidación de lípidos y consecuente necrosis de fibras se observa en la Figura 6.

A las 9 horas de exposición al veneno en el tejido hepático se observó degeneración hidrópica difusa, comprometiendo distintas áreas del lobulillo, incluyendo zonas periportales, mediozonales y centrolobulillares. En los hepatocitos se ob-

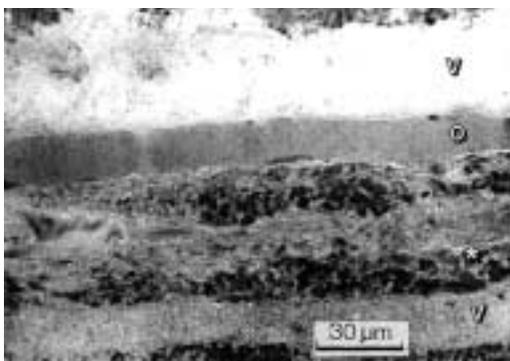


Figura 5: Corte histológico de músculo gastrocnemio de rata inoculada con 800 µg de veneno de *Bothrops alternatus*, 0.1 ml de PBS, 24 horas de exposición. Se observan fibras musculares necróticas irregulares con aspecto grumoso, con alto contenido en calcio (*). También se observa una fibra muscular normal (O) y edema en el intersticio (V). (Histoquímica con rojo de alizarina).

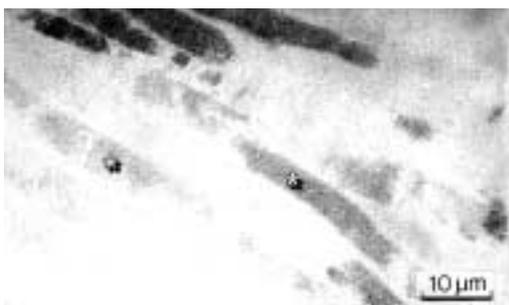


Figura 6: Corte histológico de músculo gastrocnemio de rata inoculada con 800 µg de veneno de *Bothrops alternatus* en 0.1 ml de PBS, 24 horas de exposición. Se observan fibras musculares necróticas (*) detectadas con el reactivo de Schiff.

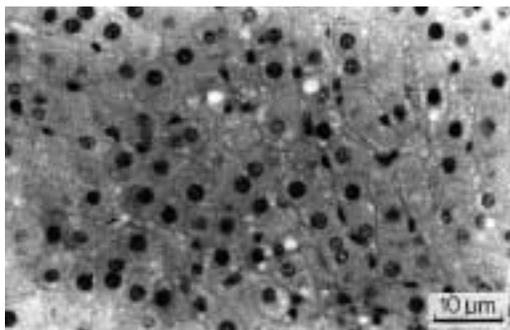


Figura 7: Corte histológico de hígado de rata inoculada con veneno de *Bothrops alternatus* (800 µg/ 0.1 ml de PBS), 9 horas de exposición. Se observa degeneración hidrópica difusa en todo el lobulillo. (Hematoxilina-Eosina).

servó degeneración hidrópica y colestasis en canaliculos biliares (Figura 7). A las 24 horas la degeneración hidrópica fue de mayor intensidad, observándose menor grado de colestasis canalicular.

En esos mismos animales, en los riñones, a las 9 horas se observó congestión de vasos sanguíneos de la zona yuxtamedular y en el intersticio cortical. En dicha zona cortical se observaron cilindros hialinos y gránulos de hemosiderina, en túbulo contorneado distales y colectores (Figura 8). Tanto en el glomérulo como en los túbulo e intersticio se observaron abundantes gránulos de hemosiderina. A las 24 horas las lesiones anteriormente señaladas estaban ligeramente atenuadas.

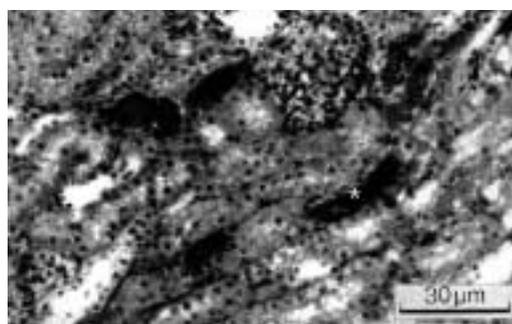


Figura 8: Corte histológico de riñón de rata inoculada con veneno de *Bothrops alternatus* (800 µg/ 0.1 ml de PBS), 9 horas de exposición. Se observan cilindros hialinos en túbulo contorneado distales (*) y colectores (Hematoxilina-Eosina).

La inyección subcutánea del veneno en la almohadilla plantar de ratón indujo a un edema que en 30 minutos causó un incremento de peso del miembro de más del 70%, a las 3 horas se observó el pico máximo con valores que superaron el 80% para luego decrecer paulatinamente, hasta el día 9, en que aún perduraba un 12% de incremento de dicho peso (Figura 9).

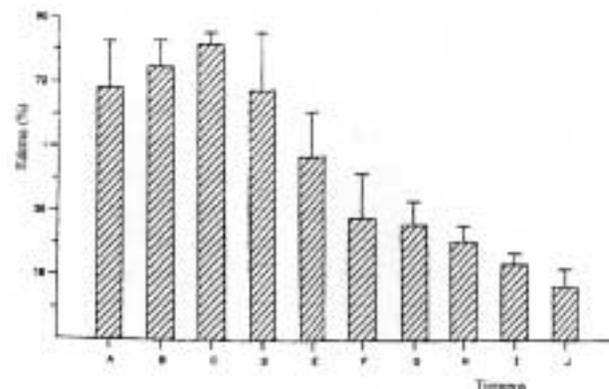


Figura 9: Curva de edema inducida por 50 µg veneno de *Bothrops alternatus* en 0,05 ml de PBS inoculado por vía subcutánea en almohadilla plantar de ratón.

DISCUSIÓN

El veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina causó lesiones locales en ratas, caracterizadas por mionecrosis, hemorragia y edema. Los resultados son coincidentes con los observados con venenos de ofidios del género *Bothrops* de otros países (10,14,15).

A las 3 horas de exposición al veneno, la histopatología del músculo gastrocnemio evidenció hemorragia, necrosis muscular del tipo miolítica y coagulativa, acompañada de edema e infiltrado inflamatorio. Estos resultados son semejantes a aquellos obtenidos en trabajos previos realizados con el mismo veneno en ratones (16), en caninos (17) y también con aquellos trabajos efectuados en Brasil con ejemplares de *Bothrops alternatus* (15).

Si bien la identificación de miotoxinas en los venenos hacen presumir la presencia de mionecrosis, esta situación fue demostrada por histopatología para varias especies de *Bothrops* de Centro América (14). Las primeras alteraciones morfológicas inducidas por miotoxinas ocurren a los 15 minutos de la inyección (16).

Diferentes estudios demuestran que las miotoxinas de *Bothrops* afectan la bicapa lipídica de la membrana celular cargada negativamente, sugiriendo compromiso de aminoácidos básicos. En este trabajo, las técnicas histoquímicas realizadas con cortes histológicos del músculo gastrocnemio de ratas inocu-

ladas con veneno, dieron positivo la peroxidación de lípidos, confirmando la acción del veneno sobre fosfolípidos de membrana. La técnica de coloración con rojo de alizarina confirmó la precipitación de abundante cantidad del catión calcio en las fibras musculares afectadas.

Hasta la fecha no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de las miotoxinas. Se sugiere que se unen a un sitio posible de una proteína de la membrana plasmática que la desestabiliza, alterando la regulación de la permeabilidad de iones y macromoléculas con gran afluencia de calcio induciendo alteraciones citoesqueléticas, daño mitocondrial y activación de proteasa calcio dependiente⁽¹⁸⁾.

La enzima ALT es considerada específica de daño hepático (19) también aumenta en respuesta a daño muscular severo (20) como se observa en este trabajo, con incremento simultáneo de AST y CPK. La particularidad observada consiste en que CPK y AST manifiesta su pico máximo entre las 3 y 9 horas, semejante a lo que ocurre con veneno de *Bothrops asper*⁽¹⁴⁾. En cambio ALT muestra una elevación menor y más tardía. La respuesta inflamatoria valorada por incremento del peso mostró su pico máximo a las tres horas. Para el veneno de *Bothrops asper* el pico máximo, para igual dosis de veneno, ocurre en una hora⁽²¹⁻²²⁾, sugiriendo que este último veneno tiene mayor actividad edematizante que el utilizado en este trabajo.

La experiencia realizada demuestra que la reacción inflamatoria es casi inmediata. En treinta minutos el edema es considerable, sugiriendo la rápida acción de las enzimas que lesionan los tejidos. Esto explicaría la poca eficiencia del suero antiofidico para neutralizar estos efectos, como ha sido demostrado en ratones⁽²³⁻²⁴⁾ y en humanos⁽²⁵⁾. Por otro lado la recuperación del daño es lenta e implica la restitución, sustitución de tejidos y absorción de los fluidos propios del proceso inflamatorio; en el día 9 posterior a la inoculación, el edema del miembro continúa siendo importante.

Respecto a los efectos sistémicos, la acción del veneno sobre tejido hepático provocó lesiones leves y reversibles. Alteraciones semejantes fueron observadas en ratones intoxicados con el mismo veneno⁽¹⁷⁾. En accidentes causados por *Crotalus durissus terrificus* (cascabel) en humanos se detectaron lesiones hepáticas relevantes; en tanto que en los accidentes por *Bothrops* las anomalías fueron semejantes a las obtenidas en este trabajo⁽²⁵⁾.

Las lesiones del tejido renal caracterizadas por congestión general, presencia de cilindros hialinos en túbulos corticales y abundante acúmulo de hemosiderina en glomerulos, túbulos e intersticio sugieren compromiso de este órgano en dicho envenenamiento. En humanos, los accidentes de serpientes del género *Bothrops* pueden causar alteraciones tempranas de corteza y médula renal⁽²⁶⁾. En algunos casos se produce insuficiencia renal por deficiencia en la perfusión sanguínea y posiblemente por acción directa del veneno sobre el órgano⁽²⁷⁾.

Se concluye que el veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina induce en el sitio de inoculación a una intensa reacción inflamatoria de evolución rápida y lenta recuperación; que la necrosis de fibras musculares es causada por peroxidación de lípidos y precipitación de calcio en el citoplasma de las fibras y que los efectos sobre tejido hepático son leves, en tanto que las lesiones renales podrían generar secuelas funcionales.

AGRADECIMIENTOS: Agradecemos especialmente al Dr. Castro, J.A. y a la Dra. Ferreyra, E. por habernos permitido la realización de las pruebas histoquímicas y a la Lic. Laura Rey por habernos facilitado los venenos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Esteso, S.C. (1985). Ofidismo en la República Argentina. ARPON, Córdoba 59-68 pp.
- Gutiérrez, J.M.; Ownby, C.L. and G.V. Odell (1984). Isolation of myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 22, 115-128.
- Queiroz, L.S.; Santo-Neto, H.; Assakura, M.T.; Reichl, A.P. and F.F. Mandelbaum (1985). Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 23, 341-345.
- Ohsaka, A. (1991). Hemorrhagic, necrotizing and edema forming effects of snake venoms. In Lee. C.Y. Springer-Verlag. Berlin 480-546 pp.
- Vogt, W. (1990). Snake venom constituents effecting the complement system. In: Medical use of snake venom proteins. Stocker, K., ed. Boca Raton, CRC, Press. 79-96 pp.
- Bolaños, R. (1982). Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica. San José Editorial Universidad de Costa Rica, 136p.
- Amaral, C.F.S.; Dourado, H.V.; Kouyoumdjian, J.A.; Cardozo, J.I.; Campos, J.A.; Azevedo-Marques, M. and P.F.A. Lopes (1987). Manual de Diagnóstico e Tratamento de accidentes ofídicos. Brasília, Centro de Documentação do Ministério do Saude, 53 pp.
- Amaral, C.F.S.; Da Silva, O.A.; Godoy, P. and D. Miranda (1985). Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. *Toxicon* 23, 877-885 pp.
- Lomonte, B. (1985). Edema forming activity of bushmaster (*Lachesis muta stenophrys*) and Central America rattlesnake (*Crotalus durissus durissus*) venoms and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 23, 173-176 pp.
- Gutiérrez, J.M.; Rojas, G.; Lomonte, B.; Gené, J.A. and L. Cerdas (1986). Comparative study of the edema-forming activity of Costa Rican snake venoms and its neutralization by a polyvalent antivenom. *Comp. Biochem. Physiol.* 85, 171-175 pp.
- Rojas, G.; Gutierrez, J.M.; Gene, J.A.; Gomez, M. and L. Cerdas (1987). Neutralización de las actividades tóxicas y enzimáticas de cuatro venenos de serpientes de Guatemala y Honduras por el antiveneno polivalente producido en Costa Rica *Rev. Biol. Trop.* 35, 59-67 pp.
- Taper, H.S.; Somer, M.P.; Lans, M.; Gerpache, J. and M. Roberfroid (1988). Histochemical detection of the in vivo produced cellular aldehydes by means of direct Schiff's reaction in CCl4 intoxicated. *Arch. Tox.* 61, 406-410.
- Mc Gree Russell, S.M. (1958). Histochemical methods for calcium. *J. Histochem. Cytochem* 6, 22-42 pp.
- Gutiérrez, J.M.; Arroyos, O. and R. Bolaños (1980). Mionecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon* 18, 603-610 pp.
- Queiroz, L.S. and C.A. Petta (1984). Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. *Rev. Med. Trop. Sao Paulo* 26 (5), 247-253.
- Acosta de Pérez, O.; P. Koscinczuk; M. Sánchez Negrette; P. Teibler y R. Ruiz (1996). Efecto del veneno de *Bothrops alternatus* de Argentina sobre músculo y distintos órganos en ratones. *APPTLA* 46 (2), 97-102.
- Acosta de Pérez, O.; P. Koscinczuk; Flinta, S.; Maidana, H. y M. Sánchez Negrette (1997). *Bothrops alternatus* envenoming in young dogs. *Brazil J. Venom Anim. Toxins* 3 (1), 43-47.
- Gutiérrez, J.M. and B. Lomonte (1995). Phospholipase A2 myotoxin from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon* 33, 1405-1424.
- Sherlock, S.: *Drugs and Liver*. In: Sherlock, S. (1985). *Diseases of the liver and biliary system*. 7 ed London, Blackwell, 304-333 pp.
- Meyer, D.J.; Coles, E.H. and L.S. Rich (1992). *Veterinary laboratory medicine interpretation and diagnosis* (W. B. Saunders Company), 55-60 pp.
- Chaves, F.; Barboza, M. and J.M. Gutiérrez (1995). Pharmacological study of edema induce by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon* 33, 31-39.
- Lomonte, B.; Tarkowski, A. and L.A. Hanso (1993). Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 17, 93-105.
- Minton, S. (1954). Polyvalent antivenom in the treatment of experimental snake venom poisoning. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 3, 1077.
- Homma, M. and A. T. Tu (1970). Antivenin for treatment of local tissue damage due to envenomation by southeast Asian snake. Ineffectiveness in the prevention of local tissue damage in mice after envenomation. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 19, 880-884.
- Mc Collough, N.C. and J.F. Gennaro (1970). Treatment of venomous snake in the Unit State C.Kin. *J. Trop. Med.* 3, 1077.
- Costa Cardozo, J.L. (1990). *Bothropic accidents*. *Mem. Inst. Butantan* 52 (spl.), 43-44.
- Hudleson, S. and P. Hudleson (1995). Pathophysiology of snake envenomization and evaluation of treatment. Part I Continuing Education Article 17, 889-895.
- Barraviera, B.; Coelho, K.Y.R.; Curi, P.R. and O.A. Meira (1995). Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1968) snake in Botucatu (State of Sao Paulo, Brasil). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 37 (1), 67-69.

RABDOMIOLISIS AGUDA POR EXPOSICION PERCUTANEA A UN HERBICIDA EN DOS PACIENTES ATENDIDOS EN ROSARIO, ARGENTINA.

Piola, Juan Carlos; Prada, Dora Beatriz; Ezpeleta, Daniel Carlos.

Servicio de Toxicología del Sanatorio de Niños, Rosario. Alvear 858. PB "A" (2000). Rosario. Argentina.
Tel.: 0341-4480202-4265608 Fax: 0341-4397041. e-mail: sertox@arnet.com.ar

RESUMEN: Piola, J. C.; Prada, D. B.; Ezpeleta, D. C. **Rabdomiólisis aguda por exposición percutánea a un herbicida en dos pacientes atendidos en Rosario, Argentina.** *Acta Toxicológica Argentina.* (1999) 7 (1): 11-15. Los herbicidas del tipo del dicamba son usados para control de malezas de hojas anchas. Este y los del tipo fenoxiacético son formulados como ésteres o sales, conteniendo a veces hasta 50% de ingrediente activo. Se han reportado para éstos debilidad muscular y neuropatía periférica luego de exposición ocupacional. Se considera que el dicamba tiene baja toxicidad aguda en el hombre. El objeto de esta presentación es mostrar dos cuadros clínicos severos provocados por la exposición accidental percutánea a un herbicida que lo contenía, en dos pacientes atendidos en el Hospital de Emergencias Clemente Alvarez (HECA) de Rosario, en 1993. Ambos pacientes, de 18 y 20 años desarrollaron cuadros clínicos similares, mialgias intensas y generalizadas, sudoración profusa y gran decaimiento. Presentaron cifras muy elevadas de transaminasas y CPK, por lo que se caracterizó al cuadro como rabdomiólisis. Requirieron internación en UTI. Un paciente hizo insuficiencia renal aguda que requirió diálisis renal. Evolucionaron lentamente. Durante su internación refirieron haber atravesado un campo recientemente fumigado con MISIL, en Zavalla, Provincia de Santa Fé, mojándose las ropas y no habiéndose lavado ni en ese momento ni en días posteriores. Las muestras tomadas al ingreso fueron procesadas en dos sistemas cromatográficos: HPLC y cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica. Se usó como patrón un producto comercial por no disponer de standard puro. Ambos cromatogramas muestran pico compatible con dicamba. Posteriormente estos estudios fueron confirmados por GC-EM. Discutimos dificultades diagnósticas, características toxicocinéticas y compatibilidad del cuadro con dicha exposición, resaltando estos hallazgos por la escasa información sobre cuadros similares.

PALABRAS CLAVES: rabdomiólisis-percutánea-dicamba- Met sulfuron metil.

ABSTRACT: Piola, J. C.; Prada, D. B.; Ezpeleta, D. C. **Rhabdomyolysis after acute skin exposure to a herbicide. Report of two clinical cases.** *Acta Toxicológica Argentina.* (1999) 7 (1): 11-15. Herbicides like dicamba are used to control broad-leaved weeds. This and others of the fenoxiacetic family are formulated as esters or salts, sometimes containing up to 50% active ingredient. Muscle weakness and peripheral neuropathy have been reported after occupational exposure to the fenoxiacetic herbicides. Dicamba is supposed to have low level acute toxicity in man. We present the observations of two patients admitted to the emergency room of Hospital de Emergencias Clemente Alvarez, Rosario, Argentina, in September 1993. Both patients (18 and 20 year old males) who lived in a rural area of Zavalla, Santa Fe, explained they had crossed a wheat field fumigated with MISIL, fifteen days ago. They got their skin and clothes wet and did not wash themselves then nor in the next few days. They presented similar symptoms: severe muscle spasms, profuse diaphoresis and weakness. Levels of creatine phosphokinase and other muscle enzymes, like lactic dehydrogenase and glutamic and piruvic oxaloacetic transaminase were all significantly raised indicating rhabdomyolysis. One patient had oliguric acute renal failure and he was treated with hemodialysis. Both of them made small progress in evolution (30 and 40 days). Twenty four hours urine sample were taken at the hospital admission and processed by capillary column gas chromatography with electron-capture detection and high-performance liquid chromatography with UV-diode array detection. Dicamba identity in samples was confirmed by gas chromatography-mass spectrometry. We discuss diagnostic difficulties, review of pharmacokinetics of chlorinated phenoxy acid herbicides and the association between rhabdomyolysis and dicamba exposition. Limited data about similar cases are available.

KEY WORDS: rhabdomyolysis- skin exposure-dicamba- Met sulfuron methyl

INTRODUCCIÓN

El herbicida dicamba (ácido 3,6-dicloro-2-metoxi benzoico), es usado frecuentemente para control de malezas de hojas anchas anuales y perennes, especialmente a lo largo de carreteras⁽¹⁾. En EEUU el dicamba es considerado como una alternativa viable para la mayoría de los usos de los herbicidas silvex y 2,4,5-T, suspendidos en ese país, en terrenos, pasturas y márgenes de zanjas y en el control de malezas en pasturas⁽²⁾. Estos compuestos actúan como hormonas de crecimiento en plantas⁽³⁾. Son formulados como ésteres o sales, conteniendo a veces hasta 50% de ingrediente activo. Se considera que el dicamba tiene baja toxicidad aguda en el hombre. Se han reportado debilidad muscular y neuropatía periférica luego de exposición ocupacional al mismo.⁽⁴⁾

El objeto de esta presentación es mostrar dos cuadros clínicos severos provocados por la exposición percutánea accidental al dicamba en dos pobladores rurales jóvenes atendidos en el Hospital de Emergencias Dr. Clemente Alvarez (HECA) de Rosario, en setiembre de 1993. (Se comenta también un tercer paciente expuesto en el mismo episodio y que falleció súbitamente).

MATERIAL Y MÉTODO

El material lo constituyeron los 3 pacientes atendidos en el HECA, en 1993, que denominamos A1, A2 y A3. El método es el análisis de las historias clínicas, resaltando los datos relevantes en orden cronológico. En el caso de A1 y A2 las muestras tomadas al ingreso se procesaron en dos sistemas cromatográficos: a) HPLC con sistema de bomba cuaternaria con detector UV de arreglo de diodos y b) Cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones (GC-EC). Posteriormente las muestras se analizaron por GC/EM.⁽⁵⁻⁸⁾

RESULTADOS.

Dada su similitud, los cuadros clínicos se muestran en conjunto. En el momento de la primera consulta (26/09/93, día -4) los pacientes A1, A2 y A3 (18, 20 y 16 años, respectivamente) y vivían en una zona rural de Zavalla, provincia de Santa Fe. A2 y A3 eran hermanos.

Para simplificar la secuencia de hechos consideramos día uno (1) el 30/09/93.

El día -4 A3 consultó en guardia por presentar un cuadro de malestar generalizado, calambres en zona abdominal, temblores, vómitos, confusión y comportamiento agitado (con aparentes movimientos estereotipados). Permaneció en observación. Las pruebas de laboratorio mostraron 4900 glóbulos blancos, hematocrito 42%, sodio plasmático 133 mEq/L, potasio 5.1 mEq/L, glucemia 56 mg/dL, uremia 49 mg/dL, creatinemia 0.71mg/dL, colinesterasa sérica 10.000 mUI/ml y dosaje de carboxihemoglobina 0%. Los pacientes A1 y A2 presentaron cuadros similares aunque más leves y sin trastornos en el comportamiento, que cedieron espontáneamente, por lo que no consultaron). Los pacientes atribuyeron su sintomatología a que unos días antes de las molestias referidas habían ingerido agua de pozo en una zona rural de Zavalla.

Día 1. La evolución clínica espontánea de A3 aparentó ser favorable pero falleció súbitamente. Por considerarse muerte dudosa fue remitido para autopsia.

Día 2. Los pacientes A1 y A2 se internaron para observación, asintomáticos. (motivo de internación: la muerte de A3). Fueron evaluados en conjunto, con servicio de clínica médica. Se tomaron muestras de orina de 24 horas para futuras determinaciones. Los resultados de laboratorio (hematocrito, recuento de globulos blancos, glucemia, uremia, eritrosedimentación, transaminasas y orina completa) estuvieron dentro de los límites normales.

Día 3. Permanecieron con buen estado general y con las determinaciones de laboratorio de rutina sin modificar por lo que se decidió el alta.

Día 4. Se internó A2, nuevamente.

Día 6. Se internó A1, nuevamente. Ambos pacientes presentaron cuadros clínicos similares cuyas principales manifestaciones fueron mialgias intensas y generalizadas, gran decaimiento, irritación ocular, diaforesis profusa, fiebre y orinas oscuras. Los resultados de los análisis bioquímicos se muestran en las tablas I y II. Se caracterizó al cuadro como rabdomiólisis. Infectología realizó estudios para descartar leptospirosis y triquinosis. Se hicieron análisis toxicológicos en una muestra del agua de pozo que referían haber bebido (dosaje de plaguicidas fosforados, clorados, paraquat y talio, no detectables, arsénico <10 ug/l) así como también en sangre (A1:HCH 12 ppb; heptacloro; Parathion; paraquat, no detectable; A2: resultados para los mismos análisis no detectable) y orina (arsénico; A1:19 ug/24 horas y A2: 23 ug/24 horas).

Día 9. Debido al agravamiento de su estado general pasaron a UTI.

Día 10. Luego de exhaustivos interrogatorios por parte de los numerosos médicos que participaron en su atención, A1 refirió haber atravesado, junto a A2 y A3, un campo de trigo recientemente fumigado, habiéndose mojado la piel expuesta y la ropa (pantalón, medias y zapatillas). No se lavaron en ese momento ni en los inmediatos posteriores. El producto usado en la fumigación del campo fue identificado más tarde como MISIL, (nombre re-

gistrado cuya composición es: parte líquida, DICAMBA, sal dimetilamina del ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico; sal dimetilamina de ácidos relacionados y parte sólida, MET SULFURON METIL (metil 2-[[[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il)-amino]carbonil]-amino]-sulfonil]benzoato), preparado para formulación líquida al 48%, con alquil aril poliglicol eter 50gr y agentes solubilizantes c.s.p.). A1 identificó el olor de un envase de MISIL que se le acercó en ese momento como similar al olor del campo fumigado. No pudieron precisar la fecha pero este episodio sucedió entre el día - 15 y -8. Se pidió procesar la muestra del día 0, en dos sistemas cromatográficos: a) HPLC con sistema de bomba cuaternaria con detector de arreglo de diodos y b) Cromatografía gaseosa con detector EC, comparado con porción líquida -dicamba- del preparado comercial) resultando cromatogramas positivos para dicamba. También se procesó el agua de pozo para investigar dicamba, resultando no detectable.

Día 15. A1 hace cuadro de insuficiencia renal aguda lo que determinó su tratamiento con hemodiálisis. Ambos pacientes tuvieron una lenta evolución.

Día 30. Sé externó A2.

Día 40. Sé externó A1. Ambos presentaron a su egreso pérdida de masa muscular y debilidad generalizada.

Día 45. Se controló por consultorio externo al paciente A2, mostrando mejoría clínica y bioquímica aunque sin recuperación completa de su función muscular (aún no podía trabajar).

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En este trabajo se presentan 2 casos clínicos atendidos en el HECA, Rosario, Argentina, en setiembre de 1993, correspondiente a pacientes jóvenes residentes en el área rural de Zavalla, Santa Fe. Se incluye en la presentación un tercer paciente, hermano de uno de los anteriores. Los tres tuvieron una exposición dérmica importante al herbicida al atravesar un campo de trigo recientemente fumigado, mojándose la piel y ropa y no lavándose ni en ese momento ni en días ulteriores. Luego de un período de 7 días, aproximadamente, hicieron un cuadro de calambres musculares en la región abdominal. El tercer paciente mencionado (16 años) mostró además náuseas, vómitos, estado confusional y comportamiento agitado. El laboratorio de rutina en ese momento fue: potasio en sangre 5.1 mEq/L, glicemia 56 mg/dL, etc. (ver día 4) y evolucionó espontáneamente hasta que falleció en la guardia en forma súbita. Se derivó a autopsia y los resultados no mostraron alteraciones macroscópicas y los análisis de dicamba en sus vísceras resultaron negativos. A raíz de la muerte de ese paciente, se derivaron a la guardia los otros dos pacientes, sin desarrollar síntomas clínicos ni bioquímicos durante los 3 días que permanecieron en observación. A las 24 y 48 horas del alta, respectivamente, ingresaron nuevamente y presentaron cuadros clínicos similares cuyas principales manifestaciones fueron mialgias intensas y generalizadas (comienzan en miembros inferiores), gran decaimiento, irritación ocular, diaforesis profusa, fiebre y orinas oscuras. Dentro de

Tabla 1: Resultados de laboratorio paciente A1.

	Día 6	Día 8	Día 12	Día 13	Día 14	Día 18	Día 22	Día 35	Día 39
TGO UI/L	7.255	3.960		1.670	1.350	770		55	40
TGP UI/L		1.340				770		114	62
CPKUI/L	>5.000	22.000		37.000	33.500	9.280		3.700	217
Mioglobina ug/L				646				257	
LDH UI/L		4.300		3.700	3.400			308	234
Uremia mg/dL	79	39	263	334	343	122	99	61	47
Creatinina mg/dL	1,23	0,7	7,8	8,44	8,60	5,27	4,6	1,33	0,9
Na/K mEq/L	120/4		130/5	119/5,5			138/45		
Calcemia mg/dL				7,2				7,2	
Acido/base	7,41;	7,51; 19,4;		7,32					
(pH; pCO ₂ ;	29,7;	83,5;		28,7					
pO ₂)	83,5			91,3					
Orina y otros	Ver *				Ver**				

Valores Normales: TGO y TGP: 6-18 UI/L; Mioglobina: 10-50 ug/L; LDH: 10-240 UI/L; Uremia: 15-45 mg/dL; Creatininemia: 0,8-1,2 mg/dL; Na:135-145 mEq/L; K:3,5-4,5 mEq/L; Calcemia: 9-11 mg/dL; Acido/base: pH: 7,35-7,45; pCO₂ 32-45 mm/Hg; pO₂ 83-108 mm/Hg. *pH 5; Densidad 1030, coluria, proteínas (+++), Hb (++++), Acetona (++) , Hematíes (+), leucocitos (+), células (+). **Glicemia 51, colinesterasa sérica 3000 U

Tabla 2: Resultados de laboratorio, paciente A2.

	Día 4	Día 5	Día 8	Día 10	Día 12	Día 18	Día 29
TGO UI/L	1.880	2.550	8.900	6.462	3.400	620	38
TGP UI/L	247	456	1.920		6.700		42
CPK UI/L	38.000		10.600		4.200	1.860	224
Mioglobina ug/L					701	247	
LDH UI/L	1.300		5.600				
Uremia mg/dL	44	25	55	33	35	33	30
Creatinina mg/dL	0,98	0,72	1,09	0,60	0,60	0,60	0,56
Na/K mEq/L	130/4,2	148/7,5	131/4,2	130/4,6	128/3,3		
Calcemia mg/dL	9,4	9,6	3,6		8,7		
Acido/base(pH;pCO ₂ ; pO ₂)	7,42; 32; 85						
Orina	Ver *						

Valores normales: ver cuadro 1.

* pH 6; Densidad 1030, coluria, proteínas (+), Hb (+), Acetona (++) , Hematíes (++) , leucocitos (+)

las determinaciones bioquímicas (tablas 1 y 2) se encontraron valores muy aumentados de enzimas musculares (CPK, TGO, TGP, etc.) y de mioglobina lo que permitió caracterizar al cuadro como rabdomiólisis. Infectología realizó estudios para descartar leptospirosis y triquinosis. Se hicieron análisis toxicológicos en una muestra del agua de pozo que referían haber tomado y en sangre y orina. Debido al agravamiento de su estado general pasaron a UTI. Al conocer el antecedente de exposición al herbicida MISIL, se procesaron las muestras. Uno de los pacientes instaló una insuficiencia renal aguda que determinó su tratamiento con hemodiálisis. Evolucionaron lentamente con altas a los 30 y 40 días de su ingreso inicial con pérdida de masa muscular.

La rabdomiólisis, antes llamada mionecrosis o necrosis muscular, es un síndrome que ocurre por destrucción del músculo esquelético con liberación del contenido de las células musculares en el plasma. Se puede manifestar por mioglobinuria (orina roja o marrón). Numerosas y

variadas condiciones pueden jugar un rol en la génesis de la rabdomiólisis no traumática, por ejemplo desarrollo de intensa actividad muscular, isquemia, alteraciones genéticas y metabólicas, enfermedades inmunológicas, infecciones y causas tóxicas. La aparición simultánea de síntomas de rabdomiólisis en tres personas descartó alteraciones genéticas y metabólicas y en este caso los pacientes no habían desarrollado una actividad muscular intensa. Es decir, que las únicas causas probables de rabdomiólisis en estos pacientes, eran infecciosas o tóxicas. Para las causas infecciosas no había noción de foco y el cuadro clínico no era claramente compatible (ausencia de edema de párpados para triquinosis, ausencia de datos de laboratorio modificados para la leptospirosis, etc.), no obstante fueron atendidos por infectólogos que descartaron esa etiología. La referencia de los pacientes de haber ingerido agua de pozo orientaba hacia etiología tóxica, además de la aparición de un cuadro brusco y simultáneo en tres personas. El antecedente de agua de pozo incluía

que los pacientes habían encontrado allí numerosos envases de productos químicos (que luego resultaron ser de vacunas para ganado) pero otras personas habían bebido de la misma sin haberse afectado. Las determinaciones toxicológicas en el agua descartaron contaminación con plaguicidas fosforados, clorados, paraquat, talio y arsénico (y posteriormente dicamba). Afortunadamente se guardaron muestras de orina del día de ingreso de los dos pacientes ya que fueron las únicas que dieron positiva para el dicamba cuando se registró el antecedente de exposición al mismo.

Existen reportes crecientes de cuadros de rabdomiólisis inducidos por diversas sustancias químicas. En muchos de estos cuadros se consideran posibles patogénesis multifactoriales, influyendo otros factores tales como acidosis, hipoxia, hipotermia y compresión de la masa muscular durante el coma. La complicación más frecuente observada es la falla renal aguda⁽⁹⁻¹¹⁾ y existen también referencias de complicaciones cardíacas.

En el análisis bibliográfico realizado encontramos más de 60 trabajos de rabdomiólisis por diferentes sustancias pero no por dicamba. Se menciona que a nivel del músculo esquelético el dicamba puede provocar espasmos musculares miotónicos en animales de experimentación. Para el 2,4-D y MCP (ácido 2-metil-4-clorofenoxipropiónico, mecoprof) existen descripciones de cuadros de rabdomiólisis.^(12,13)

El National Animal Poison Control Center de EEUU ha recibido consultas por cuadros neuromusculares en perros expuestos a herbicidas tipo ácido clorofenoxiacético (HAC), al atravesar campos fumigados con estos herbicidas. Esto motivó a la realización de un trabajo sobre miotonía en perros, inducida experimentalmente con 2,4-D y dicamba. Es interesante destacar que en el mismo se describe que el dicamba puede ser más agudamente tóxico en este aspecto⁽¹⁴⁾.

En un trabajo de revisión de las características farmacocinéticas de los (HAC)⁽¹⁵⁾ se expresó que si bien parecen ser similares entre los diversos compuestos están influenciadas por la dosificación, formulación, ruta de exposición y especies. Debido a que la exposición a cualquiera de estos herbicidas posee un potencial para desarrollar problemas toxicológicos similares, resulta útil examinar su farmacocinética como grupo. Solo enfatizamos los aspectos necesarios para explicar los casos reportados. Respecto a la absorción dérmica se refiere que puede ocurrir irritación dérmica y que esto tiende a aumentar la absorción. El grado de la absorción percutánea depende de la concentración particular del compuesto clorofenoxi individual, del vehículo, del sitio y área de la superficie de aplicación y de la hidratación de la piel. La absorción dérmica del 2,4-D parece ser la mayor vía de absorción en seres humanos expuestos ocupacionalmente y se estima que el total de la exposición puede ser por esta vía⁽¹⁶⁾. Está descrito que en humanos la absorción durante 7 días sin lavarse puede ser tan alta como del 58% para la sal dimetilamina. Se distribuyen en varios tejidos y están unidos fuertemente a las proteínas plasmáticas. Se eliminan sin cambios en la orina a través de un mecanismo activo y saturable de secreción renal. Los incrementos en las dosis influyen la absorción, metabolismo, distribución y eliminación de los HAC de modo que los

efectos biológicos se incrementan. Es decir, que los HAC con dosis bajas tienen cinética lineal y con dosis elevadas tienen cinética no lineal. Esto determina que pequeños incrementos en las dosis produzcan al cambiar de cinética incrementos desproporcionados en las concentraciones plasmáticas. Esto justifica el haber encontrado estos compuestos en la orina después de varios días de exposición. En personas expuestas laboralmente a estos compuestos, la eliminación a través de piel también sería una vía de excreción importante. También se conoce que la combinación de HAC puede sumar o potenciar sus efectos biológicos.⁽¹⁷⁾

Las dificultades diagnósticas en estos pacientes son atribuibles a varias causas. La latencia de varios días entre la exposición y la aparición de los primeros síntomas hizo olvidar a los pacientes el antecedente de exposición al herbicida (no solo ignoraban el riesgo de su acción sino que no habían tomado medidas higiénicas mínimas, como lavarse y cambiarse de ropas) e insistir en un antecedente más cercano como el consumo de agua de pozo. Al revisar bibliografía sobre el dicamba encontramos que se lo considera una sustancia de escasa toxicidad. No existen referencias respecto a cuadro de rabdomiólisis por dicamba (aunque sí por HAC). Si bien se considera que la exposición a cualquiera de estos herbicidas posee un potencial para desarrollar problemas toxicológicos similares, al tratar cada compuesto en forma individual se ignora ese concepto. Existen numerosas referencias bibliográficas sobre cuadros de miotonía provocadas con HAC en animales de experimentación y también se refieren calambres y debilidad de músculos en seres humanos, pero no se menciona que estos se pueden destruir y generar cuadros graves. La confirmación que el dicamba continuaba en los pacientes (situación que se entiende por la farmacocinética de estos compuestos dosis-dependiente) también nos resultó difícil ya que no es un análisis que se realice rutinariamente en nuestro medio. En ese momento se realizó con sistemas cromatográficos confiables (GC y HPLC) pero en ambos carecíamos de patrón de droga pura por lo que se debió utilizar como standard la parte líquida del producto comercial (que contenía dicamba). No se analizó el metsulfuron metil (parte sólida del preparado comercial). Posteriormente confirmamos la identidad con GC/MS. No encontramos información sobre el metsulfuron metil. La información del fabricante lo clasifica como sulfonilurea con una DL50 oral >5000 y dermal >2000. Podría producir hipoglucemia y acidosis. No podemos valorar en este episodio la importancia de la exposición combinada del dicamba con el metsulfuron metil ni los excipientes del herbicida. En el caso del paciente fallecido no se pudo confirmar que su intoxicación con el herbicida haya sido la causa de muerte aunque no hubo ninguna otra alternativa etiológica más convincente. (Se ha descrito la aparición de fibrilación ventricular en animales muertos por dosis masivas de 2,4-D)⁽³⁾. Creemos que frente a una exposición severa al dicamba, es necesario una conducta precavida que incluya observación clínica y pruebas de laboratorio como la CPK hasta 15 días posteriores. Resaltamos nuestros hallazgos por la ausencia de descripciones similares y por la valoración actual del dicamba como un producto prácticamente inocuo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gosselin RE, Smith RP & Hodge HC Eds. (1984) :Clinical Toxicology of Commercial Products, 5th Edition. Williams & Wilkins, Baltimore, MD; pp III-130-134.
2. EPA : Pesticide Fact Handbook. Noyes Publications, Park Ridge, NJ, (1988); pp 254-259.
3. Gilman AG, Rall TW, Nies AS & Taylor P. Eds.(1990): Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th de. Pergamon Press, New York, NY.
4. Flanagan RJ, Meredith TJ, Ruprah M, Onyon LJ, Liddle A.(1990) Alkaline diuresis for acute poisoning with chlorophenoxy herbicides and ioxynil. The Lancet.; 335: 454-458.
5. Flanagan RJ, Ruprah M (1989): HPLC measurement of chlorophenoxy herbicides, bromoxynil and ioxynil in biological specimens to aid the diagnosis of acute poisoning. Clin Chem; 31: 270-74.
6. Jimenez NC, Atallah YH, Bade TR (1989): Capillary column gas chromatographic determination of dicamba in water, including mass spectrometric confirmation. J Assoc. Off Anal Chem; 72 (5): 840-844.
7. Lauren DR, Taylor HJ, Rahman A (1988): Analysis of the herbicides dicamba, clopyralid and bromacil in asparagus by high performance liquid chromatography. J Chromatogr; 20; 439 (2): 470-475.
8. Scharfe RR, McLenaghams CC (1989): Rapid gas chromatographic method using nitrogen-phosphorus detection for N-nitrosodimethylamine in 2,4-D and MCPA herbicide formulations. J Assoc Off Anal Chem; 72 (3): 508-512.
9. Ahijado F, Garcia de Vinuesa S, Luno J (1990): Acute renal failure and rhabdomyolysis following cocaine abuse (letter). Nephron; 54: 268.
10. Malik GH, Sirwal IA, Reshi AR, Najar MS, Tanvir M, Altaf M.(1993) Acute renal failure following physical torture. Nephron; 63 (4): 434-437.
11. Hadjis T, Grieff M, Lockhat D, Kaye M. (1993) Calcium metabolism in acute renal failure due to rhabdomyolysis. Clin Nephrol; 39 (1): 22-27.
12. Berwick P (1970): 2,4-D poisoning in man. JAMA; 214:1114-1117.
13. Hayes WJ JR (1982): Pesticides Studies in Man. Williams & Wilkins, Baltimore; pp 520-526.
14. Beasley VR, Arnold EK, Lovell RA , Parker AJ. (1991) 2,4-D toxicosis (I): A pilot study of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid- and Dicamba-Induced myotonia in experimental Dogs. Vet Hum Toxicol; 33 (5): 435-440.
15. Arnold EK, Beasley VR (1989): The pharmacokinetics of chlorinated phenoxy acid herbicides: a literature review. Vet Hum Toxicol; 31 (2): 121-125.
16. Feldman RJ, Maibach HI. (1974) Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man. Toxicol Appl Pharmacol; 28: 126-132.
- 17.WHO. IPCS. (1989). 2,4-D Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). Environmental Health Criteria 29; pp 1-151.

Acta Toxicológica Argentina está indexada en el Chemical Abstracts. Dicha entidad ha fijado como abreviatura de esta revista la siguiente: "**Acta Toxicol. Argent.**"

**La página de Internet de Acta Toxicológica Argentina, es la siguiente: <http://www.hva.org.ar>
sitio: *hospital virtual de argentina***

Los números de Acta Toxicológica Argentina se pueden consultar en los archivos de la Biblioteca Nacional.

CRITERIO DE SALUD AMBIENTAL (OMS) Nº 164 CLORURO DE METILENO

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA (WHO) Nº 164 METHYLENE CHLORIDE

RESUMEN

1. Identidad, propiedades físicas y químicas, y métodos analíticos

El cloruro de metileno (diclorometano) es un líquido claro, altamente volátil y no inflamable, con un olor penetrante parecido al del éter. El compuesto puro en polvo es muy estable. El cloruro de metileno se hidroliza lentamente en presencia de humedad, dando lugar a pequeñas cantidades de ácido clorhídrico.

Al compuesto comercial se agregan pequeñas cantidades de estabilizadores para prevenir su descomposición.

Existen métodos analíticos para determinar el cloruro de metileno en medios biológicos y muestras ambientales; en todos ellos se utiliza cromatografía de gases y un detector apropiado. De esta manera se han alcanzado límites de detección muy bajos (p. ej., alimentos: 7 ng/muestra; agua: 0,01 µg/litro; aire: 1,76 µg/m³ (0,5 ppb); sangre: 0,022 mg/litro).

2. Fuentes de exposición humana y ambiental

Se estima que la producción mundial de cloruro de metileno asciende a 570 000 toneladas/año. La mayoría sus aplicaciones se basan en su capacidad para disolver grasas, plásticos y agentes aglutinantes de pintura, así como en su volatilidad y estabilidad. Su uso a nivel mundial se reparte del siguiente modo: aerosoles (20%-25%), quitapinturas (25%), disolvente en la industria química y farmacéutica (35%-40%), usos varios (p. ej., la fabricación de espuma de poliuretano) y limpieza de metales (10%-15%). El uso de cloruro de metileno tiende a disminuir, al menos en Europa occidental.

Más del 99% del cloruro de metileno liberado a la atmósfera procede de diversas industrias que lo emiten como producto final, o es el resultado del uso doméstico de quitapinturas y aerosoles.

3. Transporte, distribución y transformación en el medio ambiente

Debido a su alta volatilidad, la mayor parte del cloruro de metileno liberado al medio pasa a la atmósfera, donde se degrada reaccionando con radicales hidroxilo de origen fotoquímico; su tiempo de permanencia es de seis meses.

La degradación abiótica del compuesto en agua es lenta en comparación con la evaporación. Se ha comprobado que el cloruro de metileno desaparece rápidamente del suelo y de las aguas subterráneas.

Se han utilizado diversos sistemas de ensayo para determinar la degradación aerobia y anaerobia del clo-

ruro de metileno. La biodegradación completa, sobre todo en cultivos bacterianos tratados y en condiciones aerobias, es rápida (p. ej., mineralización del 49%-66% en 50 horas en fangos urbanos tratados). En los biorreactores se puede alcanzar una degradación de hasta un 10% por hora. No hay indicios de una bioacumulación o biomagnificación importantes.

4. Niveles medioambientales y exposición humana

Se ha detectado cloruro de metileno en el aire ambiente de zonas rurales y remotas a concentraciones comprendidas entre 0,07 y 0,29 µg/m³. En zonas suburbanas la concentración promedio es < 2 µg/m³, y en zonas urbanas, < 15 µg/m³. En las proximidades de vertederos de desechos peligrosos se han hallado hasta 43 µg/m³. Las precipitaciones también contienen a veces cloruro de metileno.

El cloruro de metileno penetra en el medio acuático a través de las descargas de aguas residuales de diversas industrias, habiéndose detectado su presencia en aguas superficiales, aguas subterráneas y sedimentos.

La población general se expone al cloruro de metileno cuando utiliza productos de consumo tales como los quitapinturas, cuyo empleo puede acompañarse de la presencia de niveles relativamente altos en el aire del interior de los domicilios.

La exposición ocupacional durante la producción tiene lugar sobre todo durante el llenado y envasado (la fabricación se lleva a cabo en sistemas cerrados). Tratándose de un compuesto usado en los quitapinturas, la exposición laboral al cloruro de metileno se produce durante la elaboración de quitapinturas, la fabricación de material para ordenadores y el acabado comercial de muebles.

El cloruro de metileno es ampliamente empleado como disolvente industrial en la elaboración de diversos productos, sobre todo en las industrias que se mencionan en la sección 1.2.

La vigilancia biológica de la exposición al cloruro de metileno puede basarse en la medición del propio disolvente en el aire espirado o en la sangre. No obstante, dado que la producción de monóxido de carbono con una exposición de más de 3-4 horas/día parece ser el factor limitante en lo que respecta a los riesgos para la salud, es preferible basar la vigilancia biológica en el análisis bien del monóxido de carbono presente en el aire espirado, o bien de la carboxihemoglobina (CO-Hb) en sangre.

Así y todo, esto sólo se puede aplicar a las personas no fumadoras. Deben tomarse muestras antes de transcurridas aproximadamente dos horas tras la exposición, o bien al cabo de 16 horas, esto es, a la mañana siguiente.

Los niveles postexposición de CO-Hb a las dos horas de interrumpir la exposición no deben sobrepasar el 2%-3%, y a las 16 horas el 1%, en los no fumadores expuestos durante ocho horas a menos de 350 mg/m³ de cloruro de metileno.

5. Cinética y metabolismo

El cloruro de metileno es absorbido rápidamente por los alvéolos pulmonares, a través de los cuales llega a la circulación sistémica. Es absorbido también por el tracto gastrointestinal, así como por vía cutánea, si bien en este último caso la velocidad de absorción es menor que por otras vías de exposición.

El cloruro de metileno se excreta con considerable rapidez, fundamentalmente a través del aire espirado por los pulmones. Puede atravesar la barrera hematoencefálica, así como la placenta, y se excreta también en pequeñas cantidades por la orina y la leche.

A altas concentraciones la mayoría del cloruro de metileno absorbido se espira inalterado.

El resto es metabolizado en monóxido de carbono, dióxido de carbono y cloruro inorgánico. Hay dos vías posibles de metabolización, cuya contribución relativa al metabolismo total depende en gran medida de la dosis y de la especie animal considerada. Una vía consiste en un proceso de metabolismo oxidativo mediado por el citocromo P-450, que conduce a la producción tanto de monóxido de carbono como de dióxido de carbono.

Esta vía funciona de manera parecida en todos los roedores estudiados y en el hombre. Si bien es la vía metabólica predominante a dosis bajas, se satura también a dosis relativamente bajas (en torno a 1.800 mg/m³). Aumentar la dosis por encima de ese nivel de saturación no conlleva un mayor metabolismo a través de esa vía. La otra vía está mediada por una glutatión-transferasa (GTF) y conduce, previa producción de formaldehído y de formiato, a la formación de dióxido de carbono. Al parecer esta vía sólo adquiere importancia a dosis superiores al nivel de saturación de la vía oxidativa «preferente». En algunas especies (p. ej., el ratón) constituye la principal vía metabólica a dosis suficientemente altas. Por el contrario, en otras especies (p. ej., el hámster o el hombre) esta vía apenas es utilizada, cualquiera que sea la dosis.

Las diferencias interespecies del metabolismo mediado por la GTF guardan una clara relación con las diferencias interespecies observadas en lo que respecta a la carcinogenicidad.

Analizando la intensidad del metabolismo mediado por esta vía en determinadas especies, se ha elaborado un modelo cinético del metabolismo del cloruro de metileno en diversas especies.

6. Efectos en organismos presentes en el medio ambiente

Por debajo de 500 mg/litro no se observa inhibición del crecimiento de algas y de bacterias aerobias. Se

han descubierto bacterias capaces de crecer en presencia de cloruro de metileno a concentraciones mucho mayores, incluida una solución saturada en agua (sección 4.2.4.1). Las bacterias anaerobias son más sensibles; se ha observado inhibición del crecimiento a una concentración de 1 mg/litro en fangos biológicos anaerobios.

En el suelo, se observó que una concentración de 10 mg/kg reducía considerablemente el contenido de ATP de la biomasa, incluidos hongos y bacterias aerobias, e inducía una inhibición transitoria de la actividad enzimática.

El nivel sin efectos observados fue de 0,1 mg/kg. En las lombrices de tierra el cloruro de metileno tiene un efecto moderadamente tóxico (100-1000 µg/cm²), como demuestra la prueba de toxicidad de contacto con papel de filtro.

En sedimentos no se observaron efectos tóxicos ni siquiera a concentraciones muy altas.

En plantas superiores no se observaron efectos al cabo de 14 días de exposición a 100 mg/m³.

Los peces adultos parecen relativamente insensibles al cloruro de metileno, incluso después de una exposición prolongada (14 días, CL50 > 200 mg/litro). El efecto del cloruro de metileno en *Daphnia* resulta difícil de evaluar porque hay grandes diferencias entre los resultados de los estudios realizados. La CE50 más baja notificada es de 12,5 mg/litro.

En cuanto al entorno acuático, se ha demostrado que los embriones de peces y anfibios son los más sensibles, observándose efectos sobre la incubación a partir de 5,5 mg/litro.

7. Efectos en mamíferos de laboratorio y en sistemas de prueba in vitro

7.1 Exposiciones aisladas

La toxicidad aguda del cloruro de metileno por vía respiratoria y por vía oral es baja. La CL50-6h por inhalación está comprendida en todas las especies entre 40.200 y 55.870 mg/m³. Se han registrado DL50 orales de 1.410-3.000 mg/kg. Los efectos agudos de la administración de cloruro de metileno por diversas vías de exposición se manifiestan fundamentalmente en el sistema nervioso central (SNC) y en el hígado, y se producen a dosis altas.

Se han observado trastornos del SNC a concentraciones de 14.100 mg/m³ o más, con ligeras variaciones del EEG a 1770 mg/m³. A concentraciones de 17.700 mg/m³ o más se observaron leves cambios histológicos en el hígado.

Ocasionalmente se vieron afectados otros órganos, tales como el riñón o el sistema respiratorio. En el ratón, los efectos sobre los pulmones se limitaron a las células de Clara después de una exposición a 7.100 mg/m³. Se ha notificado la aparición de sensibilización cardíaca a la arritmia inducida por adrenalina. Se han observado efectos cardiovasculares, si bien de manera irregular.

7.2 Exposición a corto y a largo plazo

La exposición prolongada a concentraciones altas de cloruro de metileno ($\geq 17.700 \text{ mg/m}^3$) causó efectos reversibles sobre el SNC, ligera irritación ocular y mortalidad en varias especies de laboratorio. Se observó una reducción del peso corporal en ratas a 3500 mg/m^3 , y en ratones a partir de 17.700 mg/m^3 . El hígado de perros expuestos continuamente a 3500 mg/m^3 por espacio de hasta 100 días se vio ligeramente afectado. Se observaron asimismo efectos en el hígado tras la exposición intermitente a 3.500 mg/m^3 en la rata, y a 14.100 mg/m^3 en el ratón.

Otros órganos diana son los pulmones y los riñones. No se hallaron indicios de daño neurológico irreversible en ratas expuestas por inhalación a concentraciones de hasta 7.100 mg/m^3 durante 13 semanas.

La administración oral de cloruro de metileno a ratas causó efectos hepáticos a partir de 200 mg/kg al día.

7.3 Irritación cutánea y ocular

El cloruro de metileno es moderadamente irritante para la piel y los ojos de animales experimentales.

7.4 Toxicidad para el desarrollo y la reproducción

El cloruro de metileno no es teratógeno en la rata o el ratón a concentraciones de hasta 16.250 mg/m^3 . En tres estudios realizados con animales no se observaron indicios de variación de la incidencia de malformaciones esqueléticas ni otros efectos sobre el desarrollo. Se notificaron efectos leves sobre el peso corporal fetal o materno a una concentración de 4.400 mg/m^3 , así como sobre el aumento de peso postnatal de ratas macho a una concentración del 0,04% en la dieta. Un estudio de toxicidad reproductiva llevado a cabo en dos generaciones de ratas expuestas a cloruro de metileno por inhalación a concentraciones de hasta 5.300 mg/m^3 , 6 h/día, 5 días/semana durante 17 semanas no puso de manifiesto ningún efecto adverso en lo tocante a los parámetros reproductivos, la supervivencia neonatal o el crecimiento neonatal en ninguna de las generaciones, F0 o F1.

7.5 Mutagenicidad y criterios de evaluación relacionados

En condiciones de exposición adecuadas el cloruro de metileno tiene efectos mutágenos en microorganismos procariontes, con o sin activación metabólica (*Salmonella* o *Escherichia coli*). En los sistemas eucariotes los resultados son negativos, salvo en un caso en que fueron débilmente positivos. Los ensayos y pruebas de mutación genética in vitro basados en la síntesis no programada de ADN (UDS) en células de mamífero fueron siempre negativos. Los ensayos in vitro realizados para detectar aberraciones cromosómicas en diferentes tipos de células dieron resultados positivos, mientras que en las pruebas de inducción de

intercambio de cromátides hermanas (SCE) se obtuvieron resultados negativos o ambiguos.

La mayoría de los estudios in vivo publicados no han aportado ningún dato indicativo de mutagenicidad del cloruro de metileno (determinada por ejemplo, mediante la prueba de aberración cromosómica, la prueba de los micronúcleos o el ensayo UDS).

Se ha notificado un aumento mínimo de la frecuencia de SCE y de micronúcleos en el ratón tras la exposición por inhalación a altas concentraciones de cloruro de metileno.

En ratas o ratones a los que se administraron dosis altas de cloruro de metileno no se observaron indicios de unión del cloruro de metileno al ADN ni de lesiones de éste. Son éstos los estudios in vivo potencialmente más sensibles, el mejor de los cuales permite detectar una alquilación por cada 106 nucleótidos.

Dentro de las limitaciones de las pruebas a corto plazo actualmente disponibles, no hay pruebas concluyentes de que el cloruro de metileno sea genotóxico in vivo.

7.6 Toxicidad crónica y carcinogenicidad

El cloruro de metileno es carcinógeno en el ratón, en el que la exposición a altas concentraciones (7.100 y 14.100 mg/m^3) es causa de tumores tanto pulmonares como hepáticos. La incidencia de esos dos tipos de tumores aumentó en ratones expuestos a 7.100 mg/m^3 durante 26 semanas y estudiados durante 78 semanas más. No se observaron signos claros de toxicidad o hiperplasia asociadas en los órganos diana.

La exposición de hámsters sirios a cloruro de metileno por inhalación a concentraciones de hasta 12.400 mg/m^3 durante dos años no tuvo efectos carcinógenos.

Se ha observado que las ratas expuestas al cloruro de metileno por diversas vías sufren una mayor incidencia de tumores en determinados lugares. Se ha notificado un exceso de tumores en la región de las glándulas salivales en ratas hembra expuestas a 5.300 ó 12.400 mg/m^3 durante dos años. Ese exceso sólo se hizo patente cuando se procedió a agrupar los tumores, todos ellos de origen mesenquimatoso, con fines estadísticos. El método estadístico utilizado era inapropiado dado que los tumores procedían de células de diverso tipo. Además, se señaló que las ratas utilizadas se habían visto infectadas al principio del estudio por un virus causante de una enfermedad común, la sialodacrioadenitis, que afecta sobre todo a la glándula salival. Probablemente los tumores no estaban relacionados causalmente con la exposición al cloruro de metileno, y la exposición se limitó a exacerbar la respuesta a la infección en la región de la glándula salival. El efecto no se reprodujo en un segundo estudio realizado con ratas expuestas a 3.500 , 7.100 ó 14.100 mg/m^3 durante su ciclo de vida. Un estudio ulterior realizado con ratas expuestas por inhalación a concentraciones de hasta 1.770 mg/m^3 de cloruro de metileno durante todo su ciclo de vida no reveló indi-

cios de carcinogenicidad. En ratas expuestas al cloruro de metileno a través del agua que consumían o de alimentos administrados con sonda tampoco se observaron indicios significativos de carcinogenicidad.

Tres estudios han puesto de manifiesto un aumento de la incidencia de tumores mamarios benignos en ratas expuestas a cloruro de metileno, en dos de los casos por inhalación y en el tercero por administración forzada. No se ha notificado ningún aumento de la incidencia de tumores mamarios en hámsters o en ratones sometidos a dosis comparables de cloruro de metileno. La dependencia de los tumores mamarios de las hormonas hipofisarias en la rata, tanto macho como hembra, es un dato incontrovertible.

En la rata, la prolactina actúa como iniciador y como promotor de la carcinogénesis mamaria. Hay datos convincentes de que el aumento de los niveles de prolactina incrementa la incidencia de tumores mamarios (p. ej., el injerto de varias hipófisis en ratas Sprague-Dawley aumenta la incidencia de tumores mamarios, y se ha observado además una correlación positiva entre la existencia de niveles elevados de prolactina en sangre y la incidencia de tumores mamarios en ratas hembra R-Amsterdam viejas). En las ratas hembra que han recibido carcinógenos, los tratamientos inductores de hiperprolactinemia dan lugar a un aumento espectacular de la incidencia de tumores.

Entre esos tratamientos cabe citar la adrenalectomía, los homoinjertos hipofisarios y el consumo de alimentos ricos en grasas.

El conocimiento de los mecanismos de inducción de adenomas mamarios por el cloruro de metileno en la rata es importante para poder evaluar los riesgos para el hombre. Las ratas Sprague-Dawley hembras sometidas a cloruro de metileno presentan una elevada concentración de prolactina en sangre. Al igual que la respuesta a otros agentes cuya acción está mediada por una hiperprolactinemia, la respuesta inducida por el cloruro de metileno se limita a la aparición de neoplasias benignas. No hay datos indicativos de una unión del cloruro de metileno al ADN de otros tejidos, por lo que parece improbable que pueda unirse al tejido mamario, tanto más cuanto que su metabolismo se produce fundamentalmente en el hígado. Es más probable, por tanto, que el aumento de la incidencia de adenomas mamarios se deba a un mecanismo indirecto en el que intervenga la hiperprolactinemia.

En cuanto al hombre, hay datos contradictorios respecto a si los tumores mamarios son tan sensibles a la prolactina como en la rata.

Este animal presenta niveles elevados de prolactina cuando es alimentado ad libitum en lugar de sometido a una dieta restringida, lo cual explica quizá la gran sensibilidad de la incidencia de tumores mamarios a diversos efectos ambientales y de otro tipo. En la rata, no obstante, la prolactina es luteotrófica. Un aumento de la prolactina circulante da lugar a un aumento de los niveles de progesterona y de estrógenos exógenos. Es la coincidencia de estos tres factores lo que causa el crecimiento túbulo-alveolar de las glán-

dulas mamarias y, finalmente, el desarrollo del tumor. La prolactina no es luteotrófica en los primates; es improbable, por tanto, que este mecanismo de desarrollo tumoral pueda tener importancia en el hombre.

En la rata, el mecanismo de desarrollo de tumores mamarios mediado por la hiperprolactinemia sólo entra en juego a las dosis de cloruro de metileno que alteran los niveles de prolactina. No se dispone de información directa sobre los niveles de prolactina en ratas sometidas a dosis bajas de cloruro de metileno, pero no se ha observado ningún aumento de la incidencia de adenomas mamarios tras la administración de dosis bajas por inhalación o a través del agua de bebida (p. ej., dosis inferiores a 250 mg/kg peso corporal).

8. Efectos en el hombre

El cloruro de metileno es irritante para la piel y para los ojos, sobre todo cuando se impide su evaporación. En estas condiciones, el contacto prolongado puede causar quemaduras químicas. Se ha notificado un caso de edema pulmonar grave por inhalación excesiva.

Se han producido también defunciones en casos de inhalación o contaminación cutánea accidentales. Los principales efectos tóxicos del cloruro de metileno son la depresión reversible del SNC y la formación de CO-Hb.

Se ha señalado también la aparición de disfunciones hepáticas y renales y de trastornos hematológicos tras la exposición al producto.

Se han observado problemas neurofisiológicos y neurocomportamentales en voluntarios humanos expuestos a concentraciones de cloruro de metileno de 694 mg/m³ durante 1,5 - 3,0 horas. No se han observado efectos neurológicos en hombres expuestos durante varios años a concentraciones del producto comprendidas entre 260 y 347 mg/m³.

De forma parecida, un grupo de raspadores de pintura de aviones ya jubilados con antecedentes de una larga (22 años) exposición a concentraciones altas, si bien no especificadas, de cloruro de metileno obtuvieron resultados "normales" en una batería de pruebas neurofisiológicas y psicológicas en comparación con un grupo testigo sin antecedentes de exposición, o en todo caso con antecedentes de una baja exposición al compuesto.

Un aumento de la tasa de abortos espontáneos entre empleadas de la industria farmacéutica finlandesa se ha atribuido a la exposición a cloruro de metileno. Sin embargo, el diseño incorrecto del estudio ha impedido establecer una relación causal.

Varios estudios de mortalidad realizados en cohortes pertinentes muestran resultados dispares en cuanto a las causas de defunción.

Se ha observado un aumento de la mortalidad por enfermedades específicas (como por ejemplo el cáncer pancreático o la cardiopatía isquémica), pero de forma irregular y sólo en determinados estudios. Estos efectos no se pueden atribuir a la exposición al cloruro de metileno.

CRITERIO DE SALUD AMBIENTAL (OMS) Nº 156 HEXACLOROBUTADIENO

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA (WHO) Nº 156 HEXACHLOROBUTADIENE

RESUMEN

1. Identidad, propiedades físicas y químicas, métodos de análisis

El hexaclorobutadieno es un líquido no inflamable, incombustible, claro, oleoso e incoloro a temperatura y presión ordinarias. Es poco soluble en el agua, pero miscible con éter y etanol.

La sustancia puede detectarse y determinarse cuantitativamente por métodos de cromatografía de gases. Los límites de detección son de 0,03 µg/m³ de aire, 0,001 µg/litro de agua, 0,7 µg/kg de peso húmedo en el suelo o en sedimentos y de 0,02 µg/litro de sangre. Se ha determinado un nivel de 0,47 µg/kg de peso húmedo de tejido.

2. Fuentes de exposición humana y ambiental

No hay indicaciones de que el hexaclorobutadieno exista como producto natural. Es principalmente un subproducto de la fabricación de hidrocarburos clorados y se presenta en las fracciones pesadas (como residuo). La producción anual mundial del compuesto en las fracciones pesadas en 1.982 se estimó en 10.000 toneladas. El hexaclorobutadieno puede utilizarse para recuperar gas que contiene cloro en plantas productoras de cloro y como líquido de lavado para eliminar ciertos compuestos orgánicos volátiles de las corrientes de gases. También se ha utilizado como fluido en giróscopos, como transmisor de calor, transformador, fluido aislante y fluido hidráulico, disolvente para elastómeros y como intermediario y sustancia para fumigar.

3. Transporte, distribución y transformación en el medio ambiente

Las principales vías de ingreso en el medio ambiente son las emisiones de residuos y el uso dispersivo. El paso de un entorno a otro ocurre principalmente por volatilización, adsorción a corpúsculos de materia y subsiguiente deposición o sedimentación. El hexaclorobutadieno no migra rápidamente en el suelo y se acumula en el sedimento. Se considera persistente en el agua a menos que haya mucha turbulencia. No produce hidrólisis. La sustancia parece ser fácilmente biodegradable aeróbicamente, aunque su biodegradabilidad no se ha investigado a fondo. El hexaclorobutadieno se fotoliza en las superficies. Se supone que, además de la deposición, la reacción con radicales hidroxilo es un importante sumidero de hexaclorobutadieno en la troposfera y su semivida atmosférica estimada es de hasta 2,3 años. La sustancia tiene un elevado potencial de bioacumulación, que se ha comprobado mediante observaciones en laboratorio y sobre el terreno. En la trucha arco iris se han determinado ex-

perimentalmente factores de bioconcentración en estado estacionario de 5.800 y 17.000 como promedio, sobre la base del peso húmedo. No se ha observado biomagnificación en laboratorio ni sobre el terreno.

4. Niveles ambientales y exposición humana

Se ha determinado la presencia de hexaclorobutadieno en el aire urbano; en todos los casos, los niveles eran inferiores a 0,5 µg/m³. Las concentraciones en lugares aislados son inferiores a 7 pg/m³. En las aguas de lagos y ríos de Europa se han registrado concentraciones de hasta 2 µg/litro, pero los niveles medios son generalmente inferiores a 100 ng/litro. En la región de los Grandes Lagos del Canadá se han detectado niveles muy inferiores (de aproximadamente 1 ng/litro). Allí los niveles en el sedimento del fondo pueden ser de 120 µg/kg de peso en seco. En capas más antiguas de sedimento, de 1.960 aproximadamente, se encontraron concentraciones más elevadas (de hasta 550 µg/kg de peso húmedo). Se ha demostrado que la concentración en el sedimento aumenta con el tamaño de la partícula de sedimento.

Las concentraciones de hexaclorobutadieno en organismos acuáticos, aves y mamíferos indican bioacumulación pero no biomagnificación. En las aguas contaminadas se han detectado niveles de más de 1.000 µg/kg de peso húmedo en varias especies y de 120 mg/kg (base grasa) en una especie. Lejos de los efluentes industriales, los niveles actuales se mantienen en general por debajo de 100 µg/kg de peso húmedo.

Se ha detectado la presencia del compuesto en la orina, en la sangre y en tejidos humanos. En ciertos alimentos que contienen una elevada fracción lipídica se han encontrado hasta unos 40 µg/kg y, en un caso, más de 1.000 µg/kg. Un estudio señala exposiciones ocupacionales de 1,6-12,2 mg/m³ y en la orina niveles de hasta 20 mg/litro.

5. Cinética y metabolismo

Se ha observado que los animales de laboratorio absorben rápidamente el hexaclorobutadieno después de la administración oral, pero no se ha investigado la velocidad de absorción después de la inhalación o de la exposición dérmica. En ratas y ratones, el compuesto se distribuye principalmente al hígado, a los riñones y al tejido adiposo. Se excreta rápidamente. Se ha demostrado que se fija a las proteínas y ácidos nucleicos del hígado y de los riñones.

La biotransformación del compuesto en animales de experimentación parece ser un proceso saturable. Se produce principalmente a través de una vía mediada por el glutatión, en la cual el hexaclorobutadieno se convierte inicialmente en conjugados de S-glutatión.

Estos conjugados pueden seguir metabolizándose, especialmente en el ribete en cepillo de las membranas de las células de los tubos renales, produciendo un metabolito sulfuroso reactivo que probablemente explique la nefrotoxicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad observadas.

6. Efectos en organismos presentes en el medio ambiente

El hexaclorobutadieno es de moderadamente a muy tóxico para los organismos acuáticos. Los más sensibles que se hayan observado han sido especies de peces y crustáceos; los valores de la CL50 en 96 horas oscilan entre 0,032 y 1,2 mg/litro en crustáceos y entre 0,09 y 1,7 mg/litro en peces. Se ha demostrado que el riñón es un órgano muy afectado en los peces.

Sobre la base de varias pruebas a largo plazo con especies de algas y de peces, se ha establecido un nivel sin efectos observados de 0,003 mg/litro; así pues, el compuesto se clasifica como muy tóxico para las especies acuáticas.

Los valores extremos investigados comprenden parámetros de toxicidad general, neurotoxicidad, bioquímicos, hematológicos, patológicos y relacionados con la reproducción.

En una prueba de 28 días de duración en la que se examinaron las primeras fases de la vida de carpas se observó que la reproducción no se veía afectada con concentraciones de hasta 0,017 mg/litro, mientras que con concentraciones de 0,013 y 0,017 mg/litro se observaron un aumento de la mortalidad y una disminución del peso corporal. El nivel sin efectos observados era de 0,0065 mg por litro.

Se ha descrito una sola prueba fiable con organismos terrestres. En una prueba de 90 días con codornices japonesas alimentadas con una dieta que contenía el compuesto en concentraciones de 0,3 a 30 mg/kg de dieta se observó que la supervivencia de los polluelos disminuía a partir de 10 mg/kg de dieta.

7. Efectos en animales de experimentación y en sistemas de prueba in vitro

7.1 Toxicidad general

Después de la ingestión de una dosis oral única, el hexaclorobutadieno es de levemente a moderadamente tóxico para las ratas adultas, moderadamente tóxico para las ratas macho destetadas y muy tóxico para las ratas hembras destetadas. Los principales órganos afectados son el riñón y, en grado mucho menor, el hígado. Los datos obtenidos con animales indican que el vapor de hexaclorobutadieno es irritante para las membranas mucosas y el líquido es corrosivo. La sustancia debe considerarse como un agente sensibilizador.

En los riñones de ratas, ratones y conejos, el hexaclorobutadieno causa en los tubos proximales del riñón una necrosis que depende de la dosis. Las ra-

tas macho adultas son menos vulnerables a la toxicidad renal que las hembras adultas y que los machos jóvenes. Los ratones jóvenes son más vulnerables que los adultos y no se observaron diferencias entre un sexo y otro. En las ratas hembra adultas la dosis intraperitoneal única más baja con la cual se observó necrosis renal fue de 25 mg/kg de peso corporal y en ratones adultos, machos y hembras, fue de 6,3 mg/kg de peso corporal. Se observaron cambios bioquímicos y alteraciones funcionales marcados en los riñones con dosis iguales o mayores que las asociadas con necrosis.

Asimismo, en seis pruebas orales de corto plazo, dos estudios sobre reproducción y un estudio de largo plazo sobre la dieta realizados con ratas, el riñón fue el principal órgano afectado. Los efectos relacionados con la dosis comprenden una reducción del peso relativo del riñón y una degeneración del epitelio de los tubos. El nivel sin efectos nocivos observados de toxicidad renal en ratas en un estudio de dos años fue de 0,2 mg/kg de peso corporal por día. En un estudio de 13 semanas efectuado en ratones se obtuvo un nivel sin efectos nocivos observados de 0,2 mg/kg de peso corporal por día. Las hembras adultas de ambas especies eran más vulnerables que los machos adultos.

En una prueba de inhalación de corto plazo (6 horas por día durante 12 días) se observaron efectos semejantes en los riñones con una concentración de vapor nominal de 267 mg/m³, con la cual también se observaron trastornos respiratorios y degeneración de la corteza suprarrenal.

7.2 Reproducción, embriotoxicidad y teratogenicidad

Dos estudios sobre dieta y reproducción en ratas con dosis de hasta 20 y 75 mg/kg de peso corporal por día, respectivamente, mostraron una reducción del peso al nacer y un aumento del peso neonatal cuando se administraban a la madre dosis tóxicas de 20 y 7,5 mg/kg de peso corporal, respectivamente. La dosis altamente tóxica de 75 mg/kg de peso corporal por día fue suficiente para impedir la concepción y la implantación uterina. No se observaron anomalías del esqueleto.

En dos pruebas de teratogenicidad en las que se expuso a las ratas o bien a vapor de hexaclorobutadieno en concentraciones que oscilaban entre 21 y 160 mg/m³ durante 6 horas diarias (desde el 6° hasta el 20° día del embarazo) o bien a la administración intraperitoneal de 10 mg/kg de peso corporal por día (desde el 1° al 15° día de embarazo) se observaron en el desarrollo del feto efectos tóxicos tales como una reducción del peso al nacer, un retraso del desarrollo del corazón y uréteres dilatados pero sin grandes malformaciones. El retraso del desarrollo se observó en niveles que también eran tóxicos para las madres.

7.3 Genotoxicidad y carcinogenicidad

En la prueba de Ames (Salmonella) se ha observa-

do que el hexaclorobutadieno induce mutaciones genéticas en condiciones especiales que favorecen la formación de productos de conjugación con el glutatión. En un estudio in vivo se observó que había inducido aberraciones cromosómicas, pero no se observaron tales aberraciones en dos estudios in vitro. En una prueba in vitro se observó que la frecuencia de los intercambios entre cromátidas hermanas había aumentado en las células ováricas de hámsters de China. Se ha señalado el gran potencial mutagénico de los metabolitos sulfurosos del hexaclorobutadieno. En estudios in vitro, el compuesto indujo síntesis imprevistas de ADN en cultivos de fibroblastos de embriones de hámsters de Siria, pero no en cultivos de hepatocitos. Indujo síntesis imprevistas de ADN en ratas in vivo, pero no indujo mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila melanogaster*.

En el único estudio de largo plazo (dos años), en el cual las ratas recibieron una dieta que contenía hexaclorobutadieno en dosis de 0,2, 2 ó 20 mg/kg de peso corporal por día, se observó una mayor incidencia de neoplasias de los tubos renales únicamente con la dosis más elevada.

7.4 Mecanismos de toxicidad

La nefrotoxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad del hexaclorobutadieno depende de la biosíntesis del conjugado sulfuroso tóxico 1-glutatión-S-yl-1,2,3,4,4-pentaclorobutadieno. Este conjugado se sintetiza principalmente en el hígado y se metaboliza luego en la bilis, el intestino y los riñones convirtiéndose en 1-cisteína-S-yl-1,2,3,4,4-pentaclorobutadieno (CPB). La activación de CPB, que depende del conjugado de cisteína beta-lyasa, en una tiocetena reactiva en las células de los tubos proximales finalmente da lugar a un enlace covalente con macromoléculas celulares.

8. Efectos en el ser humano

No se han descrito efectos patogénicos en la población en general.

Se conocen dos casos de trastornos padecidos por trabajadores agrícolas que utilizaban el hexaclorobutadieno como fumigante, pero esas personas también habían estado expuestas a otras sustancias. En los linfocitos de la sangre periférica de operarios que trabajaban en la producción de hexaclorobutadieno y estaban expuestos, según se informa, a concentraciones de 1,6 a 12,2 mg/m³ se observó una frecuencia mayor de aberraciones cromosómicas.

9. Evaluación de los riesgos para la salud humana y de los efectos en el medio ambiente

9.1 Evaluación de los riesgos para la salud humana

Como se han hecho muy pocos estudios en el ser humano, la evaluación se basa principalmente en estudios efectuados en animales de laboratorio. Sin embargo, los limitados datos existentes sobre el ser hu-

mano, obtenidos in vitro, sugieren que el metabolismo del hexaclorobutadieno en el ser humano es semejante al observado en animales.

Se considera que el vapor de hexaclorobutadieno irrita las membranas mucosas del ser humano y que en estado líquido es corrosivo. El compuesto también debe considerarse como un agente sensibilizador.

Los principales órganos afectados por la toxicidad son los riñones y, en mucho menor grado, el hígado. En base a estudios de corto y largo plazo de ingestión por vía oral por ratas y ratones, se determinó un nivel sin efectos adversos observados de 0,2 mg/kg de peso corporal por día. En un estudio de inhalación en el corto plazo en ratas (12 días, a razón de 6 horas por día), el nivel sin efectos adversos observados fue de 53 mg/m³. Se observaron una reducción del peso al nacer y un aumento de peso neonatal únicamente con dosis tóxicas para la madre; lo mismo puede decirse de los efectos tóxicos para el desarrollo.

Se ha observado que el hexaclorobutadieno induce mutaciones genéticas, aberraciones cromosómicas, aumento de los intercambios entre cromátidas hermanas y síntesis imprevistas de ADN, aunque algunos estudios han dado resultados negativos. Con respecto a la genotoxicidad del hexaclorobutadieno, las observaciones realizadas en animales son limitadas y las efectuadas en el ser humano insuficientes.

Tras la administración oral a largo plazo del hexaclorobutadieno a ratas, se ha observado una mayor frecuencia de neoplasias de los tubos renales, pero solamente con dosis elevadas causantes de nefrotoxicidad notable. Hay indicios limitados de carcinogenicidad en animales e indicios insuficientes en el ser humano. En base al nivel sin efectos adversos observados en ratones y ratas, que es de 0,2 mg/kg de peso corporal por día, se ha estimado un nivel sin efectos adversos observados en el ser humano, que es de 0,03 a 0,05 mg/kg de peso corporal por día. Hay un margen de seguridad de 150 entre el nivel sin efectos adversos observados estimado y la ingesta diaria total máxima estimada, suponiendo que el compuesto se absorba a través del agua de bebida contaminada y de alimentos con elevado contenido de lípidos.

9.2 Evaluación de los efectos en el medio ambiente

El hexaclorobutadieno es de moderadamente a muy tóxico para los organismos acuáticos; los crustáceos y peces son los más vulnerables. Se ha establecido un nivel de riesgo para el medio ambiente de 0,1 µg/litro. Se estima que la concentración ambiental prevista máxima lejos de las fuentes equivale al nivel de riesgo ambiental extrapolado multiplicado por dos y, por consiguiente, los organismos acuáticos tal vez estén en peligro en las aguas de superficie contaminadas. No pueden excluirse efectos adversos en organismos bentónicos.

En vista de la toxicidad del hexaclorobutadieno para los mamíferos, el consumo de organismos bentónicos o acuáticos por otras especies tal vez sea motivo de inquietud.

CRITERIO DE SALUD AMBIENTAL (OMS) Nº 170. Evaluación del riesgo de sustancias químicas para el ser humano. Extrapolación de los valores guía para límites de exposición basado en los criterios de salud

ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA (WHO) Nº 170. Assessing human health risks of chemicals. Derivation of guidance values for health-based exposure limits.

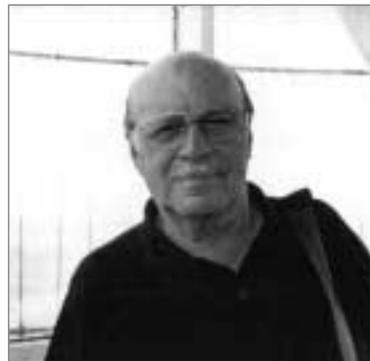
RESUMEN

En los monografías de la serie Criterios de Salud Ambiental (EHC) del IPCS deben formularse valores orientativos para la exposición a sustancias químicas presentes en el medio ambiente, valores que las autoridades nacionales y locales pueden modificar al determinar sus límites y normas aplicables al medio. Los pasos previstos para cualquier sustancia química son los siguientes:

1. Evaluar y resumir la información referente a la toxicidad en los animales y el hombre y la exposición en el hombre, seleccionando la más pertinente para el cálculo de los valores orientativos. El esquema más apropiado para presentar los datos pertinentes con miras al cálculo de los valores orientativos es un texto que describa sucintamente los datos críticos, complementado con los gráficos oportunos.
2. Calcular a partir de esos datos una Ingesta Tolerable (IT) para las diversas vías de exposición y para los distintos efectos que se considere que tienen un umbral. Ello entraña el uso de factores de incertidumbre, aplicados por lo general al nivel sin efectos adversos observados (NOAEL) para los efectos críticos referidos en el estudio más pertinente. En el caso de los efectos sin umbral, se caracterizará en la medida de lo posible la relación dosis-respuesta.
3. Estimar la proporción de ingesta total que tiene su origen en los diversos medios (p. ej., aire de espacios interiores y ambiental, alimentos y agua), sobre la base de las exposiciones calculadas para un conjunto coherente de volúmenes supuestos de ingesta (utilizando el hombre de referencia de la Comisión Internacional de Protección contra las Radiaciones (CIPR)) y de concentraciones representativas en el medio ambiente general para una determinada situación. Si no se dispone de datos suficientes sobre las concentraciones en diversos medios, pueden emplearse modelos matemáticos para estimar la distribución por esos medios.
4. Asignar una proporción de la IT a diversos medios de exposición (basándose en la exposición estimada conforme a lo explicado en el paso 3 precedente) para determinar la ingesta o exposición en cada medio.
5. Formular valores orientativos a partir de las ingestas asignadas a cada medio, teniendo en cuenta (si es necesario) el peso corporal, el volumen de ingesta y la eficiencia de absorción (la eficiencia de absorción relativa cuando para calcular el valor orientativo se utilice la IT correspondiente a otra vía de exposición). En los monografías de la serie EHC se formularían valores orientativos para unas condiciones de exposición claramente definidas, basadas en los datos del hombre de referencia de la CIPR y no necesariamente representativas de las condiciones de exposición nacionales o locales. Se calcularán comúnmente valores orientativos para una población general representativa y unas condiciones de exposición representativas. Los valores orientativos se deberán adaptar a nivel nacional y local según proceda en función de las circunstancias locales.
6. En los monografías de la serie EHC se deberán detallar claramente los fundamentos del cálculo tanto de la IT como de los valores orientativos (respecto al grado de detalle, véanse los ejemplos presentados en el apéndice 1).

Obituario - *Obituary*

Profesor Emérito JUAN CARLOS GARCIA FERNANDEZ



El 8 de noviembre de 1998 falleció el Prof. Emérito Juan Carlos García Fernández. Una grave dolencia, que culminara con su deceso no impidió que desarrollara sus tareas específicas al frente del Laboratorio de Toxicología y Química Legal de la Corte Suprema de Justicia de la Nación hasta tres días antes de su deplorable e infortunada desaparición.

Su pérdida, si bien enluta y afecta a su familia, también lo hace con quienes lo conocieron.

Nacido en Buenos Aires el 6 de noviembre de 1919 terminó sus estudios de Farmacia en 1942 y de Bioquímica en 1944. Se doctoró en la vieja Escuela de Farmacia dependiente de la Facultad de Ciencias Médicas en 1945.

En 1944 ingresó en las entonces Oficinas Químicas Municipales (posteriormente en 1950 DNQ) en el área analítica relacionada con su disciplina y de la DNQ en 1950 al ser absorbidas por este organismo las Oficinas Químicas Municipales.

Al crearse la Facultad de Farmacia y Bioquímica el 24 de mayo de 1957, se incorporó a la Cátedra de Toxicología y Química Legal como Jefe de Trabajos Prácticos.

Posteriormente fue, en la misma Cátedra, Profesor Adjunto y Asociado hasta el año 1978.

En el año 1976 se incorporó al Poder Judicial como Perito Bioquímico, desarrollando sus tareas en el Laboratorio oficial del mismo durante 22 años.

Esa prolongada actuación le permitió, a la vez, acrecentar y profundizar sus conocimientos y plasmar en él, al profesional sagaz, efectivo, auténtico.

En el año 1978 reemplaza al titular de la Cátedra de Toxicología y Química Legal, funciones que desempeña hasta su retiro como profesor regular en 1985 y Director de Departamento de Toxicología.

Su inquietud científica abarca más de 90 numerosos trabajos y comunicaciones en Jornadas y Congresos científicos del país y del extranjero. En la estima y reconocimientos que promoviera su personalidad, el laboratorio judicial fue seleccionado por las Naciones Unidas como efector de la instrucción y el entrenamiento de becarios de países sudamericanos en materia de drogas ilícitas, tarea que se ha hecho efectiva todos los años, con especial reconocimiento y general beneplácito.

Al momento de su muerte, ya reconocido como Profesor Emérito, ejercía la titularidad de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, con el beneplácito de toda la comunidad bioquímica -farmacéutica.

Entre otras realizaciones merecen destacarse:

- La organización y posterior dirección de las Residencias Bioquímicas en Toxicología establecidas por el Ministerio de Bienestar Social.
- Su desempeño como miembro del Consejo Académico Consultor en 1984 y del Consejo Directivo en 1985-89.
- Delegado de la UBA ante la CONATON y la CONA para Control de Narcotráfico y el Abuso de Drogas en el período 1972-1982.
- Decano electo en 1985, no pudo asumir su cargo por incompatibilidad con el cargo que ejercía en la Justicia N...
- Designado Profesor Emérito de la UBA en 1986.
- Asesor de la OPS y OMS y miembro de los diversos campos del quehacer toxicológico entre los años 1982 y 1993.
- Presidente de la Comisión de Estupefacientes de la NU en forma interina en 1982/83 y como titular en 1983/84 y posteriormente como Miembro del Comité Ejecutivo de dicha Secretaría (1984/85).
- Obtuvo nueve premios otorgados por instituciones científicas.
- Miembro de honor de diversas sociedades científicas nacionales y del exterior, miembro titular de academias nacionales y correspondiente de la Real Academia de España.
- Coautor de 6 libros.
- Fue Presidente de la Sociedad Argentina de Toxicología (actual ATA).
- Ocupó diversas posiciones en distintas comisiones de la ATA.

La muerte de un colega, de un amigo, de un maestro no lleva solamente a evaluar ese tránsito sino que también su efecto sobre la vida de los que lo circundaron y trataron.

Mientras muchos elogian la vida y carrera plena de logros, nosotros recordamos por sobre todo su conducta caballeresca.

M.A.G.; O.A.L.; J.L.L.; C.M.P; O.R.

INDICES - INDEXES Volumen 6 (1998)

Indice de autores - Authors index

ALVAREZ-LEITE, E. M.	4	PARICA, C. A.	28
CASTRO, G. D.	28	PECHEN DE D'ANGELO, A.	28
CASTRO, J. A.	28	PEREIRA BASTOS DE SIQUEIRA, M. E.	4
COSTANTINI, M. H.	28	PEREZ, A. A.	36
DA COSTA MALHEIROS, G. A. C. C.	4	POMIER SUAREZ, O.	8
DELGADO DE LAYÑO, A. M. A.	28	REBELO, M. F.	34
DELLAMEA, A. B.	27	ROSES, O. E.	28
KIRS, V.	28	RUBIO, N. C.	28
LERDA, D.	11	STROBL, A.	36
MARTINEZ CABRERA, J.	8	VALLEJO, N.E.	3
MASSARI, L. M.	36		

Indice Temático - Subject Index

Agua residual, Brachidanio rio, Ensayo de toxicidad, Klebsiella sp.	34	Agrochemicals, Clandestine waste, Río Negro, Potential risk	28
Agroquímicos, Disposición clandestina, Riesgo potencial, Río Negro	28	Brachidanio rio, Klebsiella sp., Wastewater, Toxicity test	34
Atención primaria de la salud, Cuba, Recursos humanos	8	Carboxyhemoglobin, Spectrophotometry	4
Brachidanio rio, Klebsiella sp., Agua residual, Ensayo de toxicidad	34	Clandestine waste, Agrochemicals, Potential risk, Río Negro	28
Carboxihemoglobina, Espectrofotometría	4	Cuba, Human resources, Health primary care	8
Cenizas volcánicas, Perfil metabólico	36	Dimethylterephthalate, Genotoxicity, Polyethyleneglycol terephthalate, Terephthalic acid	11
Criterio de Salud Ambiental (OMS) N° 168 Cresoles	55	Editorial N° 1	3
Criterio de Salud Ambiental (OMS) N° 175 Rodenticidas anticoagulantes	4	Editorial N° 2	27
Criterio de Salud Ambiental (OMS) N° 179 Morfina	55	Enviromental Health Criteria (WHO) N° 168 Cresols	55
Criterio de Salud Ambiental (OMS) N° 182 Talio	14	Enviromental Health Criteria (WHO) N° 175 Anticoagulant rodenticides	4
Criterio de Salud Ambiental (OMS) N° 185 Acido/anhidrido cloréndico	62	Environmental Health Criteria (WHO) N° 179 Morfin	55
Cuba, Recursos humanos, Atención primaria de la salud	8	Environmental Health Criteria (WHO) N° 182 Thallium	14
Dimetiltereftalato, Genotoxicidad, Polietilenglicol tereftalato, Acido tereftálico	11	Environmental Health Criteria (WHO) N° 185 Chlorendic acid/anhydride	62
Disposición clandestina, Agroquímicos, Riesgo potencial, Río Negro	28	Genotoxicity, Terephthalic acid, Dimethylterephthalate, Polyethyleneglycol terephthalate	11
Editorial N° 1	3	Health primary care, Cuba, Human resources	8
Editorial N° 2	27	Human resources, Cuba, Health primary care	8
Ensayo de toxicidad, Klebsiella sp., Agua residual, Brachidanio rio,	34	Klebsiella sp., Wastewater, Brachidanio rio, Toxicity test	34
Espectrofotometría, Carboxihemoglobina	4	XVIII Meeting of Toxicology. Abstracts	39
Genotoxicidad, Acido tereftálico, Dimetiltereftalato, Polietilenglicol tereftalato	11	Metabolic profile, Volcanic ashes	36
XVIII Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología. Comunicaciones libres	39	Polyetileneglycol terephthalate, Terephthalic acid, Dimethylerephthalate, Genotoxicity	11
Klebsiella sp., Agua residual, Brachidanio rio, Ensayo de toxicidad	34	Potential risk, Agrochemicals, Clandestine waste, Río Negro	28
Perfil metabólico, Cenizas volcánicas	36	Río Negro, Agrochemicals, Clandestine waste, Potential risk	28
Polietilenglicol tereftalato, Acido tereftálico, Dimetilereftalato, Genotoxicidad,	11	Spectrophotometry, Carboxyhemoglobin	4
Recursos humanos, Cuba, Atención primaria de la salud	8	Toxicity test, Klebsiella sp., Wastewater, Brachidanio rio	34
Riesgo potencial, Agroquímicos, Disposición clandestina, Río Negro	28	Volcanic ashes, Metabolic profile	36
Río Negro, Agroquímicos, Disposición clandestina, Riesgo potencial	28	Wastewater, Brachidanio rio, Toxicity test, Klebsiella sp.	34

AGRADECIMIENTOS / ACKNOWLEDGEMENTS

El comité Editorial agradece a los siguientes profesionales por su actuación como revisores de los trabajos publicados.

Veniero E. Gambaro, Rino Froidi, Susana García, Marta Carballo, Aristeo Renzoni, Eduardo N. Zerba, Adriana Bernacchi, Miguel D'Aquino, Elisa Saligari.

Acta Toxicológica Argentina

Instrucciones para los autores de contribuciones para la revista

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 03279286) es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina. Tiene por objetivo básico la publicación de trabajos originales, comunicaciones breves, actualizaciones o revisiones, temas de divulgación, comentarios bibliográficos, notas técnicas y cartas al editor. Asimismo se publicarán noticias relacionadas con los diferentes campos de la Toxicología.

Acta Toxicológica Argentina publicará contribuciones en español, portugués e inglés. Todas serán evaluadas por dos revisores; la selección de los mismos será atributo exclusivo del Comité Editorial. Este proceso determinará que el mencionado Comité opte por rechazar, aceptar con cambios o aceptar para su publicación el trabajo sometido a su consideración. En todos los casos los autores recibirán copia sin firma de la opinión de los evaluadores.

Las contribuciones científicas originales enviadas a consideración de ATA deberán ajustarse al siguiente formato básico:

- página 1: título, subtítulo nombres completos del o de los autores, laboratorio o institución donde se realizó el trabajo, dirección postal completa, incluyendo código postal, teléfono y fax, autor al cual debe dirigirse toda la correspondencia.
- página 2: título de trabajo en castellano y en inglés resúmenes de hasta 250 palabras en castellano y en inglés. tres-cuatro palabras clave en castellano, portugués e inglés.
- página 3 en adelante: Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Bibliografía citada, Leyendas de Ilustraciones y Tablas con leyenda.

La extensión máxima de estos aportes no deberá superar las 8 (ocho) páginas. El texto deberá ser escrito en PC, en papel tamaño A4, a doble espacio, con márgenes superior, inferior e izquierdo de 4 cm. Se deberán enviar 3 juegos. Conjuntamente con las 3 copias del manuscrito, los autores deberán remitir una versión en disquete de 3 1/2" utilizando alguno de los siguientes procesadores de texto: Word for MS-DOS; WORD for MACINTOSH; WORD PERFECT for DOS, indicando programa y versión usados. En el caso que los revisores recomienden la revisión del trabajo, la nueva versión deberá enviarse en disquete y tres copias impresas.

Las comunicaciones breves deberán respetar un formato similar al indicado para las contribuciones científicas exceptuando el resumen en español. El texto no necesariamente se dividirá en las partes indicadas (Introducción, Material y Métodos, etc.); no obstante, deberá contener en forma concisa la información que corresponde a esas partes. La extensión de esta categoría de aportes no deberá superar las 3 (tres) páginas.

Las revisiones, actualizaciones y temas de divulgación deberán ser lo más concisas posible y su extensión no excederá de 6 (seis) páginas. Su redacción deberá considerar lectores con formación científica pero ajenos o alejados del tema. Se considerarán preferentemente las revisiones solicitadas por el Comité Editorial. Los comentarios bibliográficos serán contribuciones solicitadas por el Director. El autor deberá emitir una opinión fundamentada del trabajo sometido a su consideración. Además deberá incluir la siguiente información: título en idioma original, autor/es, edición considerada, traductor, editorial y asiento de la misma, tomo o volumen, número de páginas y año de edición. Se indicará claramente nombre del comentarista, institución a la que pertenece y domicilio completo. El texto no podrá ocupar más que 2 (dos) páginas.

Las notas técnicas se referirán exclusivamente a modificaciones de métodos, determinación de errores de las mismas, etc. Su extensión no superará las 2 (dos) páginas; al final deberán constar los datos que identifiquen claramente al autor/es.

Las cartas al editor serán textos de una extensión no mayor de 200 palabras y revestirán el carácter de correspondencia científica referida a textos publicados con anterioridad. El o los autores serán debidamente indicados.

Se solicita a los autores que tengan en cuenta las siguientes normas al preparar sus manuscritos:

- en todos los casos se deberá consignar en el ángulo superior derecho de cada hoja el apellido del autor o del primer autor y el número correlativo que corresponda, incluidas las páginas con Tablas.
- 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 itálicas o subrayados.
- las ilustraciones (fotografías, gráficos) deben ser confeccionadas sobre materiales de alta calidad, con técnicas que permitan su reproducción sin tratamientos especiales. Es aconsejable que este material tenga las dimensiones de la caja de *Acta Toxicológica Argentina*; los autores deben tener presente que en los casos de ilustraciones en las que sea necesario proceder a su reducción el tamaño de las letras, números y demás elementos de las mismas deben tener dimensiones mayores para que la nitidez no se vea afectada luego de la impresión.

Se enviarán un juego de originales y dos copias. Cada una de las ilustraciones deberá portar en el dorso, escrito con lápiz suave, el número que le corresponde, nombre del primer autor y mediante una flecha se indicará la posición superior. Las leyendas irán en hoja aparte.

Los costos adicionales que pudieran ocasionarse por la edición de dicho material serán a cargo del autor.

- las tablas y sus leyendas se presentarán en forma individual, en hojas aparte, identificadas mediante numeración arábiga conforme al orden en que aparecen en el texto. La ubicación preferente de la tabla en el texto se indicará mediante una flecha. Las tablas se ubicarán el final de cada manuscrito.
- las citas bibliográficas en el texto se indicarán mediante números correlativos, por orden de aparición, entre paréntesis: por ejemplo. "La separación de las isoenzimas se hizo por electroforesis de acuerdo a la técnica de Dietz y Lubrano (4)". En el caso de citar artículos de más de dos autores, se indicará el apellido del primero seguido de la expresión et al.: "Castañe et al. (5) fueron los primeros en..."
- las referencias bibliográficas serán agrupadas bajo el acápito "Bibliografía citada"; la lista se ordenará conforme a los números asignados.

El formato de las citas es el siguiente:

artículo en publicación periódica:

"Malla Reddy, P. and M. Bashamohideen (1989). Fenvalerate and cypermethrin induced changes in the haematological parameters of *Cyprinus carpio*. *Acta Hydrochim. Hydrobio.* 17 (1), 101-107."

libro: "Dix, H.M. (1981). Environmental pollution. John Wiley & Sons, New York, 286 pp."

Las abreviaturas de la de nominación de las revistas serán las que ellas mismas indican en su texto.

- cualquier modificación excepcional de las normas estipuladas que los autores soliciten será considerada por el Director.
- las pruebas de galera se enviarán al autor indicado como receptor de la correspondencia. Las mismas serán revisadas y devueltas dentro de las 48 horas de recibidas.
- el autor indicado recibirá 10 separatas sin cargo. El excedente solicitado sobre esa cantidad será costado por el/los autores: la cantidad solicitada deberá ser indicada al Editor en el momento de devolver las pruebas de galera.

Toda la correspondencia referida al **Acta Toxicológica Argentina** deberá ser dirigida al Comité Editorial, Alsina 1441, Of. 302 - (1088) Buenos Aires, Argentina.

Telefax: ++54-11-4381-6919.

Se solicita canje con otras publicaciones temáticamente afines a **Acta Toxicológica Argentina**.

Acta Toxicológica Argentina

Instructions to authors

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 03279286) is the official journal of the Asociación Toxicológica Argentina (Argentine Toxicological Association) for scientific dissemination.

Acta Toxicológica Argentina (herein below, ATA) is basically aimed at publishing original full-length papers, short communications, reports on research in progress or review papers, topics of interest to workers in Toxicology, book reviews, technical communications as well as letters to the Editor. News relevant to the different fields of Toxicology will also be published.

ATA will publish articles written in either Spanish, Portuguese, or English. Every article will be evaluated by two examiners. Only the Editorial Board will be responsible for selecting articles -that is, decisions about (a) rejected articles, (b) accepted articles with, however, changes to be introduced by authors, or (c) accepted articles with no changes whatsoever are a privilege of the Editorial Board. In all cases, authors are to receive an unsigned copy of the examiners' evaluation.

Scientific original typescripts submitted to the consideration of the Editorial Board should adhere to the following, basic format:

- Page 1: Title, and subtitle of paper. Authors' full names; academic or professional affiliation, and complete name of the laboratory or institution, research involved has been conducted at. Complete address (city, State or Province, zip code, country, phone number and fax number).

The name and address of the author to whom correspondence is to be sent should be given.

- Page 2: Title of paper, in Spanish and in English. A 250-word summary in both Spanish and English. A list of three or four key words in Spanish, Portuguese, and English should be included.
- Page 3 onward: As a rule full length papers should be divided into sections headed by a caption: Introduction, Materials and Methods Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgments, References, captions of figures, and caption of tables.

Full-length papers should not exceed eight pages. Text is to be typed with PC, on A4 paper, in double-spaced typing with at least 4 cm upper lower, and left margin. Typescripts should be submitted in triplicate. Besides the 3 printouts of the manuscript, authors are requested to submit the paper on diskette (3 1/2") made in one of the next word processing systems: Word for MS-DOS; WORD for MACINTOSH; WORD PERFECT for DOS indicating the program and version used. Revised versions of the paper, because of referee's recommendations, should always be accompanied by a new diskette and 3 printouts of the manuscript. Short communications should adhere to a similar format. However short communications should contain no section headings. No Spanish summary is required but text is supposed to contain, in a concise way, every information relevant to the above mentioned headings (Introduction, Materials and Methods, etc.) Short communications should not exceed three pages.

Review papers, updatings, and reports on research in progress should be as concise as can be. Such articles should not exceed three pages. Their wording should address a scientifically educated readership that, however, can be unfamiliar with topics involved. Review papers, updatings, and reports on research in progress previously requested to authors by the Editorial Board will be privileged.

Book reviews should have been requested to authors by the Editor. Authors should sustain their contention on the book submitted to their attention. Besides, authors of any book review should submit the following information: Title of the book in its original language, full names of authors or editors of the book, edition number of the book, translator's name if any, publisher's full name, city, volume number if any, number of pages, and publishing year.

The full name and academic or professional affiliation of the author of any book review should be stated clearly. No book review should exceed two pages.

Technical communications should refer exclusively to modifications in scientific methods, determinations of errors committed in scientific methods, etc. Technical communications should not exceed two pages. At the end of a communication, authors' full name and particulars should be clearly stated.

Letters to the Editor should not exceed 200 words: Letters are a scientific correspondence referred to previously published manuscripts. Author or authors of a letter to the Editor should be clearly identified. When submitting a full-length paper, authors should take the following recommendations into account:

- On the upper right angle of every page, the last name (surname) of author (or the first author) should be typed next to the corresponding paging number. Pages containing tables should also be paginated.
- When referring to chemicals, IUPAC standards should be preferred.
- Organisms should be denominated according to international standards. Gender and species should be stated unabridged. When using a computer word processor, authors should use italics. When using a typewriter, authors should underline.
- Illustrations (photographs, diagrams, etc.) should be made on top quality materials, the technique of which should allow illustrations to be reproduced without special treatments whatsoever. It is advisable that illustrations be the same size as an ATA page. As regards illustrations that must be reduced, authors should see to it that letters, figures, and/or any other element in illustration be bigger-sized on the original so that such letters, figures or elements be still clearly readable once illustration has been reduced. Illustrations should also be sent in triplicate (one original, and two copies).

On the reverse of illustration the following elements should be written with a soft lead pencil: Figure corresponding to illustration, last name (surname) of author (or first author). An arrow should point out the upper pan of illustration. Captions to illustration should be typed on a separate sheet.

Authors should be aware that any extra charge caused by the printing of illustrations will be levied for each illustration.

- Tables and captions thereof should be submitted on separate sheets. Each page should be paginated with Arabic numerals, according to the order in which tables appear in article.
- Literature references in the text should be given at the appropriate places by numbers between brackets. For example: "Isoenzymes separation was performed by electrophoresis according to a technique developed by Dietz and Lubrano (4)". When referring to an article written by more than one author, the last name (surname) of the first author will be followed by "et al." For example: "Castañé et al. (5) have been the first researchers in..."
- Literature references should be listed under the heading "References". References should be arranged according to the numbers given to citations in the text of article. Format of references is as follows:
 - A paper published in a journal: Malla Reddy P. and M. Bashamohideen (1989) Fenvalerate and cypermethrin induced changes in the haematological parameters of *Cyprinus carpio*. *Acta Hydrochim. Hydrobio.* 17 (1), 101-107.
 - A book: Dix H.M. (1981) Environmental pollution. John Wiley & Sons, New York, p. 286.

A bridged name of journals should be the abridged name that a journal uses.

- Any exceptional modifications to the above mentioned instructions that authors should request will be submitted to the attention of the Editor.

Proofs will be sent to author whose address has been stated in paper. Author should review proof and airmail proof back to the Editor as soon as possible (within 48 hours of receiving proof, in the Argentine Republic).

Author, or first author will receive 10 offprints at no charge.

Should author or authors request extra offprints, a charge will be levied.

Author, or authors should state the number of extra offprints they wish to receive when they send back the reviewed proof to the Editor. Any correspondence referred to ATA should be sent to:

Acta Toxicológica Argentina - Comité Editorial - Alsina 1441, Of. 302 (1088) Buenos Aires - Argentina.
Telefax ++54-11-4381-6919.

Exchange is kindly requested with journals the scope and purpose thereof are akin to the scope and purpose of **Acta Toxicológica Argentina**.

Acta Toxicológica Argentina

Instruções para os autores de contribuições para a revista.

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.), (ISSN. 153279286) é o órgão especial de difusão científica da Associação de trabalhos originais, livros, comunicações, actualizações ou revisões, tema de divulgação, comentários bibliográficos, notas técnicas e cartas ao editor. Igualmente serão publicadas notícias relacionadas com diferentes campos da Toxicologia.

Acta Toxicológica Argentina publicará contribuições em espanhol, português e inglês. Todas serão avaliadas por dois revisores; a seleção deles será atribuição exclusiva do Comité Editorial. Este processo determinará que o mencionado Comité opte por eliminar, aceitar com alterações ou aceitar para publicação o trabalho submetido para sua consideração. Em todos os casos os autores receberão cópia sem assinatura da opinião dos avaliadores.

As contribuições científicas originais enviadas à consideração da ATA deverão ajustar-se à seguinte estrutura básica:

- página 1: título, subtítulo nomes completos do ou dos autores, laboratório ou instituição onde se realizou o trabalho; endereço postal completo, incluindo código postal, telefone e fax; autor ao qual toda a correspondência deverá ser dirigida.
- página 2: título do trabalho em espanhol e em inglês; resumos de até 250 palavras, em espanhol e em inglês. três, quatro palavras-chaves em espanhol, português e em inglês.
- página 3 em seguida:
Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão, Bibliografia indicada, Títulos de Ilustrações e Quadros com legendas. A extensão máxima destes aportes não deverá superar 8 (oito) páginas. O texto deverá ser escrito com PC em papel tamanho A4 com espaço duplo, com margens superior, inferior e esquerda de 4 cm. Deverão ser enviados 3 jogos.

Junto com as cópias do manuscrito, os autores deverão enviar uma versão em disquete (de 3 1/2"), em um dos seguintes processadores de texto: WORD for MS-DOS, WORD for MACINTOSH, WORD PERFECT for MS-DOS. Caso os revisores recomendem revisão do trabalho, a nova versão também deverá ser acompanhada de uma cópia em disquete e 3 jogos do texto em papel.

As comunicações breves deverão respeitar um formato semelhante ao indicado para as contribuições científicas excetuando o resumo em espanhol. O texto não necessariamente será dividido nas partes indicadas (Introdução, Material e Métodos, etc.); não obstante, deverá conter em forma concisa a informação que corresponde a estas partes. A extensão desta categoria de aportes não deverá superar 3 (três) páginas.

As revisões, actualizações e temas de divulgação deverão ser o mais conciso possível e sua extensão não excederá de 6 (seis) páginas. Sua redação deverá contemplar leitores com formação científica, porém, estranhos ao tema.

Considerar-se-ão preferentemente as revisões solicitadas pelo Comité Editorial.

Os comentários bibliográficos serão contribuições solicitadas pelo Diretor.

O autor deverá emitir uma opinião fundamentada sobre o trabalho submetido à sua consideração. Além disso, deverá incluir a seguinte informação: título em idioma original, autores, edição considerada, tradutor, editorial e respectivo lugar, o livro ou volume, número de páginas e ano da edição. Será claramente indicado o nome do comentarista, instituição à qual pertence e endereço completo. O texto não poderá ocupar mais que 2 (duas) páginas.

As notas técnicas referir-se-ão exclusivamente a modificações de métodos, determinação dos respectivos erros etc. Sua extensão não ultrapassará 2 (duas) páginas; ao final deverão constar os dados que identifiquem claramente os autores.

As cartas do editor serão textos de extensão não superior a 200

palavras e terão o caráter de correspondência científica relacionada com textos publicados anteriormente. Autor ou autores serão devidamente indicados.

Solicita-se aos autores que tenham em conta as seguintes normas ao prepararem seus manuscritos:

- em todos os casos dever-se-á consignar no ângulo superior direito de cada folha o sobrenome do autor ou do primeiro autor e o número correlativo que corresponde, inclusive as páginas com quadros.
- no caso de substâncias químicas, se adotará como referencia prioritária as normas da IUPAC.
- os organismos serão denominados segundo as normas internacionais, indicando sem abreviaturas o gênero e a espécie em itálico ou sublinhados.
- as ilustrações (fotografias, gráficos) devem ser confeccionadas com materiais de alta qualidade, com técnicas que possibilitem sua reprodução sem tratamentos especiais. É aconselhável que este material tenha as dimensões de Acta Toxicológica Argentina; os autores devem ter em conta que, nos casos de ilustrações nas quais seja necessário proceder a sua redução, o tamanho das letras, números e outros elementos devem ter dimensões maiores para que a nitidez não seja afetada depois da impressão.
- Serão enviados um jogo de originais e duas cópias. Cada uma das ilustrações deverá levar no verso, escrito com lápis suave, o número que lhe corresponda, nome do primeiro autor e mediante uma seta será indicada a posição superior. Os títulos irão em folha separada.
- Os custos adicionais que possam produzir-se pela edição do referido material ficarão a cargo do autor.
- os quadros e suas legendas serão apresentados em forma individual, em folhas separadas, identificadas segundo numeração arábica, segundo a ordem em que apareçam no texto. A localização preferida do quadro no texto será indicada mediante uma seta. Os quadros localizar-se-ão no final de cada manuscrito.
- as referências bibliográficas serão indicadas por números correlativos segundo se apresentem no texto: por exemplo, "A separação das isoenzimas foi feita por electroforese de acordo com a técnica de Dietz e Lubrano (4)". No caso de mencionar artigos de mais de dois autores, será indicado o sobrenome do primeiro seguido da expressão e ou: "Castañé e ou (5) foram os primeiros em ..."
- as referências bibliográficas serão agrupadas segundo o título "Bibliografia citada"; a lista será organizada segundo os números correspondentes. O formato das citações é o seguinte:
Artigo em publicação periódica:
"Malla Reddy, P. and M. Bashamohideen (1989). Fenvalerate and ipermethrin induced changes in the haematological parameters of Cyprinus carpio. Acta Hydrochim. Hydrobio. 17(1), 101-107".
livro: "Dix, H.M. (1981), Environmental pollution. John Wiley & Sons, New York, 286 pp."
As abreviações do nome das revistas serão as que el as mesmas indiquem no texto.
- qualquer modificação excepcional das normas estipuladas que os autores solicitem será considerada pelo Diretor.
- as provas de impressão serão enviadas ao autor indicado como receptor da correspondência.
- As mesmas serão revistas e devolvidas dentro de 48 horas após recebidas.
- o autor indicado receberá 10 separatas sem despesa. O excedente solicitado sobre essa quantidade será custeado por ele ou demais autores; a quantidade solicitada deverá ser comunicada ao Editor no momento de devolver as provas de impressão.

Toda a correspondência relativa à **Acta Toxicológica Argentina** deverá ser dirigida ao Comité Editorial, Alsina 1441, Of. 302 - (1088) Buenos Aires, Argentina. Telefax: ++54-11-4381-6919. Solicita-se troca com outras publicações tematicamente afins com a **Acta Toxicológica Argentina**.