

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 29
N° 2
Septiembre 2021

Acta Toxicológica Argentina es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina.

Tiene por objetivo la publicación de trabajos relacionados con las diferentes áreas de la Toxicología, en formato de artículos originales, reportes de casos, comunicaciones breves, actualizaciones o revisiones, artículos de divulgación, notas técnicas, resúmenes de tesis, imágenes, cartas al editor y noticias.

Integra el Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas y se puede acceder a sus artículos a texto completo a través del Portal de Revistas Científicas y Técnicas argentinas (PPCT) y a través de la Scientific Electronic Library Online (SciELO) Argentina.

Se encuentra indexada en los siguientes directorios

Biblioteca Virtual en Salud
Chemical Abstract Service
Directory of Open Access Journals
Directory of Open Access Resources
Latindex



Asociación Toxicológica Argentina

Asociación civil (Personería Jurídica N° 331/90)

Adherida a la IUTOX

Asociación Toxicológica Argentina

Comisión directiva

Presidente

Sergio A. Saracco

Vicepresidente

Silvia Cortese

Secretaria

Horacio Trapassi

Tesorera

Jorge Zavatti

Vocales

Julieta Soledad Borello

Fernanda Simoniello

Patricia Lucero

Vocales suplentes

Ignacio Gallo

Gabriela Fiorenza

Alicia Loteste

Comité científico

Ricardo Fernández

Edda Villamil Lepori

Valentina Olmos

Susana García

Adriana Silvia Ridolfi

Tribunal de honor

José A. Castro

Marta Carballo

Elda Cargel

Acta Toxicológica Argentina

Director

Adolfo R. de Roodt, *Instituto Nacional de Producción de Biológicos, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán", Ministerio de Salud; Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Comité de redacción

Ricardo A. Fernández, *Hospital Infantil Municipal, Facultad de Medicina, Universidad Católica de Córdoba.*

Susana I. García, *Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires, Sociedad Iberoamericana de Salud Ambiental.*

Adriana S. Ridolfi, *Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

Aldo S. Saracco, *Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Mendoza; Ministerio de Salud del Gobierno de Mendoza, Mendoza.*

Edda C. Villaamil Lepori, *Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

Comité de apoyo

Julieta Borello, *Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba, Córdoba.*

Laura C. Lanari, *INPB-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".*

Rodrigo D. Laskowicz, *INPB-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".*

Patricia Lucero, *Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba, Córdoba.*

Julio A. Navoni, *Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil.*

Comité editorial

Alejandro Alagón, *Universidad Autónoma de México, México.*

Arturo Anadón Navarro, *Universidad Complutense de Madrid, España.*

José A. Castro, *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.*

Elizabeth de Souza Nascimento, *Universidade de Sao Paulo, Brasil*

Jean-Philippe Chippaux, *Institut de Recherchepour le Développement; Institut Pasteur de Paris, Francia.*

Fernando Díaz Barriga, *Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México*

Heraldo Nelson Donnenwald, *Universidad Favaloro, Argentina.*

Gina E. D'Suze García, *Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela.*

Ana María A. Ferrer Dufol, *Universidad de Zaragoza, España.*

Veniero Gambaro, *Università di Milano, Italia.*

Carmen Jurado, *Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses de Sevilla, España.*

Amalia Laborde, *Universidad de la República, Uruguay.*

Bruno Lomonte, *Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica.*

María A. Martínez Caballero, *Universidad Complutense de Madrid, España.*

Nelly Mañay, *Universidad de la República, Uruguay.*

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

Bernardo Rafael Moya, *Centro de Información en Medicamentos y Toxicología, Angola.*

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

Haydée N. Pizarro, *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.*

Andrea S. Randi, *Universidad de Buenos Aires, Argentina.*

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

María M. Salseduc, *Academia de Farmacia y Bioquímica, Argentina.*

Carlos Sèvcik, *Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela.*

Francisco O. de Siqueira França, *Universidad de Sao Paulo, Brasil.*

Miguel Ángel Sogorb Sánchez, *Universidad Miguel Hernández, España.*

Norma Vallejo, *Universidad de Buenos Aires, Argentina.*

Eugenio Vilanova Gisbert, *Universidad Miguel Hernández, España.*

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

Eduardo N. Zerba, *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.*

INDICE

(CONTENTS)

Artículos Originales

El consumo semicrónico moderado de alcohol altera la foliculogénesis y la calidad núcleo-citoplasmática oocitaria, en el ratón.
Gualdoni, Gisela Soledad; Barril, Camila; Jacobo, Patricia; Cebra, Elisa 51

The use of histological parameters to assess intestinal and liver health on broilers challenged isolatedly and simultaneously with cyclopiazonic acid and aflatoxin B1
Domingues, Jéssica M.; Schreiner Spiassi, Bárbara; Sanches, Adrien W.D.; Belote, Bruna L.; Santin, Elizabeth; Wagner, Ricardo 67

Revisión

Venenos animais como possíveis ferramentas terapêuticas contra o estresse oxidativo em diversas doenças: Revisão da Literatura.
Silva, Maisa; Lima Marçal, Fernanda; de Matos, Ione Maria 77

Artículo Especial

Los acúfenos de Miguel Ángel y su relacion con la toxicología.
Werner, Antonio; Scarlato, Eduardo 90

Instrucciones para los autores 101

Los resúmenes de los artículos publicados en Acta Toxicológica Argentina se pueden consultar en la base de datos LILACS, en la dirección literatura científica del sitio www.bireme.br

Acta Toxicológica Argentina está indexada en el Chemical Abstracts. La abreviatura establecida por dicha publicación para esta revista es Acta Toxicol. Argent.

Calificada como Publicación Científica Nivel 1 por el Centro Argentino de Información Científica y Tecnológica (CAICYT), en el marco del Proyecto Latindex

ARTÍCULOS ORIGINALES

El consumo semicrónico moderado de alcohol altera la foliculogénesis y la calidad núcleo-citoplasmática oocitaria, en el ratón. Moderate semi-chronic alcohol consumption alters folliculogenesis and oocyte nuclear-cytoplasmic quality in mice.

Gualdoni, Gisela Soledad; Barril, Camila; Jacobo, Patricia; Cebal, Elisa*.

Laboratorio de Reproducción y Fisiología Materno-Embrionaria (LARFIMAE), Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y aplicada (IBBEA-CONICET/UBA), Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN), Universidad de Buenos Aires (UBA). Intendente Guiraldes 2160, Ciudad Universitaria, CABA. Buenos Aires, Argentina.

*cebral@hotmail.com; cebral@bg.fcen.uba.ar

Recibido: 22 de julio de 2021

Aceptado: 9 de septiembre de 2021

Resumen. El consumo crónico de alcohol es un problema de salud mundial que afecta particularmente a la población femenina. Sin embargo, los efectos de la ingesta semicrónica en cantidades moderadas a bajas en el ovario y el oocito son poco conocidos. En un modelo murino, se administró etanol al 10% en agua de bebida (hembras tratadas) o agua (hembras control) por 15 días, y luego de la superovulación o no (ovulación espontánea), se analizó el ciclo estral y la calidad ovárico-gamética. En las hembras tratadas, la frecuencia y duración del diestro aumentó, y las frecuencias de folículos y cuerpos lúteos disminuyeron vs hembras controles, valores que se restauraron luego de la superovulación. Sin embargo, en las hembras tratadas, la tasa de proliferación celular folicular y el desbalance de la expresión ovárica de VEGF (factor de crecimiento endotelial) persistieron luego de la superovulación. El número de ovocitos ovulados con metafase II anormal, fragmentados y activados partenogenéticamente fue mayor en las hembras tratadas respecto las controles. En conclusión, el consumo semicrónico moderado de alcohol produce anestro, ciclo estral irregular, foliculogénesis deficiente y anomalías núcleo-citoplasmáticas en los oocitos ovulados. Estas alteraciones podrían constituirse en un factor etiológico de pérdida gestacional temprana y desarrollo embrionario anormal luego del consumo de alcohol.

Palabras clave: Ovario; Oocito; Alcohol; Modelo experimental.

Abstract. Chronic alcohol consumption is a global health problem that particularly affects the female population. However, the effects of semi-chronic ethanol intake in low-moderate amounts on the ovary and oocyte are poorly understood. In a mouse model, 10% ethanol was administered in drinking water (treated females) or water (control females) for 15 days, and after superovulation or not (spontaneous ovulation), the estrous cycle and ovarian-gametic quality were analyzed. In treated females, the frequency and duration of the diestrus increased, and the frequencies of follicles and *corpus luteum* decreased vs control females, values that restored after superovulation. However, in treated females, the follicular cell proliferation rate and the imbalance in ovarian expression of VEGF (endothelial growth factor) persisted after superovulation. The number of ovulated oocytes with abnormal metaphase II, fragmented and parthenogenetically activated was higher in treated females than in control ones. In conclusion, moderate semi-chronic alcohol consumption produces anestrus, irregular estrous cycle, poor folliculogenesis, and nuclear-cytoplasmic abnormalities in ovulated oocytes. These alterations could constitute an etiological factor of early gestational loss and abnormal embryonic development after alcohol consumption.

Key words: Ovary; Oocyte; Alcohol; Experimental model.

Introducción

El consumo de alcohol constituye un grave problema de salud pública. La ingesta crónica fuerte de alcohol produce más de 200 enfermedades y lesiones, como enfermedades de transmisión sexual y no transmisibles (cardiopatías, neuropatías, diabetes, numerosos cánceres) (OMS 2014), incluyendo las patologías reproductivas (Canteros *et al.* 1995; Cebal *et al.* 1997; Cebal *et al.* 1998a;

Cebal *et al.* 1998b; Cebal *et al.* 2011; Lee *et al.* 2010; Angelis *et al.* 2020).

Los efectos del consumo de alcohol sobre la función femenina son muy diversos, dependiendo de la ruta de administración, la dosis de etanol, el tiempo, la frecuencia y período de exposición y las variables individuales (peso, edad, sexo, genética). En la mujer el consumo crónico de alcohol

interrumpe el ciclo menstrual, produce hiperprolactinemia, amenorrea, anovulación, disfunción de la fase lútea y patología ovárica (Schliep *et al.* 2015; Anwar *et al.* 2021). Se propuso que estas alteraciones son debidas a los efectos primarios del etanol sobre el eje hipotálamo-hipofisario, y/o a las acciones directas sobre el ovario a nivel folicular y esteroidogénesis (Mendelson y Mello 1988; Cebral *et al.* 1998a; Kline *et al.* 2016; Angelis *et al.* 2020). Previamente observamos, en ratas hembras inyectadas con etanol, una inhibición hipotalámica de LHRH (enzima liberadora de hormona luteinizante) en rata hembra (Canteros *et al.* 1995), lo que correlacionó con la restricción de la liberación de hormona luteinizante (LH) (Lapaglia *et al.* 1997) y alteraciones en la liberación de FSH (hormona folículo estimulante) (Cruz *et al.* 2014). El consumo y abuso prolongado de alcohol impacta directamente sobre la fisiología ovárica (Dees *et al.* 2000; Brett y Cooper 2003; Kinney *et al.* 2006). Hakim *et al.* (1998) informaron que la tasa de concepción se redujo un 50% en un ciclo menstrual durante el cual las pacientes habían consumido alcohol (1-90 g por semana). El consumo de alcohol tanto moderado-alto (2 o más tragos por día) / aumenta significativamente el riesgo de infertilidad ovulatoria (Grodstein *et al.* 1994), disminuye el volumen ovárico, el número de folículos antrales, aumenta de la aparición de anomalías en el flujo menstrual y altera los niveles de FSH en sangre (Li *et al.* 2013). Sin embargo, aún son poco conocidos los efectos de la ingesta corta, semicrónica, de alcohol sobre la foliculogénesis y desarrollo luteal. En particular, estudios a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario luego de la exposición crónica a alcohol durante la adolescencia sugirieron la interferencia del etanol con el funcionamiento de sistemas intraováricos relacionados con factores de crecimiento y angiogénicos, tales como el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) y el óxido nítrico (NO) (incremento) (Dees *et al.* 2001). Sin embargo, defectos en la expresión de otros factores angiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial (VEGF) en el ovario, luego del consumo de alcohol, no han sido abordados previamente.

El desarrollo vascular del ovario es fundamental para garantizar el aporte de nutrientes, gonadotrofinas, factores de crecimiento, oxígeno y precursores de esteroides, entre otras sustancias, necesarios para promover el crecimiento folicular y la formación del cuerpo lúteo (Stouffer *et al.* 2001; Li *et al.* 2020). Uno de los más importantes factores reguladores de la angiogénesis ovárica y del desarrollo del folículo y el cuerpo lúteo es

el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Hoeben *et al.* 2004; Tamanini y De Ambrogi 2004; Abramovich *et al.* 2009). La familia VEGF comprende siete miembros (Neufeld *et al.* 1999), pero el VEGF-A juega el rol más relevante en la regulación de la angiogénesis en el ovario (McFee y Cupp 2013) actuando vía sus receptores (VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR/Flk-1 y VEGFR-3/Flt-4) (Ortega *et al.* 1999), principalmente por KDR. VEGF media casi todas las respuestas celulares conocidas (proliferación, migración, supervivencia, aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación y reorganización del citoesqueleto en células endoteliales) (Kimura y Esumi 2003; Byrne *et al.* 2005; Caires *et al.* 2012). A su vez, VEGF es un agente antiapoptótico de células endoteliales (Gerber *et al.* 1998), y de células ováricas de ratón (Quintana *et al.* 2004). En ovarios murinos, VEGFA es expresado débilmente durante el desarrollo folicular temprano mientras que su expresión se incrementa en las células de la granulosa y en la teca durante la foliculogénesis (Barboni *et al.* 2000; Celik-Ozenci *et al.* 2003; Greenaway *et al.* 2004). Los niveles de VEGF en el folículo y oocito son finamente regulados (McFee *et al.* 2009). Diversos estímulos, tales LH, FSH, citoquinas, ésteres de forbol, oncogenes, metales de transición, quelantes de hierro, NO e hipoxia modulan la expresión de VEGF (Christenson y Stouffer 1997; Jozkowicz *et al.* 2001; Li *et al.* 2020). Hasta la fecha, los efectos de la exposición de corta duración a alcohol, sobre la expresión de VEGF en el ovario y la relación con el desarrollo/calidad folicular, no fueron abordados.

Junto con los efectos directos de la exposición a alcohol sobre la función ovárica, resulta probable una acción adversa del etanol sobre el desarrollo y calidad oocitaria. El estudio morfológico de la gameta femenina, reflejo de su desarrollo génico-nuclear y citoplasmático (Cebral 2016), luego de la ingesta de alcohol, es imprescindible como pronóstico del desarrollo del embrión. Diversas anomalías oocitarias han correlacionado negativamente con la calidad embrionaria (Ebner *et al.* 2002; Gualdoni *et al.* 2021a) y alta tasa de aborto temprano (Kahraman *et al.* 2000). La exposición directa (*in vitro*) de los oocitos a diferentes concentraciones de etanol indujo anomalías cromosómicas (aneuploidías) (Shiina *et al.* 1993; Kaufman 1997), mientras que nosotros demostramos que la ingesta crónica-prolongada de concentraciones moderadas a bajas, causa partenogénesis espontánea en los oocitos (Cebral *et al.* 1997; Cebral *et al.* 1998a; Cebral *et al.* 1998b).

Dados los antecedentes mencionados, los ob-

jetivos del presente trabajo fueron analizar los efectos de la ingesta semi-crónica moderada de alcohol sobre el ciclo estral, el desarrollo folicular y formación del cuerpo lúteo y la expresión de VEGF ovárica, y la calidad morfológica-nuclear oocitaria en un modelo murino exocriado con ovulación espontánea e inducida.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron ratones hembras de la colonia CF-1 adultas (60 días, $28,5 \pm 1,2$ g), provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN) de la Universidad de Buenos Aires (UBA), las que se mantuvieron en grupos de 2 a 3 por jaula, en condiciones controladas de luz y temperatura (25°C , 14-10 hs luz/oscuridad) y alimentados *ad libitum* con alimento comercial balanceado y agua corriente. Se utilizó un mínimo de 5 hembras para cada grupo experimental.

Diseño experimental

Los experimentos se desarrollaron siguiendo la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) (publicación NIH 80-23 / 96) y del Comité Institucional de Ética en Uso y Cuidado Animal (CICUAL, protocolo n° 0057) de FCEN-UBA.

Las hembras murinas se trataron con etanol al 10 % m/v en el agua de bebida (hembras tratadas; HT) o agua sin etanol (hembras controles; HC) por 17 días. En ambos grupos, se analizó la ciclicidad diariamente. Al día 15 del tratamiento, un grupo de HC y HT se superovuló con inyección i.p. de 5 UI de eCG/hembra (Novormon, Syntex SA, Argentina) (13:00 h), y 48 h después con 5 UI de hCG (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.). Finalizado el periodo de tratamiento, las hembras controles y tratadas, superovuladas o no, se sacrificaron por dislocación cervical y se disecaron los ovarios, los oviductos y los oocitos.

Análisis del ciclo estral

Se determinó la regularidad del ciclo estral y la frecuencia del estro diariamente durante el período de tratamiento. Se extrajeron muestras de frotis de la mucosa vaginal (microscopía a 10x), y se calculó la proporción relativa de los tipos de células epiteliales y de leucocitos, para establecer el estado del ciclo estral (Caligioni 2010). Se calculó la frecuencia promedio de cada estado del ciclo en 15 días de tratamiento, la duración promedio de cada estado (en días), el porcentaje de hembras con alteraciones de la ciclicidad. Para esto último se consideró ciclo estral altera-

do o irregular siempre que un mismo estado se presentara más de tres días consecutivos en el mismo animal.

Recolección de oocitos

Luego de la superovulación, a las 16 hs post-hCG, en todos los grupos experimentales, se disecaron los oviductos en medio Krebs-Ringer (KRB) para extraer los complejos cúmulos-oocitarios (COCs) por punción de la ampolla oviductal. Luego, las células de la granulosa de los COCs se dispersaron por breve incubación en hialuronidasa 0,1 %/KRB (Sigma-Aldrich) (Cebral *et al.* 1998a; Cebral *et al.* 1998b; Cebral *et al.* 2011). Posteriormente a lavados en KRB, los oocitos se recolectaron con solución de Krebs adicionado de albúmina sérica bovina (BSA) 0,3 %/PBS para ser evaluados en microscopio invertido con contraste de fase (*Labomed*). Luego del recuento del total y los tipos morfológicos, los oocitos se fijaron en paraformaldehído (PF) 2 %/PBS, por 10 minutos incubaron con Hoechst 33342 (0,5 mg/ml, Sigma-Aldrich) y lavados en PBS, para finalmente observarse la morfología nuclear bajo microscopio de fluorescencia *Carl Zeiss* equipado con cámara de video y programa para captura de imágenes.

Análisis morfológico externo y nuclear oocitario

Para el análisis de la calidad morfológica, citoplasmática y nuclear, de los oocitos se siguieron los criterios de clasificación previamente establecidos (Cebral 1998a; Cebral *et al.* 1998b; Cebral *et al.* 2011), basados en el aspecto del citoplasma del oocito, la apariencia de la zona pelúcida, el espacio perivitelino en relación con la ubicación del oocito, la presencia o no de fragmentos, la presencia del primero y/o segundo cuerpo polar. Brevemente, su clasificación morfológica externa fue: a) *oocitos intactos: morfológicamente normales*, con o sin primer cuerpo polar (I CP), con zona pelúcida (ZP) intacta, homogénea y lisa, oolema regular y un ooplasma homogéneo; b) *oocitos fragmentados o necróticos*: con vacuolización, fragmentos en espacio perivitelino (EPV), citoplasma fragmentado y/o con lisis citoplasmática; c) *oocitos activados partenogénicamente*: con segundo cuerpo polar (II CP) o 2-células (clivaje inmediato); d) *oocitos inmaduros*: con ZP rugosa y cubierta de células de la granulosa adheridas. Los tipos de oocitarios según criterio morfológico núcleo-cromatínico (microscopio de fluorescencia), fue definida como sigue: a) *oocitos intactos con metafase II normal (MII)* (cromosomas condensados alineados en el ecuador del huso meiótico en la periferia del oocito), con o sin I

CP; b) oocitos intactos con metafase II anormal: presencia de cromatina dispersa en el oolema o lindante a la placa metafásica; c) oocitos activados partenogenéticamente, incluyendo: c.1) oocitos sin metafase II (ausencia de cromatina condensada), c.2) oocitos activados sin II CP (en anafase/telofase II) y oocitos con un pronúcleo (1 PN) o 2 PN (periféricos o central) (diploidizados), c.3) oocitos activados con II CP: en telofase II (cromatina condensada en periferia del citoplasma) o con 1 PN, c.4) oocitos de activación inmediata (2-células de clivaje inmediato).

En base al recuento de cada tipo de oocito se calculó la frecuencia respecto del total analizado en al menos 5 hembras / grupo.

Histología e histopatología ovárica

Al día 17 de tratamiento, los ovarios extraídos de HC y HT con ovulación espontánea, en estado de estro o hembras superovuladas (16 hs post-hCG), se fijaron en PF 4% por 24 hs, se lavaron en PBS y deshidrataron en alcoholes (70 %, 80 %, 90 %, 10-20 minutos cada uno, y 2 pasajes de 100 %, 15 minutos cada uno) y en xilol, y luego se incluyeron en parafina ("Paraplast") a 60°C por 30 minutos cada baño. De los tacos obtenidos se realizaron cortes a 7 µm de espesor, seriados longitudinales al eje mayor del órgano, para luego ser teñidos con hematoxilina-eosina. Finalmente, los cortes fueron deshidratados por pasajes en alcohol y xilol, y montados con líquido de montaje DPX (Sigma-Aldrich). Se cuantificaron los folículos (primarios; preantrales; antrales y anormales/atrésicos) y cuerpos lúteos en microscopio óptico convencional. Se calculó el promedio del número de folículos de cada categoría/hembra y el

promedio de cuerpos lúteos/hembra para cada grupo experimental. La comparación entre grupos experimentales de los datos obtenidos se realizó comparando los datos de ovarios de hembras en la misma fase del ciclo estral.

Inmunohistoquímica

En cortes de parafina de los ovarios extraídos de HC y HT superovuladas o no (en estro), se determinó la tasa de proliferación de las células de la granulosa por inmunohistoquímica contra PCNA (proliferating cell nuclear antigen), y la inmunopresión ovárica de VEGF empleando protocolo previamente establecido en el laboratorio (Gualdoni *et al.* 2021b). Las condiciones específicas empleadas se detallan en *Tabla I*. Brevemente, los cortes fueron hidratados e inhibidos (bloqueo de peroxidasas endógenas) por 30 min a 4°C. Luego de lavados con PBS, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión con sueros por 60 min a temperatura ambiente (TA). Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario específico contra la molécula de interés, overnight a 4°C en cámara húmeda. En todos los portaobjetos se efectuaron controles negativos por omisión del anticuerpo primario. Al día siguiente, los cortes se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente, por 60 min a TA. Luego, de lavados con PBS, se amplificó la señal por incubación con el complejo estreptoavidina-avidina-peroxidasa (HRP) por 60 min a TA. Los cortes fueron lavados y finalmente revelados con diaminobencidina (DAB) (DAB-kit, Cell Marque). Los cortes se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron con medio de montaje DPX.

Tabla I: Condiciones de inmunohistoquímica.

	PCNA	VEGF
<i>Inhibición de peroxidasa endógena</i>	H ₂ O ₂ 1% en metanol	H ₂ O ₂ 0,3% en metanol
<i>Bloqueo sitios inespecíficos</i>	SNH 1:40 en PBS	SNG 1:40 en PBS
<i>Ac primarios</i>	<i>Mouse anti-PCNA</i> (Abcam, Cambridge, UK) 1:25 en PBS-Tween20 al 0,05%	<i>Rabbit anti- VEGF</i> (Santa Cruz Biotech., Dallas, USA) 1:300 en SNG 1:40 en PBS
<i>Ac secundarios</i>	<i>Horse anti-mouse-B</i> (Vector Lab., Burlingame, USA) 1:100 en PBS	<i>Goat anti-rabbit-B</i> (Vector Lab.) 1:500 en SNG 1:40 en PBS
<i>Complejo amplificador</i>	HRP (Molecular Probes) 1:50 en PBS	HRP (Molecular Probes) 1:300 en PBS

Referencias: H₂O₂: agua oxigenada; SNH: suero normal de caballo (*horse*); SNG: suero normal de cabra (*goat*); PBS: bufer fosfato-salino (*phosphate saline buffer*); Ac: anticuerpo; B: biotinilado; HRP: complejo estreptoavidina-avidina-peroxidasa.

Análisis de imágenes

En imágenes de microscopía (*Carl Zeiss*) a 40x se determinó el índice de proliferación de células de la granulosa cuantificando el número de células PCNA+ / tipo folículo en el total de ovarios analizados para las HC y HT en el grupo no inducido y superovulado. Para el análisis de la inmunexpresión de VEGF en cortes de los ovarios, se observó la localización, la distribución y la intensidad relativa de la marca en los folículos, cuerpos lúteos y en la zona medular, en todos los grupos experimentales respecto de los controles.

Análisis estadístico

Los valores expresados como promedios \pm DE (desvío estándar) fueron comparados contra el control mediante la prueba *t* de Student. Los resultados expresados en proporciones o frecuencias (%) fueron analizados con la prueba de Fisher. Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico *GraphPad Instat software Inc. v2.05a* e *Infostat*. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Efecto de la ingesta semi-crónica de alcohol en el ciclo estral

Se evaluaron probables diferencias en la frecuencia y duración de cada estado del ciclo estral durante el tratamiento en las HC y HT (*Tabla II*). El número promedio de proestro, estro y metaestro disminuyó significativamente mientras que el de diestro fue significativamente mayor en las HT comparado con el control ($p < 0,001$; $p < 0,001$, $p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente). La duración (número promedio de días) del proestro, estro y metaestro en el grupo HT se redujo significativamente vs el grupo HC ($p < 0,001$; $p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente, *tabla II*). Por el contrario, la duración del diestro en las HT fue significativamente mayor con respecto a HC ($p < 0,001$). Al finalizar el periodo de tratamiento, la frecuencia de hembras tratadas que se encontraron en estado de diestro aumentó significativamente vs HC (77,7% vs 16% respectivamente, $p < 0,001$).

Calidad ovárica y desarrollo folicular luego del tratamiento con alcohol.

Efectos de la superovulación

Dadas las alteraciones en el ciclo estral de las hembras expuestas a etanol, se analizó la histopatología ovárica. Los ovarios extraídos de las HT que finalizaron el tratamiento en estro (ovulación espontánea), presentaron líquido intersticial (edema) y mayor vascularización en el área medular

Tabla II: Frecuencia y duración de los estados del ciclo en 15 días de tratamiento.

	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
Frecuencia de estados del ciclo				
HC	3,90 \pm 0,42	3,50 \pm 0,27	3,31 \pm 0,28	4,10 \pm 0,32
HT	1,55 \pm 0,21***	2,05 \pm 0,26***	2,40 \pm 0,36*	7,22 \pm 0,63***
Duración (días) de los estados del ciclo				
HC	1,76 \pm 0,12	1,36 \pm 0,10	1,32 \pm 0,10	1,47 \pm 0,08
HT	0,94 \pm 0,08***	1,07 \pm 0,08*	1,16 \pm 0,12***	2,56 \pm 0,27***

Se determinó el número y días de duración de cada estado del ciclo, durante 15 días de tratamiento con alcohol, en las hembras controles (HC) y tratadas (HT). Los resultados se expresaron como promedio y desvío estándar en un total de 16 hembras para cada grupo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. HC (Prueba *T* de Student).

comparando con los ovarios de HC (*Fig. 1B* vs *A*). El análisis cuantitativo de los tipos foliculares y cuerpos lúteos maduros mostró una reducción significativa del número de folículos primarios / preantrales, antrales y cuerpos lúteos en ovarios de HT vs HC ($p < 0,05$; $p < 0,05$; $p < 0,001$ respectivamente); mientras que el número de folículos atrésicos aumentó significativamente en HT respecto del HC ($p < 0,05$) (*Fig. 1E*).

Dado que la gran mayoría de las HT finalizaron el periodo de tratamiento en diestro, y que el número de folículos y de cuerpos lúteos se redujo, el objetivo fue determinar si un protocolo de superovulación podía restablecer la foliculogénesis y ovulación. En los cortes histológicos de ovarios de HT y HC superovuladas, se observó vascularización medular similar (*Fig. 1B* y *D*) mientras que el número de folículos y de cuerpos lúteos en ambos grupos experimentales no presentó diferencias significativas (*Fig. 1F*).

Un menor desarrollo folicular en los ovarios de las HT podría deberse a un déficit en la proliferación de las células de la granulosa, mientras que la superovulación restauraría dicho índice folicular. Se observó inmunomarcación PCNA-positiva en las células de la granulosa de folículos primarios, preantrales (dato no mostrado) y de folículos antrales de HC y HT con ovulación espontánea (en estro) y superovuladas (*Fig. 2A-D*). El número de células de la granulosa PCNA+ disminuyó significativamente en todos los tipos foliculares analizados en los ovarios de HT con ovulación espontánea comparando con los controles ($p < 0,001$) (*Fig. 2E*). Sin embargo, en las HT superovuladas, sólo los folículos antrales presentaron una disminución del número de células PCNA+ respecto de los

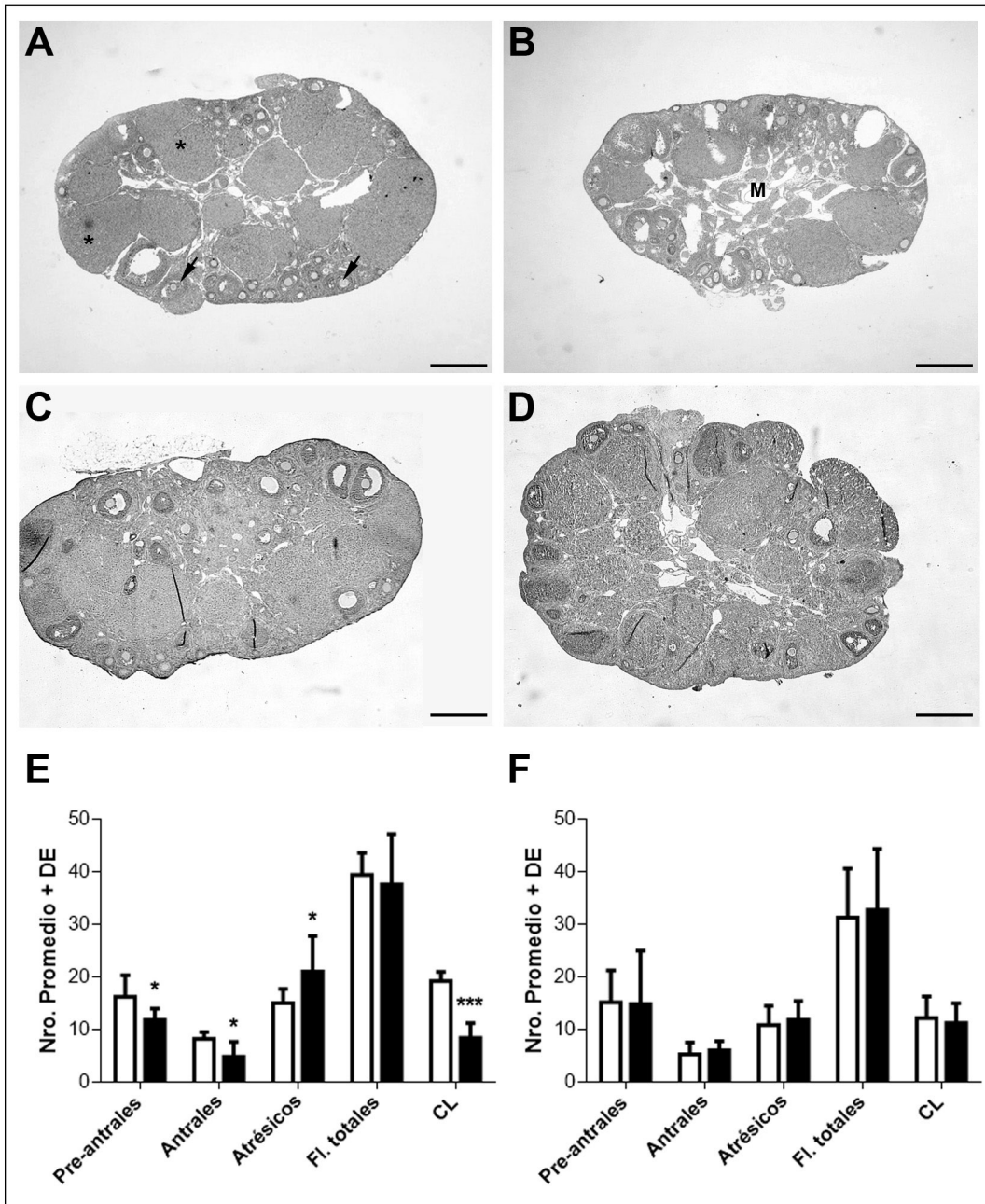


Figura 1. Calidad ovárica y desarrollo folicular luego del tratamiento semicrónico con alcohol. Efectos de la superovulación.

Micrografías representativas de ovarios (Hematoxilina-eosina) de hembras controles (HC) y tratadas (HT), con ovulación espontánea en estro (A, B) y superovuladas (C, D). Notar la menor cantidad de cuerpos lúteos (*), la mayor vascularización de la médula (M) ovárica y la escasa cantidad de folículos (flecha) de la corteza del ovario de las HT (B) respecto del ovario de las HC (A) con ovulación espontánea. Los ovarios de las HT superovuladas (C) presentan una histología similar a las HC (D). Aumento: 2,5x. E y F: promedio \pm desvío estándar (DE) de folículos primarios y preantrales, antrales, anormales/atrésicos, folículos (Fl.) totales y cuerpos lúteos (CL) en los ovarios de HC (barras blancas) y HT (barras negras) con ovulación espontánea (E) y superovuladas (F). (n=5 hembras para cada grupo). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. HC (Prueba *t* de Student).

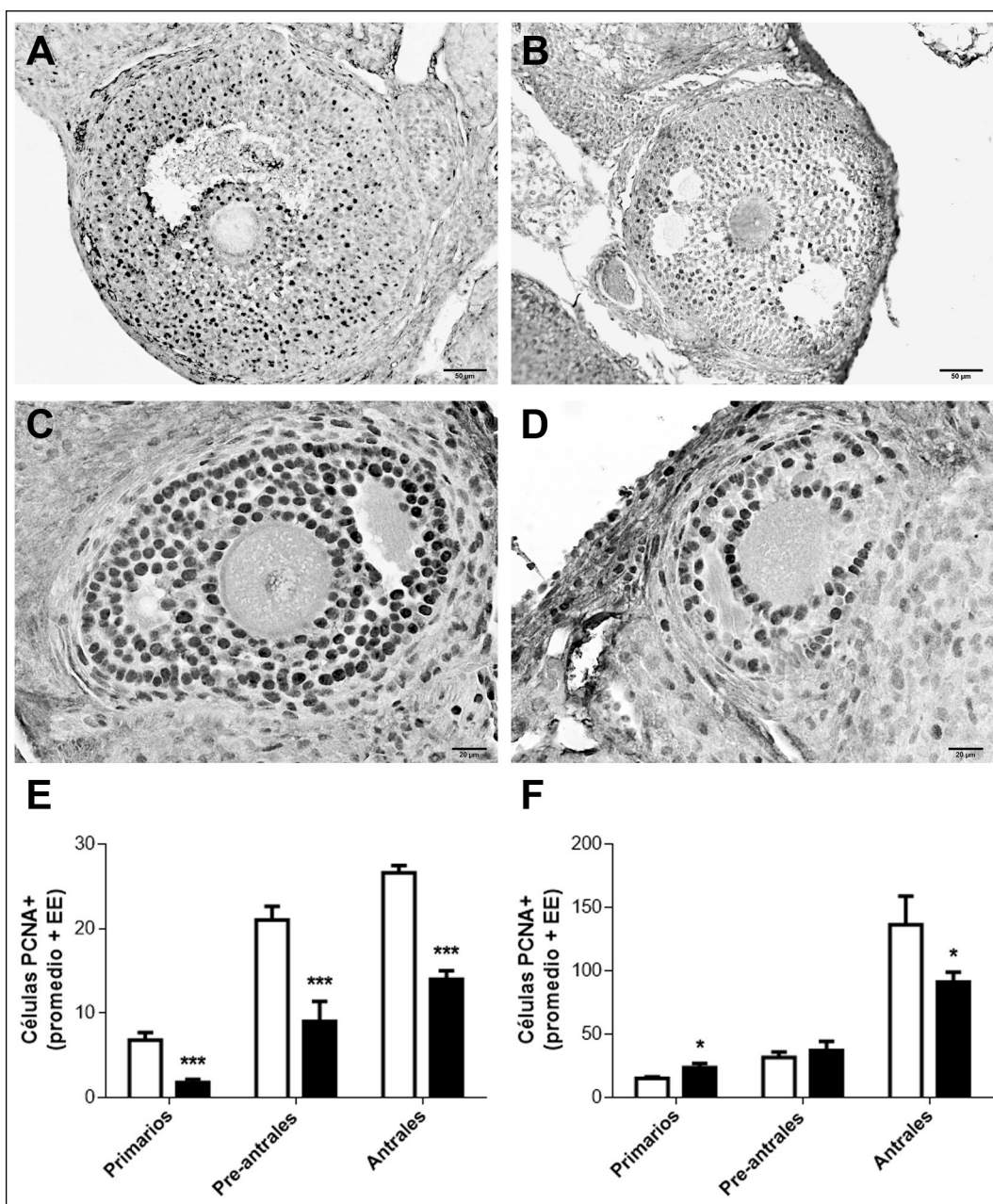


Figura 2. Índice de proliferación folicular luego de la ingesta semicrónica de alcohol.

Evaluación de la proliferación de las células de la granulosa por inmunohistoquímica contra PCNA, en ovarios de hembras controles (HC) y tratadas (HT), inducidas o no con hCG. Micrografías representativas de cortes de ovarios mostrando folículos antrales de hembras con ovulación espontánea (A, B) y superovuladas (C, D). Notar la menor inmunomarcación de células foliculares PCNA-positivas en los cortes de las HT no inducidas (B) e inducidas (D) versus controles (A, C, respectivamente). Aumento:40x. Cuantificación de células de la granulosa PCNA-positivas (+) en folículos primarios, preantrales y antrales de ovarios de HC (barras blancas) y HT (barras negras) no inducidos (E) e inducidos (F). Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar (EE) (n=5 hembras para cada grupo). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. HC (Prueba *t* de Student).

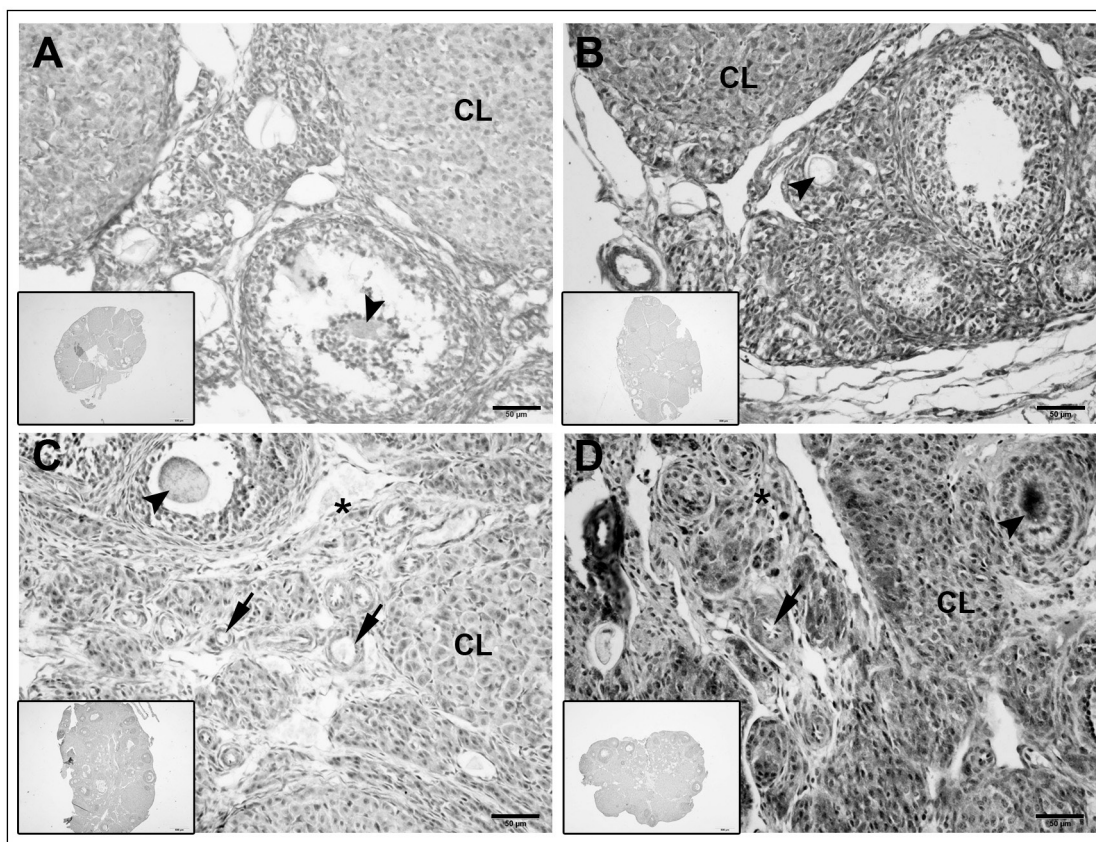


Figura 3. Inmunoexpresión de VEGF en hembras controles y tratadas con ovulación espontánea y superovuladas.

Microfotografías representativas de la inmunoexpresión de VEGF en cortes de ovarios de hembras controles (HC) y tratadas (HT) inducidas o no con hCG, mostrando folículos / oocitos (cabeza de flecha), cuerpos lúteos (CL), estroma medular (*) y vasos arteriales (flecha) de hembras con ovulación espontánea (A, B) y hembras superovuladas (C, D). Nótese la mayor inmunoreactividad de VEGF en las distintas estructuras ováricas de las HT no inducidas (B) e inducidas (D) versus sus controles (A, C, respectivamente). Aumento 40x. Inserto, control negativo de la inmunohistoquímica.

folículos de las HC ($p < 0,05$) (Fig. 2F). Niveles adecuados de expresión de VEGF son fundamentales para el desarrollo de una angiogénesis-vascularización ovárica y foliculogénesis normal, ya que VEGF es un fuerte promotor de la proliferación folicular y endotelial. VEGF se localizó en los folículos preantrales y antrales, cuerpos lúteos, estroma ovárico y vasos sanguíneos medulares de ovarios de HT y HC con ovulación espontánea o con superovulación (Fig. 3A-D). Sin embargo, la intensidad de la inmunomarcación fue mayor en los ovarios de las HT con ovulación espontánea y superovuladas (Fig. 3B y D) respecto sus controles (Fig. 3A y C).

Efectos de la ingesta semi-crónica de alcohol sobre la calidad oocitaria

Para analizar los efectos de la ingesta semicrónica

de alcohol sobre la calidad oocitaria, se indujo la ovulación con la aplicación de gonadotrofinas al cabo del tratamiento. En las hembras tratadas inducidas, se encontró una cantidad significativamente mayor de oocitos ovulados que el control (HC: $25,0 \pm 8,6$; HT: $44,0 \pm 16,4$, $p < 0,01$). La proporción total de oocitos morfológicamente intactos, observados por microscopía de contraste de fase (Fig. 4A), no se alteró en las HT vs las HC (Fig. 4E). Sin embargo, la frecuencia de oocitos intactos con MII normal (Fig. 4C) disminuyó significativamente en HT respecto del control ($p < 0,001$), mientras que la proporción de oocitos intactos, pero con MII anormal (Fig. 4D), aumentó significativamente comparando con las HC ($p < 0,001$) (Fig. 4E).

Por otra parte, la proporción de oocitos activados partenogénicamente, observados por micros-

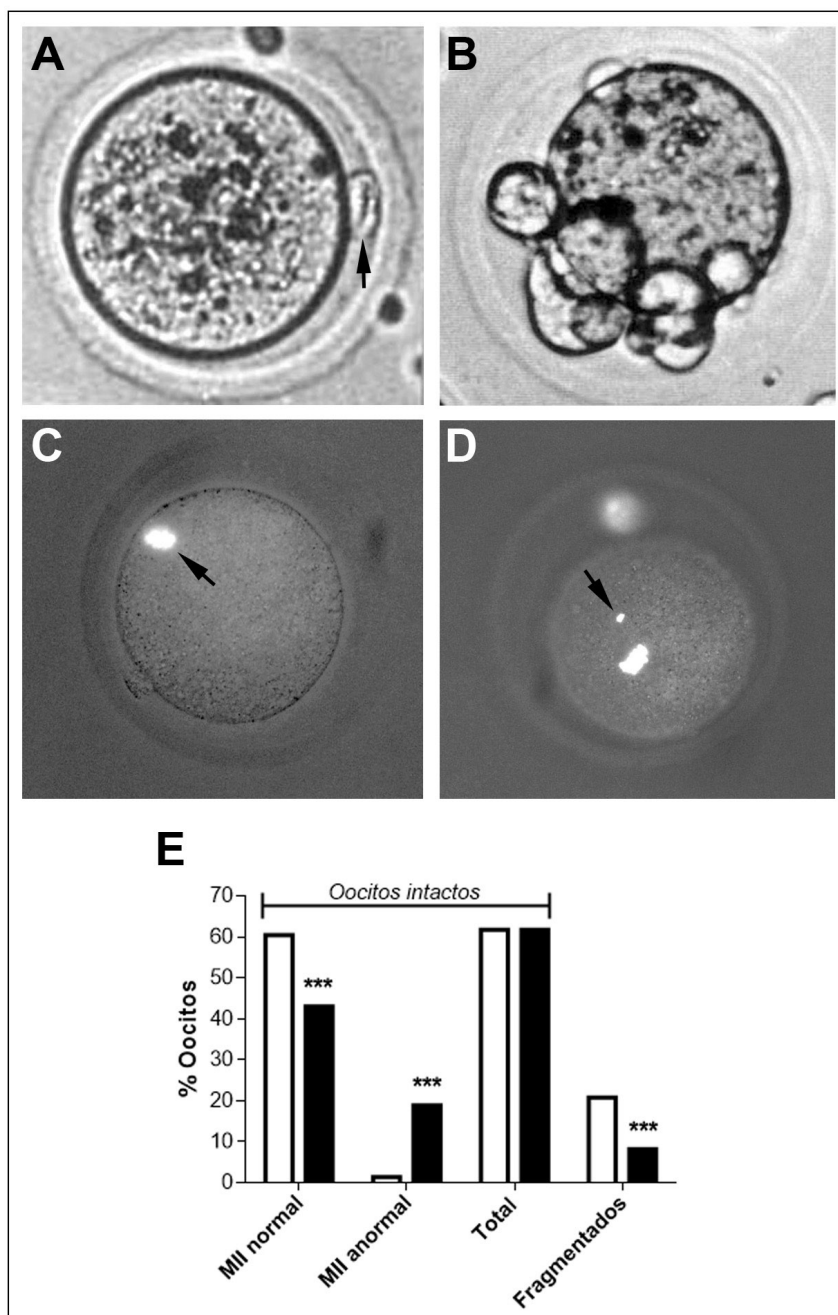


Figura 4. Calidad morfológica externa y nuclear de oocitos de hembras control y tratadas superovuladas.

Se analizó la calidad oocitaria por microscopía de contraste de fase y fluorescencia (*Hoescht 33342*) en oocitos extraídos a las 16 hs post hCG de hembras control (HC) y tratadas (HT) superovuladas. (A) Oocito intacto con morfología normal, con primer cuerpo polar (ICP) (flecha) en espacio perivitelino, (B) oocito fragmentado, (C) oocito intacto en metafase (M) II normal (flecha), (D) oocito intacto normal, pero con MII anormal (disrupción de placa metafásica localizada centralmente y con pérdida de cromatina) (flecha). Contraste de fase (A, B), tinción con Hoescht (C, D). Aumento: 40x. (E) Cuantificación de la frecuencia (%) de los tipos oocitarios según morfología externa (intactos y fragmentados) y nuclear (metafase) en HC y HT. *** $p < 0,001$ vs control (Test de Fisher).

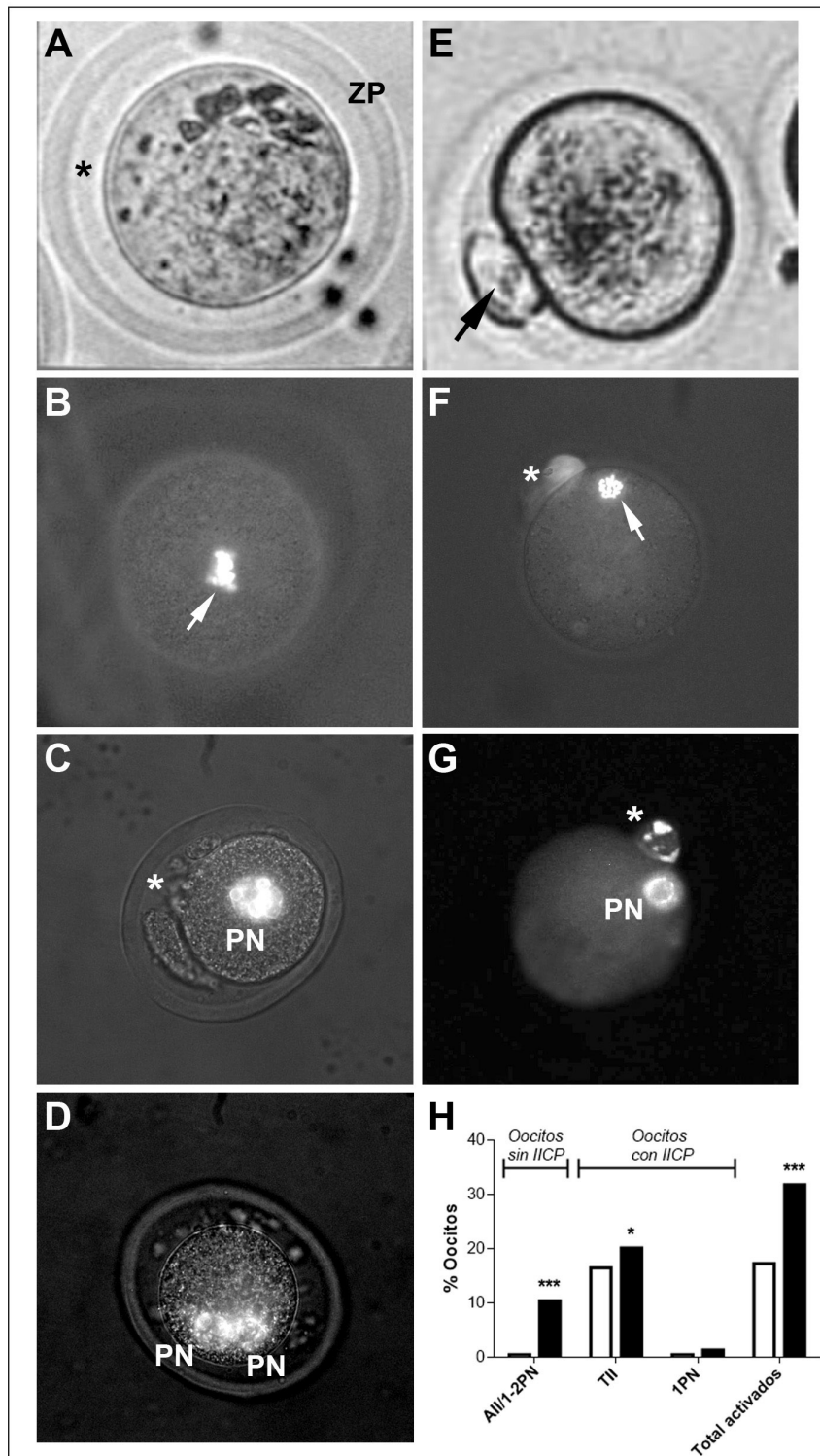


Figura 5. Frecuencia de oocitos activados partenogenéticamente luego del tratamiento semicrónico con alcohol en hembras superovuladas.

Se analizó la calidad oocitaria por microscopía de contraste de fase y fluorescencia (*Hoescht 33342*) en oocitos extraídos a las 16 hs post hCG de hembras controles (HC) y tratadas (HT) superovuladas. (A) Oocito intacto sin liberación de segundo cuerpo polar (IICP) (*: espacio perivitellino, ZP: zona pelúcida), (B) oocito intacto sin IICP + Metafase (M) II activada/Anafase (A) II, migrada al centro del oolema (flecha), (C) oocito anormal sin IICP, con fragmentos perivitellino (*) + 1 pronúcleo (PN) central, (D) oocito anormal sin IICP + 2PN, (E) oocito activado con liberación de IICP (flecha), (F) oocito con IICP (*) + All/telofase II (flecha), (G) oocito con IICP (*) + 1PN. Contraste de fase (A, E), tinción con *Hoescht* (B, C, D, F, G). Aumento 40x. (H) Cuantificación de la frecuencia (%) de los tipos oocitarios activados partenogenéticamente en HC y HT * p<0,05; *** p<0,001, vs control (Test de Fisher).

copía de contraste de fase (Fig. 5E), aumentó significativamente en HT respecto del control ($p < 0,001$) (Fig. 5H). Dentro de esta categoría, la proporción de oocitos sin II CP en anafase II (All) o con 1 o 2 pronúcleos (Fig. 5B-D) aumentó significativamente en HT respecto del control ($p < 0,05$, Fig. 5H). La proporción de oocitos activados con expulsión de II CP, en telofase II (TII) (Fig. 5F), fue significativamente mayor en HT respecto al control ($p < 0,001$, Fig. 5H). Mientras que la proporción de oocitos con IICP y 1 PN (Fig. 5G) no mostró diferencias significativas entre los grupos (Fig. 5H).

Discusión

Históricamente, se reportó que el consumo femenino crónico de alcohol afecta negativamente el funcionamiento endócrino del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal, produciendo efectos adversos en la tasa ovulatoria. Por primera vez, en el presente trabajo describimos el efecto nocivo de la ingesta femenina corta de alcohol en concentraciones moderadas a bajas, según el grado de alcoholemia producida (20-50 mg/dl), sobre la ciclicidad estral, la calidad ovárica y la gameta así como su respuesta a la superovulación con gonadotropinas.

El tratamiento con alcohol al 10% por 15 días de hembras de ratón, provocó en el día 4-5to de tratamiento, alteraciones en la ciclicidad que se reflejaron en menor cantidad relativa y duración de los estados de proestro, estro y metaestro. El detenimiento del ciclo en diestro y/o prolongación de este estado se observó, al término del tratamiento, en la gran mayoría de las hembras tratadas, sugiriendo un efecto de anestro prolongado. Diversos trabajos han mostrado resultados similares, sin embargo, los periodos de exposición a alcohol fueron más prolongados. El tratamiento durante 5 semanas con una dieta líquida con 5 % de alcohol, disminuye significativamente la frecuencia del estro y proestro e incrementa la duración de las fases de diestro y metaestro (Sanchis *et al.* 1985). Ratas tratadas con 5 % de etanol en dieta líquida durante dos ciclos estrales completos fue suficiente para abolir completamente la ciclicidad, presentaron un persistente estado de diestro, disminución de LH y marcada disrupción de la estructura y función ovárica (Rettori *et al.* 1987; Emanuele *et al.* 2001). Mujeres no alcohólicas pero bebedoras sociales (consumidoras de bajas cantidades de alcohol), tuvieron interrupción del ciclo normal e infertilidad temporal, lo cual se asoció con una reducida o ausente secreción de LH (Mendelson y Mello 1988). Por estudios previos, los resultados obtenidos sugieren que las

alteraciones en el ciclo estral están relacionadas con defectos en la síntesis/liberación hormonal a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (H-H-O). En relación con ello, a nivel ovárico, demostramos que el tratamiento corto con alcohol produce un menor crecimiento y maduración folicular y por ende una reducción en la tasa de formación lútea. Más aún, la exposición a alcohol genera elevado índice de atresia folicular.

Dado que los resultados obtenidos sugieren efectos adversos del etanol sobre la regulación hormonal el eje H-H-O, hipotetizamos que la inducción con gonadotropinas exógenas era capaz de restaurar la baja frecuencia de folículos antrales y cuerpos lúteos maduros luego del tratamiento. Esta hipótesis fue probada en las hembras tratadas, con la aplicación de la superovulación. De hecho, los folículos atrésicos tempranos pueden ser rescatados por la aplicación de gonadotropinas exógenas (Hsueh *et al.* 1994). En otras especies (bovinos y porcinos) ya fue demostrado el efecto de las gonadotropinas sobre la supervivencia folicular y el rescate de la atresia (Layman y Mc-Donough 2000), efecto que está mediado por una inhibición de la apoptosis de las células de la granulosa (Yang y Rajamahendran 2000; Asahara *et al.* 2003). El número cuerpos lúteos de las hembras tratadas luego de la superovulación también fue normalizado a los valores del control, mostrando la recuperación del desarrollo folicular y la ovulación luego de la exposición. Sin embargo, todos los tipos foliculares de los ovarios de las hembras expuestas a alcohol presentaron una reducción del crecimiento folicular, dado por el menor número de células de la granulosa en proliferación (PCNA+). De hecho, este resultado sugiere que la alta tasa de atresia en los ovarios de las hembras tratadas pudo deberse al cese de la mitosis folicular, como fue demostrado por otros (Crisp 1992; Hsueh *et al.* 1994). De manera similar, la exposición directa a etanol inhibió la proliferación de células de músculo esquelético *in vitro* (Garriga *et al.* 2000). Sin embargo, luego de la superovulación, si bien la tasa de proliferación de los folículos antrales de los ovarios de las hembras tratadas permaneció disminuida, contrariamente a lo esperado, la superovulación provocó un aumento en la tasa de proliferación de los folículos primarios, efecto que requiere mayor estudio.

La calidad del desarrollo folicular e índice proliferativo están íntimamente ligados con el rol de factores de crecimiento, como el VEGF. El impacto de la ingesta de alcohol a nivel del ovario se tradujo en un incremento de la expresión de VEGF en folículos preantrales y antrales, en

cuerpos lúteos y en el estroma medular. Aunque se demostró que la inyección directa de VEGF en ovarios de ratón incrementa significativamente la densidad vascular y el número de folículos preovulatorios (Quintana *et al.* 2004), en nuestro modelo, la exposición a alcohol induciría una sobre-expresión ovárica de VEGF, por encima del nivel del control. En la rata, el ARNm de VEGF se expresa en las capas de la teca de los folículos preantrales y antrales pequeños, sugiriendo una acción paracrina de VEGF en dichas células con un rol en la dirección de la extensión de capilares hacia la periferia del folículo (Shweiki *et al.* 1993). Durante la foliculogénesis, los folículos destinados a ovularse presentan incremento de la expresión de VEGF (Kaczmarek *et al.* 2005). En ratón, VEGFA participa en la supervivencia de las células de la granulosa, a través de la estimulación de las mismas a producir hormonas esteroideas que promueven la viabilidad y progresión folicular (Sargent *et al.* 2015). Además, VEGF estaría involucrado en el proceso de formación del antro por aumento de la permeabilidad vascular. Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro modelo sugieren que los altos niveles de VEGF se relacionan con regulación negativa de la proliferación de la granulosa folicular luego de la exposición a alcohol, y por lo tanto con una disminución de la viabilidad folicular que lleva a atresia ovárica. Tal como fue demostrado por otros autores, el incremento de la expresión de VEGF ovárica está asociado con patología gonadal. Así, la elevada producción de VEGF se vinculó con anovulación en el síndrome de ovario poliquístico, en el síndrome de estimulación ovárica y en neoplasias ováricas benignas y malignas (Geva y Jaffe 2000). Más aún, se ha encontrado que la sobreexpresión de la isoforma VEGF165b en el ovario de ratón reduce la fertilidad al inhibir el desarrollo folicular (Qiu *et al.* 2012). De hecho, la administración de 5 UI de gonadotropinas en las hembras tratadas tampoco revirtió el efecto del alcohol sobre el aumento de VEGF, el que permaneció elevado. Varios estudios sugirieron que LH y hCG incrementan la expresión y secreción de VEGF (Ravindranath *et al.* 1992; Neulen *et al.* 1995; Christenson y Stouffer 1997), que actúa de manera parácrina sobre su receptor KDR en las células epiteliales foliculares y endoteliales del ovario (Zimmermann *et al.* 2003).

Luego de la ingesta corta de alcohol y bajo estimulación ovárica con gonadotropinas, se observó una mayor tasa ovulatoria. Considerando que el tratamiento con alcohol fue capaz de inhibir la foliculogénesis e incrementar la tasa de atresia,

la aplicación de gonadotropinas exógenas en las hembras tratadas podría llevar a la inducción de la maduración de folículos pequeños poco desarrollados y rescatar algunos atrésicos, produciendo de esta manera una mayor ovulación de folículos. Es por ello que pensamos que en las hembras tratadas la superovulación indujo aumento de anomalías oocitarias y menor frecuencia de fragmentados, efecto que en las hembras controles constituye un evento fisiológico normal ocasionado por la apoptosis oocitaria durante la atresia folicular.

La ingesta de alcohol afectó negativamente la calidad oocitaria, por lo que se observó una elevada frecuencia de oocitos con MII anormal, dada por pérdida de material genético y/o probablemente cromosomas rezagados en el oolema. Según trabajos previos, el etanol indujo anomalías cromosómicas (aneuploidías) en oocitos expuestos durante la meiosis I y II, donde se vieron husos multipolares asociados con alineamientos desorganizados de cromosomas (Balakier y Casper 1993). Varios estudios indicaron que el principal metabolito del etanol, el acetaldehído, interfiere con la integridad de los microtúbulos y la polimerización de la tubulina (Kaufman 1997). Es probable que aún la ingesta corta de alcohol en el presente modelo, induzca errores en la segregación cromosómica durante la meiosis, efectos adversos que estarían dados a nivel de alteraciones en la formación del huso meiótico.

Por otro lado, observamos que una alta cantidad de oocitos de las hembras tratadas salieron del arresto meiótico, proceso que, aunque puede ocurrir en baja frecuencia en forma espontánea en las hembras controles, fue inducido por el tratamiento con alcohol. La ingesta de alcohol produjo alta frecuencia de diploidización de la gameta (oocitos sin extrusión de II CP y en All o con desarrollo de 1 o 2 pronúcleos), y de activación partenogenética haploide (oocitos con liberación de II CP y en telofase II). Estos resultados son coincidentes con trabajos propios previos, donde tratamientos crónicos con etanol al 5 y 10 % por 30 días en ratones híbridos y exocriados (CF1) producen un incremento del porcentaje de oocitos morfológicamente anormales y de activados partenogenéticamente, aunque en este caso, luego de la expulsión de II CP, se desarrolló un pronúcleo (Cebal *et al.* 1998a; Cebal *et al.* 1998b; Cebal *et al.* 1999; Cebal *et al.* 2011). En el presente estudio la activación diferencial de oocitos, con o sin extrusión del II CP y desarrollo de la meiosis, podría ser explicada por el tipo mecanismo de activación gatillado por la

exposición corta a alcohol. La activación oocitaria está dada por el incremento del Ca^{2+} intracelular libre que lleva a la reasunción meiótica (de Felici *et al.* 1991; Kline 1996). La exposición directa de oocitos a etanol induce un aumento de Ca^{2+} intracelular y con ello la extrusión completa del IICP (Cuthbertson 1983; Chatot *et al.* 1989). Por lo tanto, el tratamiento semicrónico de alcohol en el presente modelo murino exocriado, induce desarrollo de la meiosis que, dependiendo del patrón de pulsos de calcio intracelular, lleva al desarrollo temprano de partenogénesis diploide y/o haploide sin formación de pronúcleo, evento más tardío de la progresión de la meiosis.

En resumen, la superovulación en hembras murinas tratadas semicrónicamente con alcohol en el agua de bebida por 15 días, no restaura la calidad de la gameta, sino lo contrario, además de la persistencia de anomalías nucleares y activación partenogénica oocitaria, la inducción de la ovulación incrementa la tasa de fragmentación de la gameta luego de la exposición a alcohol. El presente trabajo, abre nuevos horizontes en la investigación de los efectos adversos del consumo de alcohol sobre la ovulación y la calidad gamética en edad reproductiva y su probable repercusión en la competencia y calidad del desarrollo embrionario temprano.

Agradecimientos. Los autores agradecen al Dr. Cristian So-barzo, del INBIOMED, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, por facilitar la utilización y disposición de equipamiento de microscopía óptica y de fluorescencia (*Carl Zeiss*). El presente trabajo fue realizado con aportes de subsidios PIP-CONICET y de la Agencia de Ciencia y Técnica (PICT) (EC).

Bibliografía

Abramovich D, Rodríguez Celin A, Hernandez F, Tesone M, Parborell F. 2009. Spatiotemporal analysis of the protein expression of angiogenic factors and their related receptors during folliculogenesis in rats with and without hormonal treatment. *Reproduction*. 137:309–320.

Angelis C, Nardone A, Garifalos F, Pivonello C, Sansone A, Conforti A, Di Dato C, Sirico F, Alviggi C, Isidori A, Colao A, Pivonello R. 2020. Smoke, alcohol and drug addiction and female fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 18(1):21.

Anwar MY, Marcus M, Taylor KC. 2021. The association between alcohol intake and fecundability during menstrual cycle. *Hum Reprod*. deab121. doi:10.1093/humrep/deab121.

Asahara S, Sato A, Aljonaid AA, Maruo T. 2003. Thyroid hormone synergizes with follicle stimulating hormone to inhibit apoptosis in porcine granulosa cells selectively from small follicles. *Kobe J Med Sci*. 49:107-116.

Balakier H, Casper RF. 1993. Experimentally induced activation of human oocytes. *Hum Reprod*. 8:740-743.

Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M. 2000. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod*. 63:858–864.

Brett KM, Cooper GS. 2003. Associations with menopause and menopausal transition in a nationally representative US sample. *Maturitas*. 45:89–97.

Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. 2005. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 9:777–794.

Caires KC, de Avila JM, Cupp AS, McLean DJ. 2012. VEGFA family isoforms regulate spermatogonial stem cell homeostasis *in vivo*. *Endocrinology*. 153:887–900.

Caligioni CS. 2009. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci*. 48:A.41.1-A.41.8.

Canteros G, Rettori V, Franchi A, Genaro A, Cebal E, Faletti A, Gimeno M, McCann SM. 1995. Ethanol inhibits luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion by blocking the response of LHRH neuronal terminals to nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(8):3416-3420.

Cebal E. 2016. The role of oocyte morphology in the early embryo competence determination. *Cs Morfol*. 8(1):42-67.

Cebal E, Abrevaya XC, Mudry MD. 2011. Male and female reproductive toxicity induced by sub-chronic ethanol exposure in CF-1 mice. *Cell Biol Toxicol*. 27:237-248.

Cebal E, Lasserre A, Faletti AB, Gimeno MAF. 1998a. Response to ovulatory induction following moderate chronic ethanol administration in mice. *Med Sci Res*. 26:29–31.

- Cebral E, Lasserre A, Motta A, Gimeno MAF. 1998b. Mouse oocyte quality and prostaglandin synthesis by cumulus oocyte complex after moderate chronic ethanol intake. *Prost Leukot Ess Fatty Ac.* 58:381-387.
- Cebral E, Lasserre A, Rettori V, Gimeno MAF. 1997. Impaired mouse fertilization by low chronic alcohol treatment. *Alcohol Alcohol.* 32:563-572.
- Cebral E, Motta A, de Gimeno MF. 1999. Low chronic ethanol consumption affects ovulation and PGE synthesis by the cumulus cell masses in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 60:95-100.
- Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Ali Kayisli U, Arici A, Demir R. 2003. Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucida of developing ovarian follicles in the rat: a possible role in destiny of follicles. *Histochem Cell Biol.* 120:383-390.
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Tortes I. 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J Reprod Fertil.* 86:679-688.
- Christenson LK. 1997. Stouffer R.L. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:2135-2142.
- Crisp TM. 1992. Organization of the ovarian follicle and events in its biology: oogenesis, ovulation or atresia. *Mutat Res.* 296:89-106.
- Cruz ME, Olvera E, Pérez MJ, Min EI, Flores A, Cárdenas M, Domínguez R. 2014. Effects of Unilaterally Microinjecting Ethanol in the Preoptic-Anterior Hypothalamic Areas of Rats on Ovulation. *Alcohol Clin Exp Res.* 38:1611-1621.
- Cuthbertson KSR. 1983. Parthenogenetic activation of mouse oocytes *in vivo* with ethanol and benzil alcohol. *J Exp Zool.* 226:311-314.
- de Felici M, Dolci S, Siracusa G. 1991. An increase of intracellular free Ca ++ is essential for spontaneous meiotic resumption by mouse oocytes. *J Exp Zoo.* 260:401-405.
- Dees WL, Dissen GA, Hiney JK, Lara F, Ojeda SR. 2000. Alcohol ingestion inhibits the increased secretion of puberty-related hormones in the developing female Rhesus monkey. *Endocrinology.* 141:1325-1331.
- Dees WL, Srivastava VK, Hiney JK. 2001. Alcohol and female puberty: the role of intraovarian systems. *Alcohol Res Health.* 25:271-275.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pflieger U, Tews G. 2002. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod.* 17:2415-2418.
- Emanuele NV, Lapaglia N, Emanuele MA. 2001. Impact of acute and chronic ethanol exposure on prolactin in both male and female rats. *Endocrine.* 16:29-37
- Garriga J, Adanero E, Fernández-Solá J, Urbano-Márquez A, Cussó R. 2000. Ethanol inhibits skeletal muscle cell proliferation and delays its differentiation in cell culture. *Alcohol Alcohol.* 35:236-241
- Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. 1998. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl- 2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 273:13313-13316.
- Geva E, Jaffe RB. 2000. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril.* 74:429-438.
- Greenaway J, Connor K, Pedersen HG, Coomber BL, LaMarre J, Petrik J. 2004. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology.* 145:2896-2905.
- Grodstein F, Goldman MB, Cramer CW. 1994. Infertility in women and moderate alcohol use. *Am J Public Health.* 84:1429-1432.
- Gualdoni G, Barril C, Jacobo P, Cebral E. 2021a. Oocyte-embryonic anomalies induced by preconceptional alcohol consumption. Effects of superovulation in a preclinic experimental murine model. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 48(3):756. doi:10.31083/j.ceog.2021.03.0511.
- Gualdoni GS, Ventureira MR, Coll TA, Palomino WA, Barbeito CG, Cebral E. 2021b. Perigestational alcohol consumption induces altered early placentation and organogenic embryo growth res-

triction by disruption of trophoblast angiogenic factors. *Reprod Biomed Online*. 42(3):481-504. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.10.015.

Hakim RB, Gray RH, Zacur H. 1998. Alcohol and caffeine consumption and decreased fertility. *Fertility Sterility*. 70:632-637.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. 2004. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 56:549-580.

Hsueh AJ, Billig H, Tsafri A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev*. 15:707-724.

Jozkowicz A, Cooke JP, Guevara I, Huk I, Funnovics P, Pachinger O, Dulak J. 2001. Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF. *Cardiovasc Res*. 51:773-783.

Kahraman S, Yakin K, Donmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz G, Imirzahoglu M. 2000. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 15:2390-2393.

Kaufman MH. 1997. The teratogenic effects of alcohol following exposure during pregnancy, and its influence on the chromosome constitution of the pre-ovulatory egg. *Alcohol*. 32:113-128.

Kimura H, Esumi H. 2003. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Investigative. Acta Biochimica Polonica*. 50:49-59.

Kinney A, Kline J, Levin B. 2006. Alcohol, caffeine and smoking in relation to age at menopause. *Maturitas*. 54:27-38.

Kline D. 1996. Activation of the mouse egg. *Theorogenology*. 45:81-90.

Kline J, Tang A, Levin B. 2016. Smoking, alcohol and caffeine in relation to two hormonal indicators of ovarian age during the reproductive years. *Maturitas*. 92:115-122.

Lapaglia N, Steiner J, Kirsteins L, Emanuele MA, Emanuele N. 1997. The impact of acute ethanol on reproductive hormone synthesis, processing, and secretion in female rats at proestrus. *Alcohol*

Clin Exp Res. 21:1567-1572.

Layman LC, McDonough PG. 2000. Mutations of follicle stimulating hormone- β and its receptor in human and mouse: genotype/phenotype. *Mol Cell Endocrinol*. 161:9-17.

Lee YH, Naseer MI, Lee SH, Kim MO. 2010. Time-dependent effect of ethanol on GnRH and GnRH receptor mRNA expression in hypothalamus and testis of adult and pubertal rats. *Neurosci Lett*. 471:25-29.

Li C, Liu Z, Li W, Zhang L, Zhou J, Sun M, Zhou J, Yao W, Zhang X, Wang H, Tao J, Shen M, Liu H. 2020. The FSH-HIF-1 α -VEGF Pathway Is Critical for Ovulation and Oocyte Health but Not Necessary for Follicular Growth in Mice. *Endocrinology*. 161(4):bqaa038. doi:10.1210/endo/bqaa038.

Li N, Fu S, Zhu F, Deng X, Shi X. 2013. Alcohol intake induces diminished ovarian reserve in childbearing age women. *J Obstet Gynaecol Res*. 39:516-521.

McFee RM, Artac RA, McFee RM, Clopton DT. 2009. Longfellow Smith RA, Rozell TG, Cupp AS. 2009. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signal transduction blocks follicle progression but does not necessarily disrupt vascular development in perinatal rat ovaries. *Biol Reprod*. 81:966-977.

McFee RM, Cupp AS. 2013. Vascular contributions to early ovarian development: potential roles of VEGFA isoforms. *Reprod Fertil Dev*. 25:333-342.

Mendelson JH, Mello NK. 1988. Chronic alcohol effects on anterior pituitary and ovarian hormones in healthy women. *J Pharmacol Exp Ther*. 245:407-412.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 13:9-22.

Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weindel K, Keck C, Weich HA, Breckwoldt M. 1995. Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 80:1967-1971.

- Ortega N, Hutchings H, Plouet J. 1999. Signal relays in the VEGF system. *Front Biosci.* 4:141–152.
- Qiu Y, Seager M, Osman A, Castle-Miller J, Bevan H, Tortonese DJ, Bates DO. 2012. Ovarian VEGF165b expression regulates follicular development, corpus luteum function and fertility. *Reproduction.* 143:501-511. doi: 10.1530/REP-11-0091.
- Quintana R, Kopcow L, Sueldo C, Marconi G, Rueda NG, Baranao RI. 2004. Direct injection of vascular endothelial growth factor into the ovary of mice promotes follicular development. *Fertil Steril.* 82(3):1101-1105.
- Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N, Zeleznik AJ. 1992. Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology.* 131:254–260.
- Rettori V, Skelley CW, Mccann SM, Dees WL. 1987. Detrimental effects of short-term ethanol exposure on reproductive function in the female rat. *Biology of Reproduction.* 37:1089–1096.
- Sanchis R, Esquifino A, Guerri C. 1985. Chronic ethanol intake modifies estrous cyclicity and alters prolactin and LH levels. *Pharmacol Biochem Behav.* 23:221-224.
- Sargent KM, Lu N, Clopton DT, Pohlmeier WE, Brauer VM, Ferrara N, Cupp AS. 2015. Loss of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) Isoforms in Granulosa Cells Using pDmrt-1-Cre or Amhr2-Cre Reduces Fertility by Arresting Follicular Development and by Reducing Litter Size in Female Mice. *PLoS One.* 10:e0116332. doi:10.1371/journal.pone.0116332.
- Schliep KC, Zarek SM, Schisterman EF, Wactawski-Wende J, Trevisan M, Sjaarda LA, Perkins NJ, Mumford SL. 2015. Alcohol intake, reproductive hormones, and menstrual cycle function: a prospective cohort study. *Am J Clin Nutr.* 102:933–942.
- Shiina Y, Kaneda M, Matsuyama K, Tanaka K, Hiroi M, Doi K. 1993. Role of the extracellular Ca²⁺ on the intracellular Ca²⁺ changes in fertilized and activated mouse oocytes. *J Reprod Fertil.* 97:143-150.
- Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. 1993. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest.* 91:2235–2243.
- Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, y Hazzard TM. 2001. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res.* 32:567–575.
- Tamanini C, De Ambrogi M. 2004. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim.* 39:206–216.
- Valimaki M, Pelkonen R, Salaspuro M, Harkonen M, Hirvonen E, Ylikahri R. 1984. Sex hormones in amenorrheic women with alcoholic liver disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 59:133–138.
- Yang MY, Rajamahendran R. 2000. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol Reprod.* 62:1209-1217.
- Zimmermann RC, Hartman T, Kavic S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. 2003. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest.* 112:659–669.

The use of histological parameters to assess intestinal and liver health on broilers challenged isolatedly and simultaneously with cyclopiazonic acid and aflatoxin B1

El uso de parámetros histológicos para evaluar la salud intestinal y hepática en pollos de engorde desafiados de forma aislada y simultánea con ácido ciclopiazónico y aflatoxina B1

Domingues, Jéssica M.¹; Schreiner Spiassi, Bárbara²; Sanches, Adrien W.D.²; Belote, Bruna L.²; Santin, Elizabeth²; Wagner, Ricardo^{1*}.

¹Toxicology Laboratory, Department of Clinical Analysis, Federal University of Paraná. Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632. Jardim Botânico. CEP 80210-170, Curitiba, PR, Brazil. ²Microbiology and Avian Pathology Laboratory, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Paraná. Rua dos Funcionários, 1540. Cabral, CEP 90035-050, Curitiba, PR, Brazil.

* ricardo.wagner@ufpr.br

Recibido: 22 de enero de 2021

Aceptado: 30 de junio de 2021

Abstract. Mycotoxins contaminate agricultural commodities, which contaminates animals. These toxins can damage vital organs, such as the liver, as well as the epithelial tissue. Among these mycotoxins are aflatoxin B1 (AFB1) and cyclopiazonic acid (CPA), which can occur simultaneously in food. In broilers, mycotoxicosis has an economic impact due to several factors, such as low feed conversion rate, incidence of other diseases, and interference with reproductive capacity, all of which may lead to a public health problem. The aim of the present study was to histologically assess, through the I See Inside (ISI) method, harmful effects on broiler liver, duodenum, jejunum, and ileum in the presence of AFB1 and CPA isolatedly and simultaneously. Groups challenged with mycotoxins showed significant damage to both gut and liver fragments. All challenged-groups in all fragments impaired the parameters analyzed for intestinal epithelium. In the liver, AFB1 was predominantly harmful when the parameters were analyzed separately, but when analyzing the total ISI score, CPA was also found to be harmful to this organ. The other point analyzed was the great variation between the weights of the birds contaminated by mycotoxin while the negative control group presents a lesser variation.

Keywords: Gut Histology; Aflatoxin B1; Cyclopiazonic acid; ISI.

Resumen. Las micotoxinas contaminan los productos agrícolas, que a su vez contaminan a los animales. Estas toxinas pueden dañar órganos vitales, como el hígado y el tejido epitelial. Entre estas micotoxinas se encuentran la aflatoxina B1 (AFB1) y el ácido ciclopiazónico (CPA), que pueden hallarse simultáneamente en los alimentos. En los pollos de engorde, la micotoxicosis tiene un impacto económico debido a varios factores, como la baja tasa de conversión alimenticia, la incidencia de otras enfermedades y la interferencia de la capacidad reproductiva, que pueden llevar a un problema de salud pública. El objetivo de la presente investigación es la de evaluar histológicamente, a través del método "I See Inside" (ISI), los efectos nocivos sobre el hígado, duodeno, yeyuno e íleon de pollos de engorde en presencia de AFB1 y CPA de forma aislada y simultánea. Los grupos desafiados con micotoxinas presentaron un daño significativo tanto en el intestino como en los fragmentos del hígado. Todos los grupos tratados tuvieron alteraciones en los parámetros analizados para el epitelio intestinal. En el hígado, AFB1 fue predominantemente dañino cuando los parámetros se analizaron por separado, pero al examinar la puntuación ISI total, también se encontró que el CPA era perjudicial para este órgano. Otra cuestión que fue investigada fue la gran variación entre los pesos de las aves contaminadas por micotoxinas mientras el grupo de control negativo presentó una variación menor.

Palabras clave: Histología intestinal; Aflatoxina B1; Ácido ciclopiazónico; ISI.

Introduction

Typically, the fungi that produce mycotoxins as secondary metabolite develop during storage when maize stored in silos presents high moisture content (Márcia and Lazarrí 1998). The diseases caused by these toxins are called mycotoxicosis and they mainly lead to lesions in organs such as liver and

kidneys, as well as lesions in the epithelial tissue. They can also act on the immune system, either as immunostimulants or immunosuppressives, depending on the type of mycotoxin (Pestka 1990; Diaz 2005; Oliveira and Corassin 2014). There are over 20 known aflatoxins, but the most

important ones in this group are AFB1, AFB2, AFG1, and AFG2. AFB1 stands out among the main AFs given its carcinogenic activity in animals (Zain 2011).

Cyclopiazonic acid is known to be a secondary metabolite of several *Penicillium* species, but the *Aspergillus* species, known for aflatoxin synthesis, have CPA as one of their major secondary metabolites. The toxicity of CPA in many animal species has been studied: it causes weight loss, diarrhea, degeneration, and necrosis of the muscles and viscera, as well as seizure and death in rodents, birds, dogs and swine (Hayashi and Yoshizawa 2005; Moldes-Anaya *et al.* 2009; Heperkan *et al.* 2012).

The Food and Agriculture Organization of the United Nations found that sixty one countries have regulated limits for the presence of aflatoxins, while there are no laws that regulate CPA values (FAO 2004).

In monogastric animals such as broilers, mycotoxicosis is considered a major problem. This is due to the economic impact linked not only to mortality, but also to worsening feed conversion, increased incidence of other diseases, damage to vital organs, and interference with reproductive capacity. The consequences of mycotoxicosis lead to negative effects on public health, especially because birds are used as food, favoring the spread of mycotoxins (Akande *et al.* 2006; Oliveira and Corassin 2014).

Contamination of animals by more than one mycotoxin is possible due to the co-occurrence of these toxins in food, proven by co-exposure monitoring research (Alassane-Kpembi *et al.* 2017). This simultaneous exposure may have antagonistic, additive, or synergistic effects. Thus, this study aims to highlight, through ISI, the damage caused by aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid isolatedly and simultaneously in the histology of the small intestine, which is the site of absorption of mycotoxins, and in the liver, a vital organ in broiler chickens, and also the effect on weight gain.

Materials and Methods

Ethics Committee

This trial was conducted at the Microbiology and Avian Pathology Laboratory, at Federal University of Paraná, Curitiba, State of Paraná, Brazil. This study was approved by the Animal Use Ethics Committee - CEUA of the Federal University of Paraná and registered under the number 23075.139283 / 2016-86.

Experimental design, animals and housing

The experiment was developed considering the importance of the internationally recognized program 3R, which aims to reduce the number of animals in experiments, refine research to lower animal discomfort and pain, and replace *in vivo* tests when possible (Cazarin *et al.* 2004).

A total of 20 Cobb 500 broiler chickens were housed from 1-28 days of age in previously disinfected negative pressure rooms and randomly distributed in cages containing sterilized shackle at 121°C for 15 minutes. Temperature and light were controlled for a comfortable environment according to the age of the bird and its lineage. Water and food were provided *ad libitum* throughout the period. The diet was a commercial one according to the bird's necessities, without any anti-coccidial or growth-promoting antibiotic.

The birds were divided into 4 treatments, with 5 birds in each cage that were divided as it follows: group 1) negative control (NC), without challenge; group 2) group challenged with cyclopiazonic acid (CPA); group 3) group challenged with aflatoxin B1 (AFB1); and group 4) group challenged with cyclopiazonic acid and aflatoxin B1 (CPA + AFB1).

Preparation of Solutions

The standards used in this study, cyclopiazonic acid (batch 0449585-4, Cayman Chemical, Michigan, USA) and aflatoxin B1 (batch 0460083-28, Cayman Chemical, Michigan, USA). The tested mycotoxins were solubilized in a 0.5% methanol solution, which was also the solution administered to the negative control group. The AFB1 and CPA concentrations were 20 µg ml⁻¹ and 120 µg ml⁻¹, respectively.

Challenge

From the 1st to the 28th day, the birds received a daily gavage dose according to their treatments: group 1) 0,5 ml of 0,5% methanol; group 2) 0,5 ml of CPA 120 µg ml⁻¹; group 3) 0,5 ml of AFB1 20 µg ml⁻¹; and group 4) 0,5 ml of 120 µg ml⁻¹ CPA and 0,5 ml of 20 µg ml⁻¹ AFB1.

Weight

For the analysis of weight gain or loss the birds were weighed at days 1, 7, 14, 21 and 28 of the experiment. Values were expressed by group of birds and not individually

Sample Collection and Histological Analysis

At 28 days of age, five birds per treatment were euthanized by cervical dislocation. Duodenum, jejunum, ileum, and liver samples were collected

for histological evaluation. For each intestinal fragment collected, five histological sections were performed; for each liver fragment collected, three histological sections were performed for larger organ sampling.

All samples were collected and fixed in Davidson (100 ml glacial acetic acid, 300 ml 95% ethanol, 200 ml 10% formalin neutral buffer, and 300 ml distilled water) for at least 24 h. All samples were dehydrated, infiltrated and embedded in paraffin, following the common histological routine. Blocks were cut into 5µm sections and stained with hematoxylin and eosin associated with Alcian Blue for goblet cell staining (Rapp and Wurster 1978). For intestinal and hepatic morphology, an adaptation of the methodology described by Kraieski *et al.* (2017) and Belote *et al.* (2018) was performed. For intestinal analyses, 10 villi per cut were analyzed, totaling 50 villi per bird. The villi were observed at 100x magnification (using 400x magnification to confirm changes). For liver morphology, five fields of three cuts were analyzed, totaling 15 fields for each bird. Fields were observed at 100x magnification (using 400x magnification to confirm changes). Both evaluations were performed under

light microscopy (Eclipse E200, Nikon).

The ISI methodology in process of patent (INPI BR 1020150036019) is based on a numeric score of alteration. In this methodology, an impact factor (IF) is defined for each alteration in macroscopic and microscopic analysis, according to the reduction of organ functional capacity, based on previous knowledge from the field literature and background research (necrosis has the highest IF because the functional capacity of affected cells is completely lost). The IF ranges from 1 to 3, with 3 meaning the biggest impact on organ function. In addition, the extent of each lesion (intensity) or the observed frequency compared to a non-affected organ is evaluated in each organ/tissue with score (S) ranging from 0 to 3: score 0 (absence of lesion or frequency), score 1 (alteration of up to 25% of the area or observed frequency), score 2 (alteration ranges from 25 to 50% of the area or observed frequency), and score 3 (alteration extends to more than 50% of the area or observed frequency). In order to obtain the final value of the ISI index, the IF of each alteration is multiplied by the respective score number, as shown in *Table 1*.

Table 1. ISI histological alterations scores assessed in intestine and liver

Organ	Alteration	Impact Factor(IF)		Score	Final Score	Maximum Score ¹
Duodenum	Lamina propia thickness	2	X	3	6	45
Jejunum	Epithelial thickness	1	X	3	3	45
Ileum	Enterocytes proliferation	1	X	3	3	45
	Epithelial plasma cell infiltration	1	X	3	3	
	Lamina propia inflammatory infiltration	3	X	3	9	
	Goblet cells proliferation	2	X	3	9	
	Congestion	2	X	3	6	
	Presence of oocysts	3	X	3	9	
Liver	Congestion	1	X	3	3	42
	Cell vacuolation	2	X	3	6	
	Bile-duct proliferation	2	X	3	6	
	Immune cells infiltration	1	X	3	3	
	Necrosis	3	X	3	9	
	Pericholangitis	3	X	3	9	
	Lymphocytic aggregate	2	X	3	6	

¹Maximum score represents the sum of all alterations according to the formula $ISI = \sum(IF \cdot S)$, IF = impact factor (previous fixed) and S = Score (observed), considering the maximum observed S. For example, the lamina propia thickness has IF = 2; this number will be multiplied by observed score (range from 1 to 3); if in a villus, a score S = 3. Source: Belote *et al.* (2018).

Statistical Analysis

The experimental unit for each organ was the analyzed section. Initially, data normality was verified using the Shapiro-Wilk Test. Data were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test ($p < 0,05$) for parametric data. All analyses were performed by Past for Windows.

Results

In this study, birds were challenged with CPA and AFB1 for 28 days. After the treatment period, it was possible to evaluate the damage caused by the presence of mycotoxins in the three evaluated intestinal fragments and in the liver.

Analysis of gain weight

The weights obtained during the 28 days of the experiment are shown in Table 2. In the first days of life of the chickens it was possible to notice that the group contaminated with CPA showed a significantly lower weight gain than the group CN. When weighing the birds on day 28, it was possible to perceive through the coefficient of variation (CV) and the standard deviation (SD) (Table 3) that within each contaminated group there is a great variation between the weights of the birds while the negative control group presents a lesser variation. Thus, it appears that the mycotoxins studied show interference in the weight of the animals, decreasing the uniformity in weight gain.

Table 2. Poultry’s weights obtained during the 28 days

Group	7 days Weight (g)	14 days Weight (g)	21 days Weight (g)	28 days Weight (g)
CN	160	401	821	1335
CPA	138*	370	753	1224
AFB1	159	404	868	1405
CPA+AFB				
1	165	406	788	1272

* Values with significant difference in relation to NC ($p < 0,05$)

Table 3. Poultry’s weight at 28th day

28 days			
Group	Weight (g)	CV (%)	SD
CN	1335	5,54	74,0
CPA	1224	11,93	146
AFB1	1405	8,97	126
CPA+AFB	1272	9,87	125

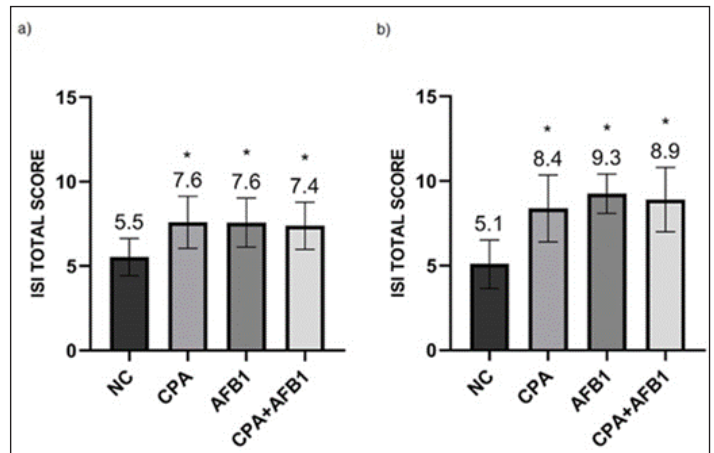


Figure 1. ISI total histological alteration scores in duodenum (a) and ileum (b) in different groups. Error bars represent standard error of the mean. NC: non-challenged group, CPA: cyclopiazonic acid challenge, AFB1: aflatoxin B1 challenge, and CPA+AFB1: cyclopiazonic acid and aflatoxin B1 challenge.

Intestine

In both duodenum and ileum fragments, the challenged groups (CPA, AFB1 and CPA + AFB1) presented significant difference ($p < 0,05$) when compared to the negative control group (NC). However, when compared to another challenged group, the difference is absent (Figure 1). In the jejunum fragments, the CPA treatment presented a higher total number of ISI than all other treatments, while the AFB1 and CPA + AFB1 groups were higher than the NC (Figure 2).

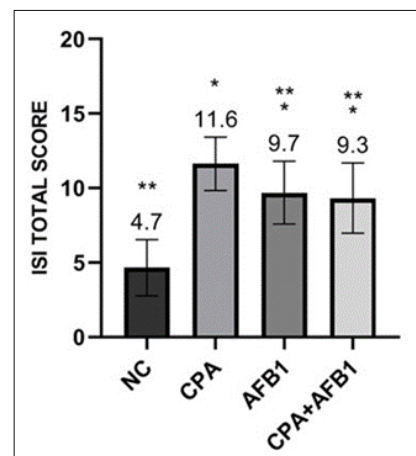


Figure 2. ISI total histological alteration scores in jejunum in different groups. Error bars represent standard error of the mean. NC: non-challenged group, CPA: cyclopiazonic acid challenge, AFB1: aflatoxin B1 challenge and CPA+AFB1: cyclopiazonic acid and aflatoxin B1 challenge.

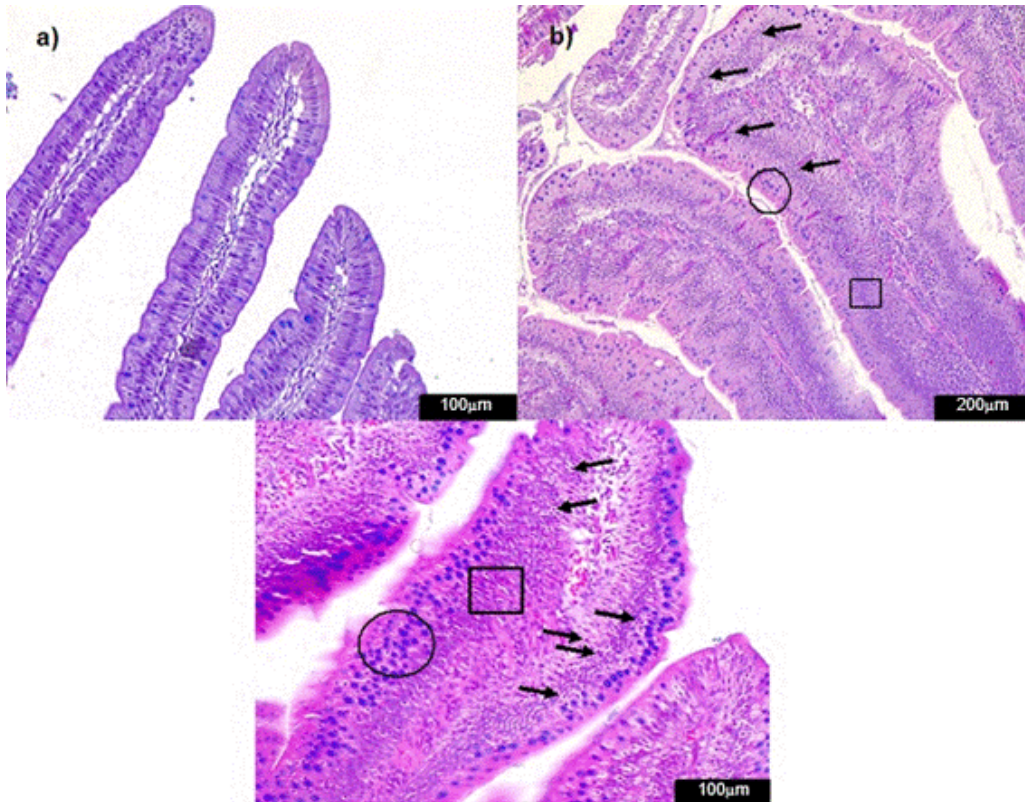


Figure 3. Photomicrographs of hematoxylin and eosin-stained chicken jejunum sections. Alcian Blue was used to stain the goblet cells. a) Normal histological structure of non-challenged group NC (200x); b) Epithelial inflammatory infiltration cells (arrow), goblet cells proliferation (circle) and enterocytes proliferation (square) in the challenged group CPA+AFB1 (200x).

Table 4. Results found from ISI histological changes to intestinal epithelium in the groups tested

Treatments	Epithelial Thickness	Enterocytes Proliferation	Epithelial Plasma Cell Infiltration	Goblet Cells Proliferation
Duodenum				
CPA	28,1*	23,6*	24,2*	41,2*
AFB1	26,2*	23,1*	26,9*	45,8*
CPA + AFB1	25,6*	23*	27,5*	44,4*
Jejunum				
NC	11,8	19,1	6,2	15
CPA	28,1*	23,6*	24,2*	37*
AFB1	25,1*	23,1*	28,2*	33,6*
CPA+AFB1	25,6*	23*	27,5*	33,4*
Ileum				
NC	17	14,3	6,1	21,4
CPA	22,8*	21,7*	17,6*	32*
AFB1	25*	22,6*	19,7*	42,4*
CPA+AFB1	23*	21,4*	16,5*	38,6*

* Values with significant difference in relation to NC ($p < 0,05$)

Enterocyte proliferation, inflammatory infiltration into the epithelium and goblet cell proliferation (Figure 3) demonstrate the alterations suffered by the intestinal epithelium of the three fragments with the presence of CPA and AFB1 analyzed (Table 4). In relation to *lamina propria*, in the duodenum, mycotoxins showed no difference between the challenged groups and the NC. In the jejunum, all challenged groups presented high thickness scores and also inflammatory infiltration in the *lamina propria*, with the CPA treatment having the highest ISI number for both parameters, differing significantly from the AFB1 and CPA + AFB1 groups. In the ileum, the challenged groups presented high values for *lamina propria* thickness, but only the

CPA + AFB1 group showed significant difference for inflammatory infiltration when compared to NC (Figure 4). No oocysts or significant values for congestion were found in any treatment.

Liver

In this study, through the ISI methodology, it was observed that all challenged groups presented liver damage, but the treatments containing AFB1 presented greater organ damage than the other treatments (Figure 5).

The groups challenged with aflatoxin B1 presented more harm to the liver due to parameters of bile duct proliferation, inflammatory infiltrate, necrosis and pericholangitis (Figure 6).

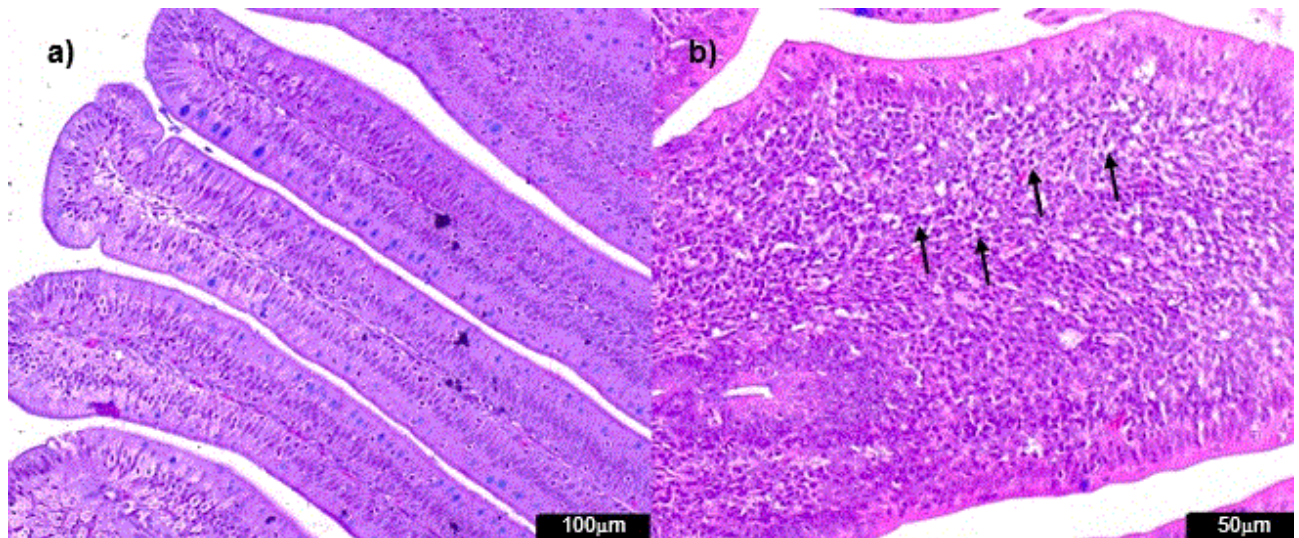


Figure 4. Photomicrographs of hematoxylin and eosin-stained chicken ileum sections. Alcian Blue was used to stain the goblet cells. a) Normal histological structure of non-challenged group NC (200x); b) lamina propria inflammatory infiltration cells (arrow) in the challenged group CPA+AFB1 (400x).

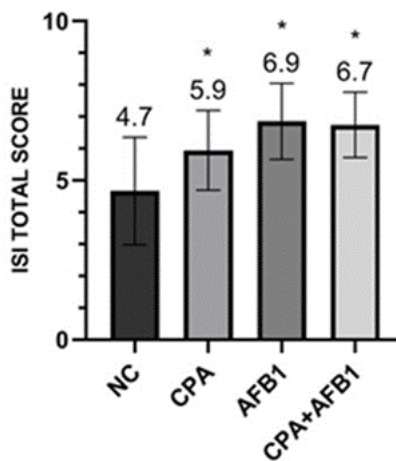


Figure 5. ISI total scores for histological liver changes in different groups. Error bars represent standard error of the mean. NC: non-challenged group, CPA: cyclopiazonic acid challenge, AFB1: aflatoxin B1 challenge and CPA+AFB1: cyclopiazonic acid and aflatoxin B1 challenge.

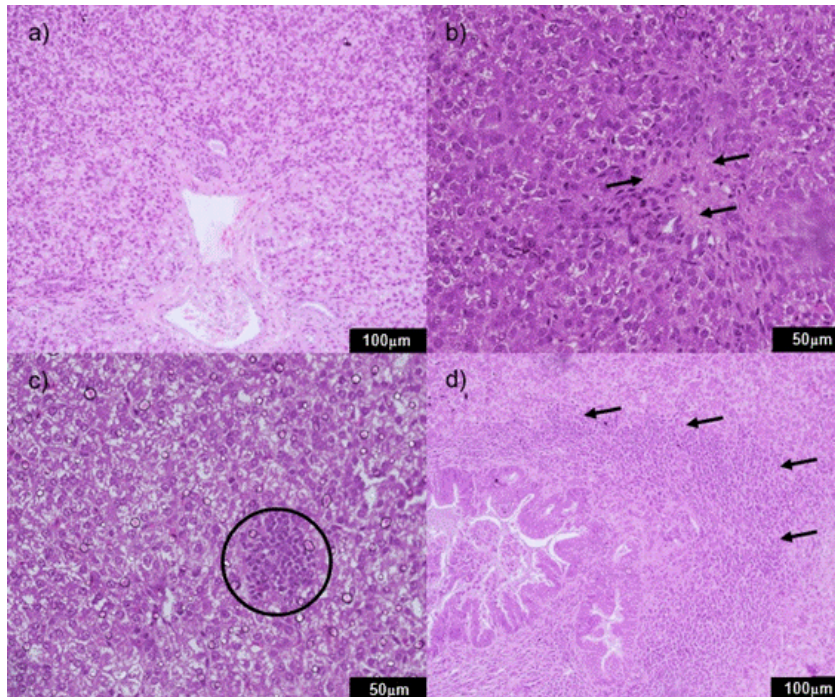


Figure 6. Photomicrographs of hematoxylin and eosin-stained chicken liver sections. a) Normal liver histological structure of non-challenged group NC (100x); b) necrosis (arrow) in the challenged group AFB1 (400x) c) inflammatory cell infiltration (circle) in the challenged group AFB1 (400x); d) pericholangitis (arrow) in the challenged group AFB1 (100x).

Discussion

The lower weight gain realized in the first days of the broiler's life corroborate with Hayashi and Yoshizawa (2005), which indicates this effect of CPA in different animal species.

This interference caused by mycotoxins presents damage both to the animal's health and to its producers. The broiler chicken is a food consumed and traded worldwide, its unregulated growth can interfere in the schedule of its breeders, generating greater expenses for the development of the bird.

Intestine

The mucosa of the gastrointestinal tract (GIT) is a link between the external environment and the internal environment of birds. Thus, the mucosa acts as a selectively permeable barrier that allows the absorption of important substances - such as nutrients - and exclusion of harmful substances - such as toxins (Perry 2006).

Several studies report effects of mycotoxins on intestinal villus morphology. The villi increase the surface absorption of water and nutrients through the intestinal wall and, because of this, abnormalities in their morphology may compromise the animal's health (Grenier and Applegate 2013).

The lesions found on the epithelium are in accordance with the study of Akinrinmade *et al.* (2016) who, when exposing mice to AFB1, found proliferation of enterocytes, inflammatory cells and other structural changes in the epithelium. Robert *et al.* (2017) point out mycotoxins as pathology inducers during their course in the GIT, which may result in disturbance of epithelial function as an intestinal barrier. Epithelial thickness increases as a result of increased goblet cells and proliferation of enterocytes.

Enterocytes and mucus produced by goblet cells are responsible for absorbing water and nutrients (Liew and Mohd-Redzwan 2018), but they also function as a physical barrier to antigens present in the digestive tract. Thus, we can assume that the high ISI values of these parameters indicate a gut defense mechanism against the presence of mycotoxins.

Müller *et al.* (2005) may corroborate elevated ISI scores for inflammatory epithelial infiltration showed by challenged groups. According to the authors, the intestine is an organ that has components of acquired immunity called gut-associated lymphoid tissue (GALT). The presence of M cells in the intestinal epithelium carries the antigen present in

the lumen to dendritic cells present in the Peyer's Patch, where the activation of defense cells against this antigen occurs. Following this activation, GALT cells produce plasma and mature T cells that are spread throughout the intestinal mucosa.

According to Olkowski *et al.* (2006) and Belote *et al.* (2018), as a consequence of bird exposure to antigens, the *lamina propria* is hyperemic and infiltrated with numerous inflammatory cells. Significant changes are mainly found at the interface of the enterocyte basal domain and *lamina propria*, which cause damage to the integrity of the intestine. In this study, the fragments behaved differently in relation to the thickness and inflammatory infiltration in the *lamina propria* due to exposure to mycotoxins. The duodenum did not present difference between challenged groups and NC while in jejunum, all challenged groups presented high thickness scores and also inflammatory infiltration, and in ileum, the challenged groups presented high values for *lamina propria* thickness, but only the CPA + AFB1 group showed significant difference for inflammatory infiltration when compared to NC.

Akinrinmade *et al.* (2016) conducted a morphological study of the intestine in the presence of AFB1. The authors not only found alterations in the intestinal epithelium, but also inflammatory infiltration in the *lamina propria*, a result that agrees with the findings of this study. Aflatoxin B1 is considered the most life-threatening mycotoxin, but its intestinal toxicity can be compared to other mycotoxins (Liew and Mohd-Redzwan 2018). Because of this, the results found in this study showed similar toxicity between CPA and AFB1 in mucosa intestinal.

Liver

Mycotoxins have several biological effects that are harmful to animal health, including hepatotoxicity. The effects of bile duct necrosis and proliferation found in this study had been previously identified in the 1960s, when aflatoxins were isolated and characterized (D'Mello and Macdonald 1997). Due to this, many studies related to AFB1 liver damage have been conducted. AFB1 is known to be mutagenic and carcinogenic in chronic intoxication and its acute effects were also previously studied (Steyn 1995). Cyclopiazonic acid does not present this variety of studies and its hepatotoxic effects still lack some clarification.

Jaskiewicz *et al.* (1988) challenged non-human primates with AFB1 and CPA, separately and simultaneously. When analyzing the liver of the animals in the CPA group, no necrosis was found.

However, there was hepatocyte necrosis in the groups containing isolated AFB1 and in association with the CPA. In this study, this result was repeated. Therefore, since we worked with another animal species, the findings showed that AFB1 is also responsible for cell necrosis in liver tissues of broilers.

Results found for aflatoxin B1 are in agreement with those reported by Ortatlati and Oguz (2001) and Saleemi *et al.* (2020), in which signs of necrosis and bile duct proliferation are identified. All parameters, when analyzed separately, did not indicate a significant difference between the CPA group and the NC group, but when summed to generate the total number of ISI for the liver, the CPA group was significantly altered ($p < 0,05$). Antony *et al.* (2003) identified CPA as potentially hepatotoxic by testing it in rats, which corroborates the results found.

According to Oliveira and Corassin (2014), the sensitivity of birds to AFB1 is due to the rapid absorption of mycotoxin by the GIT. Following this absorption, AFB1 binds rapidly to albumin and is distributed to tissues, mainly to the liver. The mycotoxins in question have harmful effects on the small intestine and liver, both alone and together. It was also concluded that mycotoxins behave differently in small intestine fragments. When the parameters of thickness and mixed inflammatory infiltrate of the *lamina propria* were analyzed, the scores were different between the challenged groups. It is known that there is a great concern regarding the contamination of commodities by AF, but it is valid that this care extends to the CPA, since it also caused damage to the contaminated birds on the small intestine and liver. The ISI method has proved to be a tool that can show which parameters have suffered the most damage according to the challenges performed. Thus, it demonstrates the ability of the tested mycotoxins to affect different areas of the intestine and liver.

Acknowledgments. Thank are given to Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences (PPGCF) and Postgraduate Program in Veterinary Sciences (PPGCV) for collaboration. We thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the financial support.

Conflict of Interest Statement: The authors declare no conflict of interest.

Source of Funding: This study was funded by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES), Brazil.

References

- Akande KE, Abubakar MM, Adegbola TA, Bogoro SE. 2006. Nutritional and Health Implications of Mycotoxins in Animal Feeds: A Review. *Pak J Nutr.* 5:398-403.
- Akinrinmade FJ, Akinrinde AS, Amid A. 2016. Changes in serum cytokine levels, hepatic and intestinal morphology in aflatoxin B1-induced injury: modulatory roles of melatonin and flavonoid-rich fractions from *Chromola odorata*. *Mycotoxin Res.* 32:53-60. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0239-9>
- Alassane-Kpembé I, Schatzmayr G, Taranu J, Marin D, Puel O, Oswald IP. 2017. Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. 2017. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57:3489-3507. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1140632>
- Antony M, Shukla Y, Janardhanan KK. 2003. Potential risk of acute hepatotoxic of kodo poisoning due to exposure to cyclopiazonic acid. *J Ethnopharmacol.* 87:211-214. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00146-6)
- Belote BL, Tujimoto-Silva A, Hümmelgen PH, Sanches AWD, Wammes JCS, Hayashi RM, Santi E. 2018. Histological parameters to evaluate intestinal health on broilers challenged with *Eimeria* and *Clostridium perfringens* with or without enramycin as growth promoter. *Poult Sci.* 97:2287-2294. <https://doi.org/10.3382/ps/pey064>
- Cazarin KCC, Corrêa CL, Zambrone FAD. 2004. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Rev Bras Cienc Farm.* 40:289-299. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322004000300004>
- D'Mello JPF, Macdonald AMC. 1997. Mycotoxins. *Anim Feed Sci Technol.* 69:155-166. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)81630-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)81630-6)
- Diaz DE. 2005. *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham: Context Products.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2004. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003 [online]. Rome: FAO. [accessed: December 7, 2020]. Available at: <http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm>
- Grenier B, Applegate TJ. 2013. Invited review—modulation of intestinal functions upon mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins.* 5:396-430. <https://doi.org/10.3390/toxins5020396>
- Hayashi Y, Yoshizawa T. 2005. Analysis of cyclopiazonic acid in corn and rice by a newly developed method. *Food Chem.* 93:215-221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.017>
- Heperkan D, Somuncuoglu S, Karbancioglu-Güler F, Mercik N. 2012. Natural contamination of cyclopiazonic acid in dried fig sand co-occurrence of aflatoxin. *Food Control.* 23:82-86. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.015>
- Jaskiewicz K, Close PM, Thiel PG, Cole RJ. 1998. Preliminary studies on toxic effects of cyclopiazonic acid alone and in combination with aflatoxin B1 in non-human primates. *Toxicol.* 52:297-307. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(88\)90134-5](https://doi.org/10.1016/0300-483x(88)90134-5)
- Kraieski AL, Hayashi RM, Sanches AWD, Almeida GC, Santin E. 2017. Effect of aflatoxin experimental ingestion and Eimeria vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. *Poult Sci.* 96:1078-1087. <https://doi.org/10.3382/ps/pew397>
- Liew WP, Mohd-Redzwan S. 2018. Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol.* 8:60. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00060>
- Márcia BA, Lázari FA. 1998. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. *Food Sci Technol.* 18:363-367. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611998000400001>
- Moldes-Anaya A, Wilkins AL, Rundberget T, Fæste CK. 2009. *In vitro* and *in vivo* hepatic metabolism of the fungal neurotoxin penitrem A. *Drug Chem Toxicol.* 32:26-37. <https://doi.org/10.1080/01480540802416232>
- Müller CA, Autenrieth IB, Peschel A. 2005. Intestinal epithelial barrier and mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci.* 62:1297. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5034-2>
- Oliveira CAF, Corassi CH. 2014. Animal Health: Mycotoxins. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems.* 1:358-377. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00200-X>

Olkowski AA, Wojnarowicz C, Chirino-Trejo M, and Drew MD. 2006. Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from field cases of necrotic enteritis. *Res Vet Sci.* 81:99-108. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.10.006>

Ortatatli M, Oguz H. 2001. Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis. *Res Vet Sci.* 71:59-66. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2001.0487>

Perry GC. 2006. *Avian Gut Function in Health and Disease*. Bristol: Cabi.

Pestka JJ, Bondy GS. 1990. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Can J Physiol Pharmacol.* 68:1009-1016. <https://doi.org/10.1139/y90-154>

Rapp W, Wurster K. 1978. Alcian blue staining intestinal goblet cell antigen (GOA): A marker for gastric signet ring cell and colonic colloidal car-

cinoma. *Klin Wochenschr.* 56:1185-1187. <https://doi.org/10.1007/bf01476863>

Robert H, Payros D, Pinton P, Théodorou V, Mercier-Bonin M, Oswald IP. 2017. Impact of mycotoxins on the intestine: are mucus and microbiota new targets? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 20:249-275. <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1326071>

Saleemi MK, Ashraf K, Gul ST, Naseem MN, Sajid MS, Mohsin M, He C, Zubair M, Khan A. 2020. Toxicopathological effects of feeding aflatoxins B1 in broilers and its amelioration within digenous mycotoxin binder. *Ecotoxicol Environ Safety.* 187:109712. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109712>

Steyn PS. 1995. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicol Lett.* 82-83:843-851. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03525-7](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03525-7)

Zain ME. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J Saudi Chem Soc.* 15:129-144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>

- Díaz-García A, Morier-Díaz L, Frión-Herrera Y, Rodríguez-Sánchez H, Caballero-Lorenzo Y, Mendoza-Llanes D, Riquenes-Garlobo Y, Fraga-Castro J A. 2013. *In vitro* anticancer effect of venom from Cuban scorpion *Rhopalurus junceus* against a panel of human cancer cell lines. *Journal of Venom Research*. 4:5-12.
- Ebaid H, Al-Tamimi J, Hassan I, Alhazza I, Al-Khalifa M. 2014. Antioxidant Bioactivity of Samsun Ant (*Pachycondyla sennaarensis*) Venom Protects against CCL 4 - Induced Nephrotoxicity in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014: 1-8. ID 763061.
- Eiseman JL, Von Bredow J, Alvares AP. 1982. Effect of honeybee (*Apis mellifera*) venom on the course of adjuvant- induced arthritis and depression of drug metabolism in the rat. *Biochemical Pharmacology*. 31(6):1139-1146.
- El-Saadani MA. 2004. A Scorpion Venom Peptide Fraction Induced Prostaglandin Biosynthesis in Guinea Pig Kidneys: Incorporation of 14 C-Linoleic Acid. *The Journal of Biochemistry*. 135(1):109-116.
- Ferraz CR, Arrahman A, Xie C, Casewell NR, Lewis RJ, Jeroen K, Kool, Cardoso FC. 2019. Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: from pain to hemorrhage and necrosis. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fevo.2019.00218>.
- Ferretti G, Bacchetti T, MasciÁngelo S, Bicchiega V. 2010. HDL- paraoxonase and Membrane Lipid Peroxidation: A Comparison Between Healthy and Obese Subjects. *Obesity*. 18(6):1079-1084.
- Forman HJ, Fukuto JM, Miller T, Zhang H, Rinna A, Levy S. 2008. The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 477(2):183-195.
- Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. 2018. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation Research*. 122(6):877-902.
- Furman BL. 2012. The development of Byetta (exenatide) from the venom of the Gila monster as an anti-diabetic agent. *Toxicon*. 59(4):464-471.
- Ghosh A, Roy R, Nandi M, Mukhopadhyay A. 2019. Scorpion venom-toxins that aid in drug development: a review. *International journal of peptide research and therapeutics*. 25(1):27-37.
- Gomes A, Giri B, Alam A, Mukherjee S, Bhattacharjee P, Gomes A. 2011. Anticancer activity of a low immunogenic protein toxin (BMP1) from Indian toad (*Bufo melanostictus*, Schneider) skin extract. *Toxicon*. 58(1):85-92.
- González JA, Vallejo JR. 2013. The scorpion in Spanish folk medicine: A review of traditional remedies for stings and its use as a therapeutic resource. *Journal of Ethnopharmacology*. 146(1):62-74
- Hamad MK, He K, Abdulrazeq HF, Mustafa AM, Luceri R, Kamal N, Ali M, Nakhla J, Herzallah MM, Mammis A. 2018. Potential uses of isolated toxin peptides in neuropathic pain relief: a literature review. *World Neurosurgery*. 113:333-347.
- Hasan HF, Radwan RR, Galal SM. 2020. Bradykinin- potentiating factor isolated from *Leiurus quinquestriatus* scorpion venom alleviates cardiomyopathy in irradiated rats via remodelling of the RAAS pathway. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 47(2):263-273.
- Hauke TJ, Herzig V. 2017. Dangerous arachnids— Fake news or reality? *Toxicon*. 138:173-183.
- He Y, Zhao R, Di Z, Li Z, Xu X, Hong W, Wu Y, Zhao H, Li W, Cao Z. 2013. Molecular diversity of Chaerilidae venom peptides reveals the dynamic evolution of scorpion venom components from Buthidae to non- Buthidae. *Journal of Proteomics*. 89:1-14.
- Hodgson WC, Isbister GK. 2009. The application of toxins and venoms to cardiovascular drug discovery. *Current Opinion in Pharmacology*. 9(2):1173-176.
- Hoffman RD. 2010. Ant venoms. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 10(4):342-6.
- Armugam A, Cher CD, Lim K, Koh DC, Howells DW, Jeyaseelan K. 2009. A secretory phospholipase A2- mediated neuroprotection and anti- apoptosis. *BMC Neuroscience*. 10:120. DOI 10.1186/1471-2202-10-120.
- Ip SW, Liao SS, Lin SY, Lin JP, Yang JS, Lin ML, Chen GW, Lu HF, Lin MW, Han SM, Chung JG. 2008. The role of mitochondria in bee venom- induced apoptosis in human breast cancer MCF7 cells. *In vivo*. 22(2):237-245.

REVISIÓN

Venenos animais como possíveis ferramentas terapêuticas contra o estresse oxidativo em diversas doenças: Revisão da Literatura Animal venoms as possible therapeutic tools against oxidative stress in several diseases: Literature Review

Silva, Maísa^{1,*}; Lima Marçal, Fernanda²; de Matos, Ione Maria¹

¹Departamento de Ciências Básicas da Vida, Universidade Federal de Juiz de Fora, campus Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil. Av. Dr. Raimundo Monteiro Rezende, 330, Centro, 35010177, Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil. ²Departamento de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, campus Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil.

* maisa.silva@ufjf.edu.br

Recibido: 6 de noviembre de 2020

Aceptado: 27 de octubre de 2022

Resumo. Venenos são substâncias tóxicas (compostas por um ou mais toxinas) que podem causar lesão fisiológica dependente da dose. As toxinas são moléculas bioativas formadas principalmente por compostos enzimáticos e não enzimático que porque provocam consequências indesejáveis nas presas, além disso, exibem atividades biológicas únicas, diversas e específicas que perturbam os processos fisiológicos normais. Entretanto, muitas toxinas, de diferentes animais, têm sido isoladas e muitas delas são consideradas ótimas ferramentas para pesquisa básica e alvos terapêuticos. Foi relatado que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na patogênese de várias doenças, como distúrbios neurodegenerativos, distúrbios cardiovasculares e câncer. O mecanismo pelo qual as toxinas animais atuam nos parâmetros de estresse oxidativo em várias doenças, ainda não está estabelecido. O foco principal desta revisão é destacar os principais estudos com toxinas animais como ferramenta terapêutica em diversas doenças, atuando no balanço redox do organismo.

Palavras-chave: Venenos; Ferramentas terapêuticas; Estresse oxidativo; Antioxidantes.

Abstract. Venoms are a toxic substance (comprised of one or more toxins) that can cause dose-dependent physiological injury. Toxins are bioactive molecules formed primarily by enzymatic and non-enzymatic compounds that cause undesirable consequences in prey, in addition, exhibit unique, diverse and specific biological activities that disrupt normal physiological processes. However, many toxins, from different animals, have been isolated and many of them are considered great tools for basic research and therapeutic targets. Oxidative stress has been reported to play a key role in the pathogenesis of various diseases such as neurodegenerative disorders, cardiovascular disorders and cancer. How animal toxins act on oxidative stress parameters in several diseases is not yet established. The main focus of this review is to highlight the main studies with animal toxins as a therapeutic tool in several diseases, acting on the organism's redox balance.

Key words: Venom; Therapeutic tools; Oxidative stress; Antioxidants.

Resumen. Los venenos son sustancias tóxicas (compuestas por una o más toxinas) que pueden causar daño fisiológico dependiente de la dosis. Las toxinas son moléculas bioactivas formadas principalmente por compuestos enzimáticos y no enzimáticos que debido a que causan consecuencias indeseables en las presas, además, exhiben actividades biológicas únicas, diversas y específicas que alteran los procesos fisiológicos normales. Sin embargo, se han aislado muchas toxinas de diferentes animales, y muchos de ellos se consideran grandes herramientas para la investigación básica y dianas terapéuticas. Se ha informado que el estrés oxidativo juega un papel clave en la patogenia de diversas enfermedades, como los trastornos neurodegenerativos, enfermedades cardiovasculares y cáncer. El mecanismo por el cual las toxinas animales actúan sobre los parámetros de estrés oxidativo en varios enfermedades, aún no está establecido. El enfoque principal de esta revisión es resaltar los principales estudios con toxinas animales como herramienta terapéutica en diversas enfermedades, actuando en el equilibrio redox del organismo.

Palabras llave: Venenos; Herramientas terapéuticas; Estrés oxidativo; Antioxidantes.

Introdução

As toxinas estão presentes em diferentes animais, plantas e microrganismos com o objetivo de interromper ou influenciar componentes essenciais

do processo fisiológico de outros organismos, o que pode trazer vantagens em sua sobrevivência e evolução. Esses venenos podem causar dor,

paralisa e até mesmo a morte de suas presas ou predadores. Essas toxinas funcionam sinergicamente ou individualmente, geralmente com grande potência (Walker 2020). A toxicidade do veneno geralmente está ligada a poucas toxinas que compõem o veneno. Apesar do nome, muitas toxinas não são tóxicas e podem ter aplicações terapêuticas (Ferraz *et al.* 2019).

Os peptídeos de toxinas animais apresentam alta especificidade e potência para alvos moleculares específicos. São compostos biologicamente ativos que muito estimulam o interesse dos pesquisadores e podem ser candidatos a fármacos extremamente valiosos. Essas substâncias quando caracterizados, possibilitam sua compreensão funcional, além de promover sua possível aplicabilidade biotecnológica (Boldrini-Franca *et al.* 2017). Existe uma enorme biblioteca natural inexplorada de compostos bioativos contidos em secreções de venenos, pois uma única secreção pode conter vários compostos diferentes, principalmente proteínas, pequenos peptídeos, mas também contêm sais e compostos orgânicos, como aminoácidos e neurotransmissores (Madio *et al.* 2017).

A secreção do veneno de muitos animais peçonhentos, como cobras, escorpiões, aranhas, insetos e anfíbios, pode ser aplicada na fabricação de agentes e/ou ferramentas para pesquisa básica e aplicada para serem usados em aplicações farmacológicas e biotecnológicas (da Silva *et al.* 2014; Peigneur e Tytgat 2018). As toxinas têm sido uma importante fonte de ferramentas moleculares para o desenvolvimento de medicamentos que visam uma variedade de condições tais como a dor crônica (Hamad *et al.* 2018), diabetes (Furman 2012), câncer (Qiao *et al.* 2017), acidente vascular cerebral (Chassagnon *et al.* 2017) e doenças autoimunes (Tarcha *et al.* 2017). Entretanto, o mecanismo de como essas toxinas ajudam no tratamento de várias doenças permanece desconhecido.

O estresse oxidativo e o efeito de antioxidantes são importantes na avaliação do estado de saúde/doença. Qualquer desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante gera estresse oxidativo que promove ou agrava várias condições fisiopatológicas, tais como envelhecimento, diabetes, câncer, doenças de Alzheimer e Parkinson (Valko *et al.* 2007; Negre-Salvayre *et al.* 2010; Matsushima *et al.* 2014; Marrocco *et al.* 2017).

Tendo em vista que o estresse oxidativo está envolvido na evolução de muitos distúrbios e que os venenos são misturas complexas de compostos

com funções farmacológicas específicas que podem ser um alvo potencial para o desenvolvimento de drogas, revisamos a participação de toxinas animais em doenças, como câncer, Parkinson, Alzheimer, toxicidade hepática e renal e artrite, atuando como possíveis ferramentas terapêuticas contra o estresse oxidativo.

Marcadores do estresse oxidativo

A definição de estresse oxidativo inclui dois mecanismos diferentes, um relacionado ao dano molecular e outro relacionado à interrupção da sinalização redox. Assim, o estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, que resulta em dano macromolecular e alteração na sinalização redox (Sies e Jones 2017).

Biomoléculas, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, podem ser irreversivelmente oxidadas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) produzidas sob estresse oxidativo (Roberts *et al.* 2010). Existem vários sistemas de defesa intracelular para evitar o aumento descontrolado de ERO/ERN. Essas espécies reativas são moléculas químicas heterogêneas que incluem radicais, como óxido nítrico (NO), ânion superóxido e radicais hidroxila. As mitocôndrias são a fonte predominante de EROs em todos os tipos de células (Musatov e Robinson 2012). As espécies reativas são geradas principalmente no nível da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou também podem ser produzidas enzimaticamente por várias enzimas ligadas à inflamação, como NADPH oxidase, óxido nítrico sintase (NOS), xantina oxidase, mieloperoxidase (MPO), lipoxigenase (LOX), e ciclooxigenase (COX) (Forrester *et al.* 2018).

Um marcador amplamente utilizado para determinar o aumento do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica (Negre-Salvayre *et al.* 2010). Este marcador pode estar presente em diversos distúrbios como doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas e envelhecimento (Niki *et al.* 2005; Forman *et al.* 2008). Reações enzimáticas ou reações em cadeia autocatalizadas desencadeadas por EROs podem promover a oxidação de lipídios. Malondialdeído (MDA) é um dos vários produtos finais de baixo peso molecular formado através da decomposição de certos produtos de peroxidação lipídica primária e secundária (Signorini *et al.* 2013). MDA constitui as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que podem reagir com dois equivalentes de ácido tiobarbitúrico dando origem a um complexo de aduto rosa, facilmente

medido por um ensaio colorimétrico ou fluorimétrico (Sousa *et al.* 2017). A paraoxonase-1 (PON-1) tem papel fundamental na defesa da peroxidação lipídica. PON 1 é uma enzima sérica ligada às lipoproteínas de alta densidade (HDL). A atividade dessa enzima mostrou ser modulada em condições de estresse oxidativo, e foi reconhecida também como um agente modulador do papel antioxidante e antiinflamatório do HDL (Ferretti *et al.* 2010).

Enzimas geradoras de EROs e sistemas de defesa antioxidante, que mudam em resposta ao aumento do estresse oxidativo, podem ser usados para avaliar o estado redox do organismo ou o estado saúde/doença de células específicas. Os sistemas antioxidantes são compostos por enzimas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX), além de moléculas não enzimáticas, como glutatona, vitaminas A, C e E e diversos antioxidantes presentes em nossa alimentação (Valko *et al.* 2007; Sies e Jones 2017). Os antioxidantes atuam nos organismos vivos por meio de diferentes mecanismos. Dentre eles, podem ser citados: a complexação de íons metálicos, a captura de radicais livres, a decomposição de peróxidos, a inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a modulação de vias de sinalização celular (Vasconcelos *et al.* 2006) (Figura 1).

A dismutação do radical superóxido em oxigênio e H_2O_2 é catalisada por uma família de enzimas chamada SOD. Essas enzimas ajudam a controlar a concentração intracelular de EROs e a manter o fluxo de H_2O_2 adequado para a regulação redox da sinalização intracelular, em conjunto com CAT e GPx (Zelko *et al.* 2002). CAT é uma proteína homotetramérica que contém quatro íons de ferro e está amplamente localizada nos peroxissomos. É uma das enzimas que catalisam a conversão de H_2O_2 em água e oxigênio (Vives-Bauza *et al.* 2007). A glutatona (GSH) também converte H_2O_2 em água e oxigênio por meio da oxidação reversível em glutatona oxidada (GSSG), pela ação da glutatona peroxidase (GPX). GSSG pode ser reciclado enzimaticamente em GSH pela atividade da glutatona redutase (GR) e pelo poder redutor de NADPH (Bachhawat e Yadav 2018) (Figura 2). A capacidade antioxidante total é definida como a concentração de oxidantes neutralizados por um litro de fluidos corporais (Apak *et al.* 2010). Vários ensaios para determinar a capacidade antioxidante total medem sua eficiência em eliminar ou reduzir radicais livres. Uma das técnicas usadas para detectar a presença de compostos antioxidantes, é um método baseado na estabilização do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), onde o composto testado fornece um elétron ao radical acorrentando a mudança de cor na amostra (Mensor *et al.* 2001). Outro método, que mede o

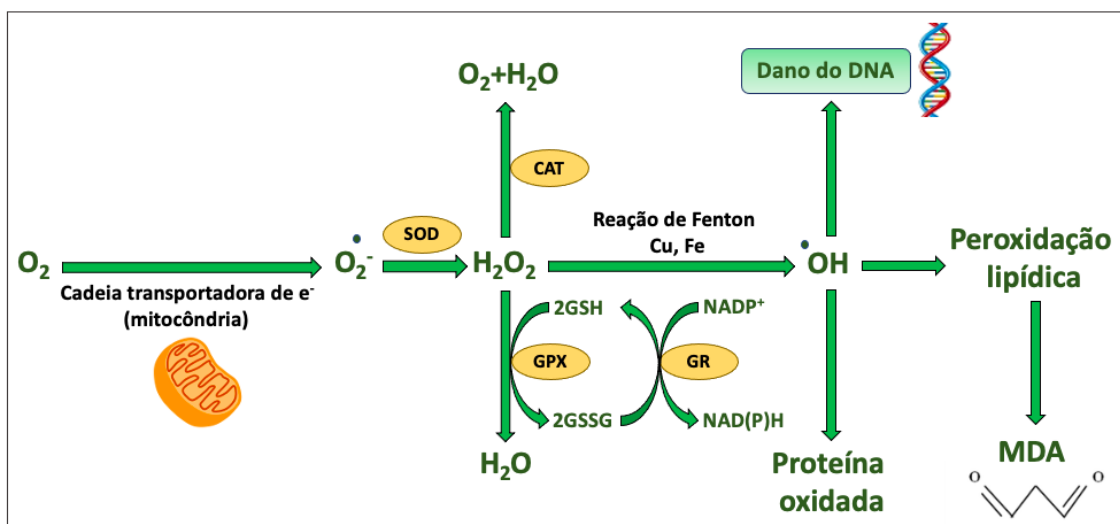


Figura 1. Várias vias de formação de EROs e sua eliminação por mecanismos de defesas antioxidantes. Abreviaturas: CAT: catalase, GSH: glutatona reduzida, GSSG: glutatona oxidada, GPx: glutatona peroxidase, GR: glutatona redutase, MDA: malondialdeído, SOD: superóxido dismutase.

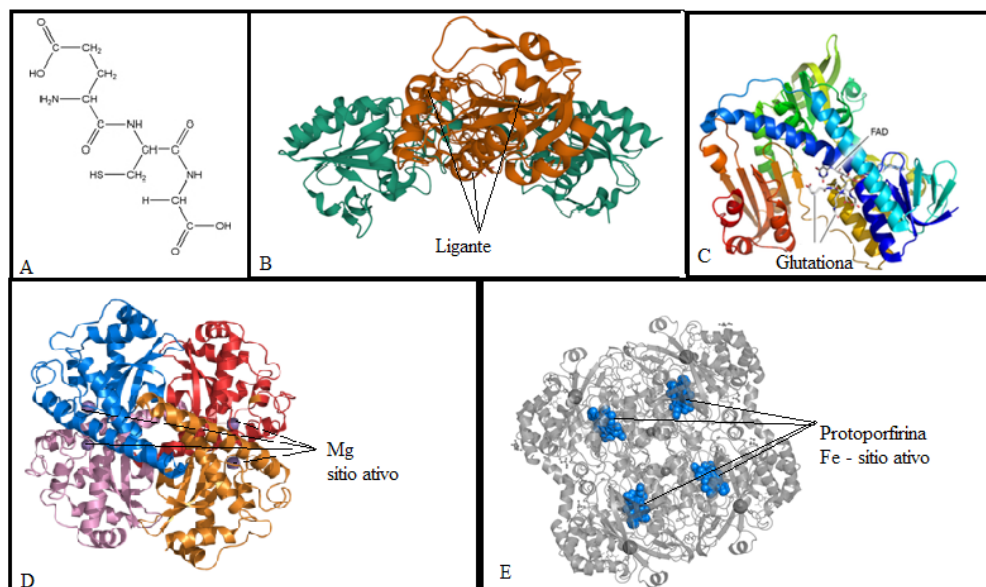


Figura 2. A: Estrutura da glutationa—disponível em <http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/AirQuality/images/Glutathione.jpg>. B: Glutationa peroxidase GPX1 adaptada do Protein Data Bank. C: Glutationa redutase 1GRE - adaptada do Protein Data Bank. D: Superóxido dismutase 2 humana adaptada do Protein Data Bank. E: Catalase adaptada do Protein Data Bank.

poder redutor dos antioxidantes é por meio da reação redox com o ferro, conhecido como potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) (Benzie e Strain 1996).

Toxinas animais como ferramentas terapêuticas contra o estresse oxidativo

Veneno de Escorpião

O escorpião é um dos mais antigos artrópodes conhecidos do reino Animalia. Eles existem na Terra há mais de 400 milhões de anos e são amplamente distribuídos em todo o mundo. Dentre as 2000 espécies descritas até hoje, a família Buthidae é mais amplamente estudada e considerada a mais perigosa para o homem (Hauke e Herzig 2017; Lourenço 2018). Venenos de escorpião têm sido usados em terapias tradicionais desde a antiguidade em diferentes países, particularmente na Índia, China, África, Cuba e Espanha (Díaz-García *et al.* 2013; González e Vallejo 2013; Khusro *et al.* 2018).

O veneno do escorpião é uma mistura complexa de neurotoxinas, cardiotoxinas, toxinas hemolíticas, peptídeos antimicrobianos, enzimas, lipídeos, nucleotídeos, mucopolissacarídeos e aminas biogênicas. Este veneno é um coquetel de compostos biologicamente ativos, principalmente de natureza proteica, compreendendo

desde pequenos peptídeos até proteínas de alta massa molecular e de múltiplos domínios, com dobramentos complexos e muitas modificações pós-traducionais (Peigneur e Tytgat 2018). Possui uma mistura complexa de aproximadamente 100 a 1000 compostos diferentes. Estes atuam em diversos alvos fisiológicos e bioquímicos do corpo da presa, causando um desequilíbrio em sua homeostase. O veneno de escorpião representa uma rica fonte de moléculas bioativas e modelos estruturais para o desenvolvimento de novos medicamentos e ferramentas biotecnológicas (Ortiz *et al.* 2015; Ahmadi *et al.* 2020).

Muitos estudos sobre os peptídeos do veneno do escorpião enfocam os mecanismos de toxicidade e seus componentes farmacológicos e bioativos. A maioria dos peptídeos são neurotoxinas e são responsáveis pela toxicidade do veneno. Outros peptídeos, incluindo peptídeos sem ponte de dissulfureto, hialuronidases, fosfolipases e enzimas inibitórias, apresentam potenciais efeitos terapêuticos anticancerígenos, antimicrobianos, analgésicos e antiepiléticos. Peptídeos de baixo peso molecular derivados do veneno de escorpião são altamente diversos em estruturas primárias e atividades biológicas e têm potencial ação terapêutica a ser explorada (Uzair *et al.* 2018; Ghosh *et al.* 2019; Ahmadi *et al.* 2020).

Nadjia e Fatima (2015), estudaram o nível de an-

tioxidantes e marcadores de estresse oxidativo em células tumorais hepáticas induzidas por micotoxina Fumonisina B1 (FB1) após tratamento com veneno de escorpião *Androctonus australis hector* e sua fração não tóxica. Os níveis de NO e MDA aumentaram significativamente com FB1, no entanto, componentes do veneno foram capazes de diminuir os níveis desses marcadores. Os níveis de GSH também foram medidos, mas o veneno não alterou seus níveis. O mecanismo pelo qual o veneno foi capaz de alterar os marcadores de estresse oxidativo não está claro, esse efeito necessita ser elucidado. Os autores também estudaram a atividade da catalase e encontraram uma redução nesta atividade promovida pelo veneno e sua fração não tóxica, sugerindo uma redução na produção de EROs, causando uma melhora no balanço redox.

O veneno do escorpião *Buthus martensii Karsch* (BmK) tem sido usado na medicina tradicional chinesa para tratar inúmeras condições por milhares de anos. A presença de peptídeos biologicamente ativos no veneno desse escorpião tem gerado grande interesse em possíveis alvos terapêuticos, como anticancer, antimicrobiano, analgésico, antiepilético e que atuam no sistema cardiovascular ou cerebrovascular (Li *et al.* 2019). Na década passada, dezenas de diferentes peptídeos BmK foram identificados, como o PESV (Extrato de Polipeptídeo de Veneno de Escorpião) que induz a inibição do crescimento e apoptose de células humanas de câncer de próstata (Zhang *et al.* 2009), o BmKn2 que possui atividade antimicrobiana (Zeng *et al.* 2012) e o peptídeo ANEP que apresenta atividade analgésica e também também mostrou atividade antiepiléptica em diferentes modelos animais (Zhang *et al.* 2001; Song *et al.* 2017).

Yin *et al.* (2014), investigando o efeito neuroprotetor do veneno de escorpião BmK na doença de Parkinson, conduziram um estudo com o peptídeo resistente ao calor do veneno de escorpião (SVHRP). Eles avaliaram se este poderia atenuar o estresse oxidativo nos neurônios do cérebro em um modelo de estudo do Parkinson em estágios iniciais. Este peptídeo reverteu significativamente os níveis aumentados de MDA e aumentou a atividade de SOD nas mitocôndrias de ratos nos estágios iniciais do Parkinson. A atividade antioxidante total e a capacidade de inibir o radical livre hidroxila foram aumentadas pela SVHRP.

Zhang *et al.* (2016) avaliaram os efeitos protetores do peptídeo SVHRP do veneno de BmK em um modelo para o estudo da doença de Alzheimer. O estudo tentou elucidar alguns dos mecanismos

envolvidos nestes efeitos em *Caenorhabditis elegans*. Devido a muitos estudos que associam o estresse oxidativo e a toxicidade da doença de Alzheimer, esses autores investigaram, *in vivo*, a atividade dos EROs nessa linhagem transgênica. A SVHRP atenuou os níveis de EROs nas células de uma maneira dose dependente. Este resultado sugere que a paralisia tardia observada neste modelo tratado com SVHRP pode estar relacionada, em parte, à diminuição de EROs. Também existe a possibilidade de que a SVHRP tenha efeitos de eliminação diretos nos EROs, uma vez que as propriedades antioxidantes da SVHRP também foram observadas em outro modelo experimental (Yin *et al.* 2014).

Os venenos de escorpião podem ser classificados em peptídeos com ligações dissulfeto e peptídeos sem ligações dissulfeto (PSPDs) (Zeng *et al.* 2005). Peptídeos aniônicos de escorpiões correspondem a PSPDs ricos em ácido aspártico e/ou ácido glutâmico em sua sequência primária, estando presentes nas famílias Buthidae e não Buthidae (He *et al.* 2013). Peptídeos aniônicos são abundantes no veneno do escorpião *Tityus stigmurus* (espécie prevalente no nordeste do Brasil) (Melo *et al.* 2016).

Melo *et al.* (2016), avaliaram a atividade biológica de um peptídeo aniônico presente no veneno do escorpião *Tityus stigmurus*, denominado TanP. Para avaliar o possível potencial antioxidante do TanP, foi realizado o teste de sequestro do radical DPPH. Os autores observaram que esse peptídeo apresentou percentual de redução do radical de aproximadamente 32%. O ácido ascórbico, usado como controle positivo, reduziu o DPPH em aproximadamente 26%. Sugerindo, preliminarmente, que TanP possui uma potente capacidade de sequestro de radicais livres, estando esta condição relacionada a uma provável atividade antioxidante do peptídeo.

Os venenos animais contêm uma variedade de toxinas altamente seletivas e potentes. Em particular, vários desses componentes do veneno (por exemplo, peptídeos potenciadores da bradicinina, sarafotoxinas e peptídeos natriuréticos) têm efeitos profundos no sistema cardiovascular (Hodgson e Isbister 2009). A bradicinina e seus peptídeos relacionados são amplamente distribuídos em animais peçonhentos, incluindo escorpiões, serpentes e venenos de águas-vivas (Camargo *et al.* 2012). Foi demonstrado que o veneno do escorpião egípcio, *Buthus occitanus*, contém uma fração de peptídeo com atividade potenciadora da bradicinina (El-Saadani 2004). Bekheet *et al.* (2011), conduziram um estudo para

investigar se o tratamento com fator de potenciação da bradicinina (BPF) isolado do veneno do escorpião *Buthus occitanus* oferece efeitos benéficos na reversão do estresse oxidativo induzido pelo cádmio no fígado e rim de ratos. Eles descobriram que a exposição ao estresse oxidativo causou um aumento significativo no nível de MDA e uma diminuição significativa ou inibição nas atividades de GSH, SOD e CAT. Porém, quando o cádmio foi adicionado com BPF, induziu uma diminuição significativa no nível de MDA e um aumento nas atividades de GSH, SOD e CAT.

Bekheet *et al.* (2013), investigaram os efeitos protetores do BPF isolado do veneno de escorpião, *Buthus occitanus*, no modelo de rato com hepatotoxicidade e nefrotoxicidade induzidas por gentamicina. Ratos induzidos por gentamicina mostraram um aumento no MDA sérico, que indica um aumento na geração de radicais livres. Como o BPF impediu o aumento do MDA sérico, parece que esses resultados estão relacionados à propriedade antioxidante do BPF. Além disso, o BPF aumentou as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx em animais com hepatotoxicidade induzida por gentamicina. Isso sugere que a redução do estresse oxidativo neste cenário desempenha um papel no mecanismo de seu efeito hepatoprotetor.

Salman *et al.* (2016), investigaram o efeito do BPF, do escorpião *Buthus occitanus*, na toxicidade hepática e renal induzida pelo cloreto de mercúrio em ratos. O nível de MDA aumentou significativamente e diminuiu as atividades de SOD, CAT e GSH-Px em tecidos de fígado e rins de ratos tratados com HgCl₂. Estas alterações foram revertidas com a administração do BPF, o que pode sugerir uma redução na produção de radicais livres.

Hasan *et al.* (2020), avaliaram se o BPF isolado do veneno de escorpião *Leiurus quinquestriatus* poderia atuar como um modulador natural no dano cardíaco induzido por radiação. Eles observaram uma diminuição significativa nos níveis de GSH e FRAP e um aumento significativo no nível de MDA após a exposição à radiação. BPF normalizou os níveis de GSH e FRAP e reduziu os níveis de MDA. Esses achados podem apontar para uma redução na produção de radicais livres promovida pela administração de BPF.

Secreções de anuro

Os anfíbios, em sua evolução, desenvolvem segmentos cutâneos com compostos bioativos que atuam como mecanismos de defesa contra predadores e microrganismos (Meng *et al.* 2016). Far-

macologicamente, essas substâncias, presentes em as glândulas cutâneas e parotoideas, podem ser neurotóxicas, cardiotoxinas, hemotóxicas ou miotóxicas e causar efeitos anestésicos, hipotensores e/ou hipertensivos (Sakate e Oliveira 2000). Componentes das glândulas dos sapos são usados para tratar vários tipos de câncer, como de próstata, fígado e leucemia (Yeh *et al.* 2003; Gomes *et al.* 2011) e também usados como agentes terapêuticos na medicina tradicional chinesa, bem como em outros países asiáticos (Chow *et al.* 2003).

As principais toxinas da secreção de sapos são classificadas em dois grupos: derivados de esteróides e compostos básicos. No primeiro estão os bufadienolidos e bufotoxinas; no segundo, aminas biogênicas e bufoteninas. Os derivados esteróides são responsáveis pelos efeitos cardiotoxicos e os compostos básicos atuam no sistema nervoso autônomo simpático e no sistema nervoso central (Cao *et al.* 2019).

Baldo *et al.* (2016), avaliaram a capacidade da fração de baixo peso molecular da secreção do sapo *Rhinella schneideri* denominada VR em reduzir espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. A fração VR apresentou efeito protetor contra a produção de EROs. Essa característica protetora é muito relevante, uma vez que a VR demonstrou não causar danos (citotoxicidade) nesta organela e, portanto, exercer apenas o efeito benéfico de proteção contra o estresse oxidativo. Para tentar elucidar por quais mecanismos ocorre essa proteção, Baldo *et al.* realizaram testes para avaliar os efeitos do VR sobre a oxidação de NAD(P)H e também para avaliar seus efeitos sobre os níveis de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada. Os dados obtidos no estudo indicam que o VR não interferiu no processo de oxidação do NAD(P)H e nenhuma proteção ocorreu contra a oxidação da glutathiona. Portanto, o VR não foi capaz de interferir neste sistema antioxidante nas concentrações utilizadas, o que sugere não ser esse o processo pelo qual o VR é capaz de diminuir a formação de EROs. Assim, o mecanismo permanece desconhecido.

Veneno de serpente

O veneno de serpente é uma secreção glandular que as mesmas usam para imobilizar e digerir suas presas. Também é usado como uma ferramenta defensiva e de sobrevivência (Waheed *et al.* 2017). Essa mistura letal é composta por aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, lipídios, proteínas e peptídeos. O avanço tecnológico e o contínuo interesse em toxinas têm apoiado a descoberta

de um grande número de peptídeos de veneno de serpentes. Eles podem ser usados diretamente ou como compostos principais para a descoberta de drogas e pesquisas de desenvolvimento de fármacos, pois são fáceis de sintetizar e menos propensas a induzir uma resposta imune (Munawar *et al.* 2018). Os peptídeos do veneno de serpentes são classificados em famílias distintas com base nas semelhanças estruturais e funcionais na organização dessas moléculas.

Querobino *et al.* (2018 e 2019), estudaram a fração de baixo peso molecular do veneno da serpente *Bothrops jararaca*. Esta fração contém peptídeos ricos em prolina (Bj-PROs), que são conhecidos como BPPs. Eles têm um efeito neuroprotetor contra o estresse oxidativo induzido por H_2O_2 . Os autores demonstraram que Bj-PRO-5a é um peptídeo neuroprotetor que diminui a peroxidação lipídica, a produção de EROs e o aumento dos níveis de NO causados pela exposição ao H_2O_2 (Querobino *et al.* 2018). Querobino *et al.* (2019), verificaram que os peptídeos Bj-PRO-5a e Bj-PRO-7a apresentaram efeito neuroprotetor contra o estresse oxidativo induzido por H_2O_2 , reduzindo o dano celular e a morte das células SH-SY5Y. Além disso, a capacidade antioxidante foi medida usando o método de eliminação de radicais livres DPPH. Entretanto, esta atividade não foi detectada pelos peptídeos Bj-PRO-5a e Bj-PRO-7a. Este resultado sugere que esses peptídeos não têm propriedades de eliminação direta de radicais livres. O mecanismo de ação sobre o estresse oxidativo ainda precisa ser esclarecido.

Veneno de Abelha

As toxinas de insetos têm uma grande variedade de produtos químicos, como pequenas moléculas, poliaminas e toxinas peptídicas (Kachel *et al.* 2018). O veneno de abelha é composto por vários peptídeos ativos, incluindo melitina, fosfolipase A2, apamina, adolapina e peptídeo degranulador de mastócitos (Eiseman *et al.* 1982). Apamina, fosfolipase A2 e melitina têm efeito neuroprotetor (Armugam *et al.* 2009; Alvarez-Fischer *et al.* 2013) e a adolapina tem um efeito antiinflamatório (Koburova *et al.* 1985). O veneno de abelha tem sido usado na medicina oriental para tratar algumas doenças neurodegenerativas (Cho *et al.* 2012) e doenças relacionadas à imunidade, como artrite reumatóide (Kwon *et al.* 2002). Ele também aumenta a ativação da via de sinalização apoptótica em linhas de células de câncer de mama e pulmão (Chu *et al.* 2007; Ip *et al.* 2008). Khalil *et al.* (2015) desenvolveram um estudo para avaliar o efeito neuroprotetor da terapia com

acupuntura com veneno de abelha (BVA) contra o estresse oxidativo induzido por rotenona, neuroinflamação e apoptose no modelo de camundongo com doença de Parkinson. Os autores encontraram um aumento significativo nos níveis de MDA no cérebro de animais tratados com rotenona. O uso de rotenona com BVA diminuiu esses níveis aos valores encontrados para o grupo controle. A atividade de PON1 e os níveis de GSH no cérebro diminuíram significativamente no grupo que recebeu rotenona, porém o tratamento com BVA reverteu estes efeitos. Esse efeito também foi descrito no estudo de Choi *et al.* (2009), em que o BVA protegeu os neurônios dopaminérgicos contra o dano oxidativo em camundongos intoxicados por MPTP. Esses achados sugerem a terapia com BVA pode ser uma nova abordagem no tratamento da doença de Parkinson ou uma terapia adjuvante com outros tratamentos. Badr *et al.* (2016), investigaram o impacto do veneno de abelha na cicatrização de feridas promovida pelo diabetes em camundongos. Este estudo mostrou que o tecido de camundongos diabéticos tratados com veneno de abelha apresentou níveis mais baixos de EROs, peróxido de hidrogênio e NO, o que pode sugerir uma possível atividade antioxidante desse veneno.

Sobral *et al.* (2016), também investigaram cinco amostras de veneno de abelha obtidas de *Apis mellifera iberiensis* do Nordeste de Portugal, caracterizadas quimicamente e avaliadas quanto às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e citotóxicas. O veneno de abelha provou ter a maior atividade de eliminação de radicais livres, poder redutor, inibição da peroxidação lipídica e também a maior capacidade de inibir a produção de NO. Todas as amostras revelaram atividade antioxidante, mas sem relação direta com qualquer um dos componentes químicos individuais identificados.

Mohamed *et al.* (2019), examinaram o efeito do veneno de abelha na ulceração aguda induzida por ácido acetilsalicílico (AAS) em ratos. O grupo tratado por via oral com AAS apresentou elevações marcantes nos níveis de MDA e diminuições significativas na atividade gástrica de GSH e SOD. No entanto, o grupo tratado com AAS e veneno de abelha mostrou reduções marcantes nos níveis de MDA e restauração significativa da atividade de GSH e SOD. Esses achados indicam que o efeito gastroprotetor do veneno de abelha contra a ulceração induzida pelo AAS em ratos é mediado por suas propriedades antioxidantes. Kocyigit *et al.* (2019), avaliaram os efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antígenotóxicos e

imunomoduladores do veneno de abelha melífera (HBV) na artrite induzida em ratos. Eles verificaram que o nível do estado oxidante total do plasma e o índice de estresse oxidativo foram significativamente maiores e os níveis do estado de antioxidante total do plasma foram menores em animais com artrite do que nos saudáveis. Tanto o status oxidante total quanto o índice de estresse oxidativo diminuíram significativamente após a terapia com baixa dose de HBV, enquanto os níveis plasmáticos de status antioxidante total aumentaram. No entanto, o nível do status oxidante total e o índice de estresse oxidativo começaram a aumentar com o aumento das doses de HBV. Eles concluíram que o tratamento com HBV tem efeitos antioxidantes em ratos com artrite reumatóide. Entretanto, a dose administrada de HBV é fundamental para obter os melhores resultados quando utilizada como agente terapêutico e mais trabalhos são necessários para otimizar a dose de tratamento do HBV e esclarecer seu mecanismo de ação.

Outras espécies

Algumas espécies de formigas podem produzir veneno com até 75 componentes diferentes (Hoffman 2010). O gênero *Pachycondyla* é encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais e inclui a formiga Samsun (*P. sennaarensis*) (Klotz *et al.* 2005). Existem estudos sobre o potencial terapêutico do veneno *P. sennaarensis*, com significativo efeito antitumoral nas células do câncer de mama (Badr *et al.* 2012) e propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e melhora da função dos sistemas imunológico e hepático (Kou *et al.* 2005). Ebaid *et al.* (2014), avaliaram se o veneno da formiga Samsun (SAV) poderia influenciar os efeitos da exposição ao tetracloreto de carbono no status oxidativo e na função renal. Os resultados encontrados indicaram melhora da atividade de SOD e CAT e do nível de GSH devido ao SAV, embora o efeito tenha sido significativo apenas em doses mais elevadas. Mais investigações são necessárias, portanto, para descobrir a dose mais eficiente de SAV em relação aos marcadores de estresse oxidativo.

A Vespa, *Velutina nigrithorax*, é uma espécie exótica da Ásia que foi acidentalmente introduzida na Europa (Monceau *et al.* 2014). Geralmente, o veneno da vespa compreende vários compostos bioativos potenciais: compostos de baixo peso molecular (bioaminas, como histamina, tiramina e catecolamina (Russell 1988) ou fermônios, tais como cetonas alifáticas e álcoois (Ya-Nan *et al.* 2017), peptídeos (ocupando até 70% do veneno seco, sendo os peptídeos mais populares o

mastoparan e as cininas de vespa) e proteínas (neurotoxinas, proteases, fosfolipases) (Russell 1988). A propriedade antioxidante e os compostos responsáveis por esta propriedade do veneno de *V. velutina* têm sido estudados em Le *et al.* (2020). A fim de confirmar o envolvimento dessas moléculas no mecanismo antioxidante, os compostos identificados foram testados em ensaios DPPH e EROs em células HaCaT expostas ao UVB. Eles demonstraram que esse veneno apresentou capacidade de inibição de EROs intracelulares em baixa concentração sem citotoxicidade. Também identificou a serotonina como o principal composto ativo responsável pela atividade de eliminação de radicais livres neste veneno.

Conclusões e perspectivas futuras

Os venenos têm sido uma fonte importante de ferramentas moleculares para o desenvolvimento de drogas que podem ser aplicadas em variadas condições. A literatura científica revisada aqui mostra vários exemplos de toxinas de venenos animais promissores que podem se tornar candidatas potenciais para o futuro tratamento de doenças com elevado estresse oxidativo. E, se os dados observados *in vitro* e em modelos experimentais se traduzirem bem para o ambiente clínico, pode realmente haver uma grande promessa na exploração dos benefícios das toxinas dos venenos de animais. Muitos venenos são capazes de alterar marcadores do estresse oxidativo, porém investigações futuras são necessárias para descobrir a dose mais eficiente em relação a estes marcadores, quais componentes são responsáveis por este efeito e o mecanismo de como essas toxinas atuam na regulação do balanço redox. Assim, estudos posteriores, em diversos modelos experimentais, são importantes para esclarecer a relação entre estresse oxidativo e toxinas de venenos animais.

Agradecimentos. Este estudo teve apoio de bolsas de iniciação científica VIC/UFJF.

Referências bibliográficas

Ahmadi S, Knerr JM, Argemi L, Bordon KCF, Pucca MB, Cerni FA, Arantes EC, Çalişkan F, Laustsen AH. 2020. Scorpion venom: detriments and benefits. *Biomedicine*. 8(5):118. <https://doi.org/10.3390/biomedicine8050118>

Alvarez-Fischer D, Noelker C, Vulinovic F, Grunewald A, Chevarin C, Klein C, Oertel WH, Hirsch EC, Michel PP, Hartmann A. 2013. Bee Venom and Its Component Apamin as Neuroprotective Agents

in a Parkinson Disease Mouse Model. (Research Article). PLoS ONE. 8(4):e61700.

Apak R, Güçlü K, Ozyürek M, Bektaşoğlu B, Bener M. 2010. Cupric ion reducing antioxidant capacity assay for antioxidants in human serum and for hydroxyl radical scavengers. *Methods Mol Biol.* 594:215-239.

Bachhawat AK, Yadav S. 2018. The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the γ -glutamyl cycle. *Iubmb Life.* 70(7):585-592.

Badr G, Garraud O, Daghestani M, Al-Khalifa MS, Richard Y. 2012. Human breast carcinoma cells are induced to apoptosis by samsun and venom through an IGF- 1- dependant pathway, PI3K/ AKT and ERK signaling. *Cellular Immunology.* 273:6-10.

Badr G, Hozzein WN, Badr BM, Al Ghamdi A, Saad Eldien HM, Garraud O. 2016. Bee Venom Accelerates Wound Healing in Diabetic Mice by Suppressing Activating Transcription Factor- 3 (ATF- 3) and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)-Mediated Oxidative Stress and Recruiting Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells. *Journal of Cellular Physiology.* 231:2159-2171.

Baldo ECF. 2016. Estudo das atividades antineoplásicas, citotóxicas genotóxicas de toxinas isoladas do veneno de *Rhinella schneideri*. Doctoral Thesis in Toxicologia. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Bekheet SHM, Awadalla EA, Salman MM, Hassan MK. 2011. Bradykinin potentiating factor isolated from *Buthus occitanus* venom has a protective effect against cadmium- induced rat liver and kidney damage. *Tissue and Cell.* 43(6):337-343.

Bekheet SHM, Awadalla EA, Salman MM, Hassan MK. 2013. Prevention of hepatic and renal toxicity with bradykinin potentiating factor (BPF) isolated from Egyptian scorpion venom (*Buthus occitanus*) in gentamicin treated rats. *Tissue and Cell.* 45(2):89-94.

Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry.* 239(1):70-76.

Boldrini-Franca J, Cologna CT, Pucca MB, Bordon KC, Amorim FG, Anjolette FA, Cordeiro FA, Wiesel GA, Cerni FA, Pinheiro-Junior EL, Shibao

PY, Ferreira IG, de Oliveira IS, Cardoso IA, Arantes EC. 2017. Minor snake venom proteins: Structure, function and potential applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 1861(4):824-838.

Camargo ACM, Ianzer D, Guerreiro JR, Serrano SMT. 2012. Bradykinin- potentiating peptides: Beyond captopril. *Toxicon.* 59(4):516-523.

Cao Y, Wu J, Pan H, Wang L. 2019. Chemical profile and multicomponent quantitative analysis for the quality evaluation of toad venom from different origins. *Molecules.* 24(19):3595. DOI: 10.3390/molecules24193595.

Chassagnon IR, McCarthy CA, Chin YKY, Pineda SS, Keramidias A, Mobli M, Pham V, De Silva TM, Lynch JW, Widdop RE, Rash LD, King GF. 2017. Potent neuroprotection after stroke afforded by a double- knot spider- venom peptide that inhibits acid- sensing ion channel 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 114(14):3750-3755.

Cho SY, Shim SR, Rhee HY, Park HJ, Jung WS, Moon, SK, Park JM, Ko CN, Cho KH, Park SU. 2012. Effectiveness of acupuncture and bee venom acupuncture in idiopathic Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders.* 18(8):948-952.

Choi YG, Park JH, Lim S. 2009. Acupuncture inhibits ferric iron deposition and ferritin- heavy chain reduction in an MPTP- induced parkinsonism model. *Neuroscience Letters.* 450(2):92-96.

Chow L, Johnson M, Wells A, Dasgupta, A. 2003. Effect of the traditional chinese medicines Chan Su, Lu- Shen- Wan, Dan Shen, and Asian Ginseng on Serum Digoxin measurement by Tina- quant (Roche) and Synchron LX system (Beckman) digoxin immunoassays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 17(1):22-27.

Chu ST, Cheng HH, Huang CJ, Chang HC, Chi CC, Su HH, Hsu SS, Wang JL, Chen IS, Liu SI, Lu YC, Huang JK, Ho CM, Jan CR. 2007. Phospholipase A2- independent Ca²⁺ entry and subsequent apoptosis induced by melittin in human MG63 osteosarcoma cells. *Life Sciences.* 80(4):364-369.

Da Silva SL, Rowan EG, Albericio F, Stábeli RG, Calderon LA, Soares AM. 2014. Animal toxins and their advantages in biotechnology and pharmacology. *Biomed Res Int.* 2014: artículo ID951561.

- Kachel HS, Buckingham SD, Sattelle DB. 2018. Insect toxins - selective pharmacological tools and drug/chemical leads. *Curr Opin Insect Sci.* 30:93-98.
- Khalil WK, Assaf N, ElShebiney SA, Salem NA. 2015. Neuroprotective effects of bee venom acupuncture therapy against rotenone-induced oxidative stress and apoptosis. *Neurochem Int.* 80:79-86.
- Khusro A, Aarti C, Barbabosa-Pliego A, Rivas-Cáceres RR., Cipriano-Salazar M. 2018. Venom as therapeutic weapon to combat dreadful diseases of 21st century: A systematic review on cancer, TB, and HIV/ AIDS. *Microbial Pathogenesis.* 125:96-107.
- Klotz JH, Deshazo RD, Pinnas JL, Frishman AM, Schmidt JO, Suiter DR, Price GW, Klotz SA. 2005. Adverse reactions to ants other than imported fire ants. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology.* 95(5):418-25.
- Koburova KL, Michailova SG, Shkenderov SV. 1985. Further investigation on the antiinflammatory properties of adolapin bee venom polypeptide. *Acta Physiol Pharmacol Bulg.* 11(2):50-55.
- Kocyigit A, Guler E M, Kaleli S. 2019. Anti-inflammatory and antioxidative properties of honey bee venom on Freund's Complete Adjuvant-induced arthritis model in rats. *Toxicon.* 161:4-11.
- Kou J, Ni Y, Li N, Wang J, Liu L, Jiang ZH. 2005. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Total Extract and Individual Fractions of Chinese Medicinal Ants *Polyrhachis lamellidens*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 28(1):176-180.
- Kwon YB, Lee HJ, Han HJ, Mar WC, Kang SK, Yoon OB, Beitz AJ, Lee JH. 2002. The water-soluble fraction of bee venom produces antinociceptive and anti-inflammatory effects on rheumatoid arthritis in rats. *Life Sciences.* 71(2):191-204.
- Le TN, Da Silva D, Colas C, Darrouzet E, Baril P, Leseurre L, Maunit B. 2020. Asian hornet *Vespa velutina nigrithorax* venom: Evaluation and identification of the bioactive compound responsible for human keratinocyte protection against oxidative stress. *Toxicon.* 176:1-9.
- Li Z, Hu P, Wu, Wang Y. 2019. Peptides with therapeutic potential in the venom of the scorpion *Buthus martensii Karsch*. *Peptides.* 115:43-50.
- Lourenço WR. 2018. The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones). *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases.* 24:1. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0138-3>.
- Madio B, Undheim EAB, King GF. 2017. Revisiting venom of the sea anemone *Stichodactyla haddoni*: Omics techniques reveal the complete toxin arsenal of a well-studied sea anemone genus. *Journal of Proteomics.* 166:83-92.
- Marrocco I, Altieri F, Peluso I. 2017. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 6501046. doi: 10.1155/2017/6501046.
- Matsushima S, Tsutsui H, Sadoshima J. 2014. Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 24(5):202-205.
- Melo MMA. 2016. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- Meng Q, Yau LF, Lu JG, Wu ZZ, Zhang BX, Wang JR, Jiang ZH. 2016. Chemical profiling and cytotoxicity assay of bufadienolides in toad venom and toad skin. *Journal of ethnopharmacology.* 187:74-82.
- Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Santos TCD, Coube CS, Leitão SG. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research.* 5(2):127-130.
- Mohamed WA, Abd-Elhakim YM, Ismail SAA. 2019. Involvement of the anti-inflammatory, anti-apoptotic, and anti-secretory activity of bee venom in its therapeutic effects on acetylsalicylic acid-induced gastric ulceration in rats. *Toxicology.* 419:11-23.
- Monceau K, Bonnard O, Thiery D. 2014. *Vespa velutina*: a new invasive predator of honeybees in Europe. *Journal Of Pest Science.* 87:1-16.
- Munawar A; Ali SA; Akrem A.; Betzel Ch. 2018. Snake Venom Peptides: Tools of Biodiscovery. *Toxins.* 10(11):474. <https://doi.org/10.3390/toxins10110474>.

- Musatov A, Robinson NC. 2012. Susceptibility of mitochondrial electron- transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. Free Radical Research. 46(11):1313-1326.
- Nadjia B, Fatima, LD. 2015. Beneficial effects of *Androctonus australis* hector venom and its non-toxic fraction in the restoration of early hepatocyte- carcinogenesis induced by FB1 mycotoxin: Involvement of oxidative biomarkers. Experimental and Molecular Pathology. 99(2):198-206.
- Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, Chapple S, Cohen G, Feher J, Grune T, Lengyel G, Mann GE, Pamplona R, Poli G, Portero-Otin M, Riahi Y, Salvayre R, Sasson S, Serrano J, Shamni O. 2010. Pathological aspects of lipid peroxidation. 44(10):1125-1171.
- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. 2005. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochemical and Biophysical Research Communications. 338(1):668-676.
- Ortiz E, Gurrola GB, Schwartz EF, Possani LD. 2015. Scorpion venom components as potential candidates for drug development. Toxicon. 93:125-135.
- Peigneur S, Tytgat J. 2018. Toxins in Drug Discovery and Pharmacology. Toxins (Basel). 10(3):126. 10.3390/toxins10030126.
- Qiao W, Zhao L, Wu S, Liu C, Guo L, Xing Y, Zhao J. 2017. SPECT imaging and radionuclide therapy of glioma using ¹³¹I labeled *Buthus martensii* Karsch chlorotoxin. Journal of Neuro-Oncology. 133(2):287-295.
- Querobino SM, Costa MS, Alberto-Silva C. 2019. Protective effects of distinct proline-rich oligopeptides from *B. jararaca* snake venom against oxidative stress-induced neurotoxicity. Toxicon. 167:29-37.
- Querobino SM, Ribeiro CAJ, Alberto-Silva C. 2018. Bradykinin-potentiating PEPTIDE-10C, an argininosuccinate synthetase activator, protects against H₂O₂- induced oxidative stress in SH-SY5Y neuroblastoma cells. Peptides. 103:90-97.
- Roberts RA, Smith RA, Safe S, Szabo C, Tjalzens RB, Robertson FM. 2010. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. Toxicology. 276(2):85-94.
- Russell FE. 1988. Venoms of the hymenoptera: Biochemical, pharmacological and behavioral aspects. London: Academic Press (1986).
- Sakate M, Oliveira PCLD. 2000. Toad envenoming in dogs: effects and treatment. Journal of Venomous Animals and Toxins. 6(1):52. <https://doi.org/10.1590/S0104-79302000000100003>.
- Salman MMA, Kotb AM, Haridy MAM, Hammad S. 2016. Hepato- and nephroprotective effects of bradykinin potentiating factor from scorpion (*Buthus occitanus*) venom on mercuric chloride-treated rats. EXCLI J. 15:807-816.
- Sies Berndt C, Jones D. 2017. Oxidative stress. Annu Rev Biochem. 86:715-745.
- Signorini C, De Felice C, Durand T, Oger C, Galano JM, Leoncini S, Pecorelli A, Valacchi G, Ciccoli L, Hayek J. 2013. Isoprostanes and 4-Hydroxy-2-nonenal: Markers or Mediators of Disease? Focus on Rett Syndrome as a Model of Autism Spectrum Disorder. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2013:343824. DOI: 10.1155/2013/343824.
- Sobral F, Sampaio A, Falcão S, Queiroz MJ, Calheilha RC, Vilas-Boas M, Ferreira IC. 2016. Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. Food Chem Toxicol. 94:172-177.
- Song Y, Liu Z, Zhang Q, Li C, Jin W, Liu L, Zhang J, Zhang J. 2017. Investigation of binding modes and functional surface of scorpion toxins ANEP to sodium channels 1.7. Toxins (Basel). 9(12):387. doi: 10.3390/toxins9120387.
- Sousa BC, Pitt AR., Spickett CM. 2017. Chemistry and analysis of HNE and other prominent carbonyl- containing lipid oxidation compounds. Free Radical Biology and Medicine. 111:294-308.
- Tarcha EJ, Olsen CM, Probst P, Peckham D, Munoz-Elias EJ, Kruger JG, Iadonato SP. 2017. Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial. (Research Article)(Report). PLoS ONE.2(7):e0180762.
- Uzair B, Bint-E-Irshad S, Khan BA, Azad B, Mahmood T, Rehman MU, Braga VA. 2018. Scorpion venom peptides as a potential source for human drug candidates. Protein Pept Lett. 25(7):702-708.

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 39(1):44-84.
- Vasconcelos SML, Silva MAM, Goulart MOF. 2006. Pró-antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dieta: estrutura e função. *Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* 31(3):95-118.
- Vives-Bauza C, Starkov A, Garcia-Arumi E. 2007. Measurements of the antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. *Methods Cell Biol.* 80:379-93.
- Waheed H, Moin SF, Choudhary MI. 2017. Snake venom: from deadly toxins to life-saving therapeutics. *Curr Med Chem.* 24(17):1874-1891.
- Walker AA. 2020. The evolutionary dynamics of venom toxins made by insects and other animals. *Biochemical Society Transactions.* 48(4):1353-1365.
- Ya-Nan C, Wen P, Shi-Hao D., Tan K, Nieh J. 2017. Poison and alarm: the Asian hornet *Vespa velutina* uses sting venom volatiles as an alarm pheromone. *Journal of Experimental Biology.* 220(4):645-651.
- Yeh JY, Huang WJ, Kan SF, Wang PS. 2003. Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. *Prostate.* 54(2):112-124.
- Yin SM, Zhao D, Yu DQ, Li SL, An D, Peng Y, Xu H, Sun YP, Wang DM, Zhao J, Zhang WQ. 2014. Neuroprotection by scorpion venom heat resistant peptide in 6-hydroxydopamine rat model of early-stage Parkinson's disease. *Sheng Li Xue Bao.* 66(6):658-666. DOI: 10.13294/j.aps.2014.0078.
- Zelko I, Mariani T, Folz R. 2002. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn- SOD (SOD1), Mn- SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology And Medicine.* 33(3):337-349.
- Zeng XC, Wang S, Nie Y, Zhang L, Zeng XC, Wang S, Nie Y, Zhang L, Luo X. 2012. Characterization of BmKbpbp, a multifunctional peptide from the Chinese scorpion *MesoButhus martensii Karsch*: gaining insight into a new mechanism for the functional diversification of scorpion venom peptides. *Peptides.* 33(1):44-51.
- Zeng XC, Corzo G, Hahin R. 2005. Scorpion Venom Peptides without Disulfide Bridges. *IUBMB Life.* 57(1):13-21.
- Zhang JH, Hua ZC, Xu Z, Zheng WJ, Zhu DX. 2001. Expression of anti-neuroexcitation peptide (ANEP) of scorpion *Buthus martensii Karsch* in *Escherichia coli*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology.* 31(1):49-57.
- Zhang XG, Wang X, Zhou TT, Wu XF, Peng Y, Zhang WQ, Li S, Zhao J. 2016. Scorpion Venom Heat-Resistant Peptide Protects Transgenic *Caenorhabditis elegans* from β -Amyloid Toxicity. *Front Pharmacol.* 7:227. DOI: 10.3389/fphar.2016.00227.
- Zhang YY, Wu LC, Wang ZP, Wang ZX, Jia Q, Jiang GS, Zhang WD. 2009. Anti-proliferation effect of polypeptide extracted from scorpion venom on human prostate cancer cells *in vitro*. *J Clin Med Res.* 1(1):24-31.

ARTÍCULO ESPECIAL

Los acúfenos de Miguel Ángel y su relación con la toxicología Miguel Ángel's *tinnitus* and its relation to toxicology

Werner, Antonio; Scarlato, Eduardo.

Servicio de Toxicología del Hospital de Clínicas "José de San Martín". Universidad de Buenos Aires. Argentina.

antoniofedericowerner@gmail.com | eduardoscarlato@gmail.com

Recibido: 15 de agosto de 2021

Aceptado: 30 de septiembre de 2021

Resumen. El Plomo ha tenido una estrecha relación con el mundo artístico pictórico a través de los pigmentos utilizados por los artistas durante milenios. El íntimo contacto con sustancias químicas potencialmente peligrosas para la salud, casi siempre sin medidas de higiene y seguridad laboral, ha desarrollado en muchos casos, enfermedades laborales en estos artistas, a veces sospechadas y en otros casos, más que confirmadas. En el presente trabajo se analiza la historia de vida laboral de Miguel Ángel Buonarroti, de quien se tiene registro suficiente como para establecer un nexo causal con exposición laboral al Plomo.

Palabras claves: Arte; Plomo; Intoxicación laboral; Acúfenos; Ototoxicidad; Miguel Ángel Buonarroti.

Abstract. Lead has shown a close relationship with the fine arts' world through the pigments used by artists for thousand of years. Close contact with potentially dangerous chemical substances for health, almost always without occupational hygiene and safety measures, has produced, in many cases, occupational illnesses in these artists, sometimes suspected and in other cases, more than confirmed. In the present work, the history of Miguel Ángel Buonarroti's working life is analyzed, since there is sufficient record to establish a causal link with occupational exposure to Lead.

Key words: Art; Lead; Tinnitus; Occupational intoxication; Ototoxicity; Miguel Ángel Buonarroti.

Acúfenos o tinnitus

Por acúfenos o *tinnitus* se conocen ruidos que una persona percibe claramente en sus oídos, pero que en realidad no tienen una existencia física real, objetivamente comprobable. Es decir, que no provienen de una fuente externa. Sus causas son muy variadas, algunas conocidas y otras que permanecen aún sin explicación pese a los adelantos de la ciencia audiológica.

El término *tinnitus* proviene etimológicamente del latín *tinnire* (tintinear). Así se conoce este fenómeno auditivo desde que lo mencionó el naturalista romano Plinio el Viejo (37-79 dC), y como tal se ha conservado en la mayoría de las lenguas europeas. En 1693, aparece en el *Physical Dictionary* (Diccionario Médico) de Steven Blankaart (1708), donde puede leerse: "*Tinnitus Aurium, a certain buzzing or tingling in the ears*" (*Tinnitus aurium*, un cierto zumbido o tintineo en los oídos). El español acúfeno deriva del italiano *acufene*, introducido en la literatura médica recientemente (1941), formado por las raíces griegas *akoyeir* (oír) y *phaneir* (hacerse visible).

El tratamiento del *tinnitus* fue mudando en cada época de la historia de acuerdo a la evolución de los conocimientos médicos. El primer relato escrito

de la terapéutica del acúfeno se remonta a los egipcios, para quienes se trataba de un embrujo que debía ser tratado mediante la instilación de una mezcla de aceite y hierbas administrada a través de un tallo de caña que introducían en el oído externo. En las culturas mesopotámicas se pensaba que el dios del agua se había asentado en el oído, por lo cual se intentaba desalojarlo mediante conjuros cantados. La medicina grecorromana relacionó la presencia de *tinnitus* con la teoría de los humores de Empédocles de Agrigento (490-430), asociándolo al elemento aire. Notablemente, Aristóteles fue el primero en introducir la idea del enmascaramiento. Se preguntaba por qué cesa el zumbido en el oído si uno emite un sonido, agregando que probablemente fuera porque un sonido mayor expulsa a uno menor. En la Edad Media siguió vigente el concepto helénico del aire atrapado que zumbaba como el viento en el interior del oído. Un tratamiento galés se basaba en tomar una miga de pan lo más caliente posible, dividirla en dos e introducirlas en cada oído con el objetivo de incentivar la traspiración y así eliminar el agua. En el siglo XVII, el anatomista francés Jean Riolan el Joven

(1580 - 1657) propuso trepanar el hueso mastoideo para liberar el aire atrapado (Riolan 1601). Es de imaginar el resultado ominoso de semejante terapia heroica (Figura 1).



Figura 1: El anatomista Jean Riolan (1580 - 1657).

Bernardino Ramazzini (1633 - 1714) en su obra "*De morbis artificum diatriba*" (Disertación acerca de las enfermedades de los trabajadores) (Ramazzini 1703), menciona en el capítulo sobre enfermedades a que están expuestos los obreros del bronce: "*Durante una elevada fiebre, perciben los broncistas sonidos en los oídos...*" En otra parte, Ramazzini relata que Plinio el Viejo intentaba curar los acúfenos con lavajes de una mezcla de gusanos macerados, leche de mujer y espuma de caballo. Sin duda que el trabajo del boticario no era nada fácil por entonces (Figura 2).



Figura 2: Bernardino Ramazzini (1633 - 1714).

En el siglo XIX, el médico y anatomista francés, Jean Marc Gaspard Itard (1774 - 1838), avanzó en el estudio del tinnitus con algunas ideas progresivas, vigentes hasta hoy (Itard 1821). En 1821 fue elegido miembro de la Academia de Medicina y publicó su "*Traité des maladies de l'oreille et de l'audition*", donde aclaraba que la mayoría de los acúfenos estaban asociados con la pérdida de la audición. Dio las primeras descripciones de tinnitus objetivo versus subjetivo, y reconoció que el tratamiento a menudo fallaba, pero, mientras tanto, el médico debía hacer que el tinnitus fuera por lo menos más tolerable, para lo cual recomendaba el uso del enmascaramiento, base de la moderna terapia de reentrenamiento (Figura 3).



Figura 3: Jean Marc Gaspard Itard (1774 - 1838).

Los efectos de los acúfenos en la salud de quien los padece llegan a ser insoportables, hasta el grado de que algunos pacientes aceptaron la sección quirúrgica total del nervio de la audición, con lo cual solo consiguieron adquirir una sordera profunda, mientras los acúfenos persistieron alterando sus vidas. Ludwig van Beethoven (1770 - 1828) fue famoso por la progresiva y severa hipoacusia que padecía, pero en una carta escrita en 1801 a su amigo Franz Wegener se quejaba amargamente de sus acúfenos: "*Sólo mis oídos silban y resuenan constantemente, día y noche. Puedo decir que estoy viviendo una vida miserable.*" (Kalischer 1972).

Los acúfenos no son nada raros; es casi seguro que todos los padecemos en algún momento, por suerte, generalmente de carácter temporario. Ya como un síntoma permanente, afectan alrededor del 17 % de las personas, sin diferencia de sexo

o lateralidad. Aunque a menudo se los asocian con la pérdida auditiva, muchas personas que los padecen tienen una audición perfecta. La mayoría, los describen como zumbidos, silbidos o canto de grillos, y siempre de una frecuencia aguda.

El modelo más moderno para explicar la presencia de acúfenos es el llamado modelo neurofisiológico de Jastreboff y Hazell (1993), cuyo mecanismo íntimo radicaría en el daño desordenado de las células ciliadas de la cóclea, en la intercomunicación de las fibras del VIII par craneano (nervio auditivo), en el desequilibrio iónico coclear, con disfunción de los neurotransmisores, además de un componente central cortical y subcortical.

Las causas que desencadenan tinnitus son diversas, incluyendo la exposición al ruido intenso, la asociación a problemas vasculares, como la hipertensión y la arterioesclerosis, el estrés, la presencia de ciertos tumores de oído, como el neurinoma del acústico, la administración de ciertos medicamentos y la exposición a determinados agentes químicos ambientales u ocupacionales. Los agentes químicos que pueden actuar en la génesis de tinnitus son los que tienen propiedades ototóxicas, tales como algunos metales, entre los que se incluye al plomo, el agente al cual, tal como veremos, estuvo severamente expuesto Miguel Ángel durante toda su larga vida de artista plástico.

El plomo como ototóxico

Como ototóxicos se conocen a las sustancias químicas con capacidad de dañar la cóclea y/o el laberinto. Los mismos pueden ser endógenos, sustancias originarias del metabolismo de la propia persona; o exógenos, provenientes de fuentes alimentarias, farmacológicas, industriales y profesionales. Según su mecanismo de acción sobre el organismo pueden ser nefrotóxicos, hepatotóxicos, neurotóxicos, anemizantes, inmunodepresores, etc. También cuentan condiciones predisponentes del ambiente y del individuo, así como la susceptibilidad personal. La investigación sobre la ototoxicidad de una sustancia determinada se hace a través de estudios audiológicos, tanto subjetivos (audiometría tonal, logaudiometría, pruebas supraliminales, etc.) como objetivos (Potenciales evocados auditivos, otoemisiones acústicas, cocleografía, etc.), laberínticos (ENG, VNG, VHit, etc.) y toxicológicos (Identificación de la sustancia y de su nivel tanto ambiental como en el individuo expuesto, ya sea humano o animal de laboratorio).

El plomo ejerce su potencial toxicológico sobre casi todo el organismo, destacándose clínica-

mente como agente anemizante y neurotóxico. En cuanto a los efectos neurológicos, se ha reportado cómo el plomo interfiere en la liberación de neurotransmisores químicos, tales como la acetilcolina, dopamina, noradrenalina y GABA. Investigaciones en animales han demostrado que el plomo genera una disminución significativa en la formación de la mielina que rodea a los axones neuronales, la que actúa como un aislante y favorece la transmisión de los impulsos nerviosos. Además, las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, al quedar expuestas al plomo sanguíneo, permiten con su pasaje, la acumulación del metal en diferentes zonas del cerebro. Los síntomas agudos corresponden a la afectación del sistema nervioso central (encefalopatía plúmbica), mientras que los propios de la intoxicación crónica (saturnismo), se caracterizan por irritabilidad, depresión, desatención, y las típicas manifestaciones de las neuropatías periféricas, que van desde el dolor y las parestesias, hasta auténticas parálisis de determinados nervios, en especial del radial, y a veces de pares craneanos, como es el caso del octavo par, o nervio auditivo. Niveles reducidos de plomo en sangre pueden provocar lesiones neurológicas, dada la extrema susceptibilidad del sistema nervioso a este metal, incluyendo alteraciones motoras, sensoriales y conductuales. Al acumularse el plomo en los huesos, donde permanece durante décadas, el avance de la edad es un factor agravante, puesto que en determinadas circunstancias el metal puede retornar hacia la circulación. Y no olvidemos que Miguel Ángel vivió hasta casi los 89 años.

Tanto los ensayos en animales de laboratorio como estudios epidemiológicos efectuados en cohortes de trabajadores expuestos al plomo, incluso a niveles bajos, han demostrado que este metal puede dañar las células cocleares del oído interno, alterar la composición de los neurotransmisores de la sinapsis, y en consecuencia la función neuronal auditiva. Estudios modernos realizados mediante la aplicación de otoemisiones acústicas, técnica que permite el análisis de la función coclear específica, confirmaron que la exposición al plomo daña tanto el cuerpo celular como las fibras nerviosas de la vía auditiva (Werner 2013)

Pigmentos a base de plomo

El plomo es uno de los metales pesados que por años más ha sido utilizado por los artistas plásticos debido a sus excelentes condiciones de estabilidad, y en especial, por ser el pigmento ideal para asegurar colores brillantes, necesarios para la pintura de tonos claros, como blanco,

perla, amarillos y naranjas. La historia del arte nos enseña que los pintores conocieron su elevada toxicidad desde antaño, pero prefirieron ignorarla en muchas ocasiones, aun a costa de su salud, en la búsqueda constante de aquellos tonos que consideraban imprescindibles.

Los pigmentos tóxicos que contienen plomo son los que llamativamente han ocupado más espacio en la paleta de los pintores, siendo por eso los más asociados a casos de toxicidad crónica, hasta el grado que el cólico saturnino solía ser llamado “*cólico de los pintores*”. Las diferentes variedades de presentación del pigmento plúmbico se denominaban como blanco de plomo, cerusa o albayalde (Carbonato de plomo); amarillo de Nápoles genuino (Antimoniato de plomo) y amarillo de Nápoles imitación (Estañado de plomo). El uso del blanco de plomo es mencionado por Plinio y Vitruvio como usado unos 400 años aC. Era el pigmento ideal para representar materiales suntuosos, como el mármol, piedras finas, joyas, oro, plata, seda, y sobre todo, la piel, el cabello y las uñas (Scarlatto y Werner 2014).

Aprovechando la alta densidad del plomo, que lo vuelve radiopaco, el uso de rayos X ha permitido detectar la presencia del metal en obras pictóricas, como en el caso de la investigación hecha en el cuadro “*La joven de la perla*” del holandés Johannes Vermeer (1632-1675) (De Meyer *et al.* 2019). La radiografía revela la acumulación de plomo en las partes blancas, en las que, para resaltar el brillo, el artista ha recurrido al blanco de plomo. El efecto es evidente en la pintura de la perla que da el nombre a la obra (Figura 4).



Figura 4: “*La joven de la perla*”. Johannes Vermeer (1665). Museo Mauritshuis. La Haya.

También el amarillo de Nápoles fue un pigmento plúmbico muy utilizado por las mismas razones que el blanco de plomo, estabilidad y matices sumamente brillantes. Los estudios químicos de las telas de Rembrandt (1606 - 1669) revelan el uso intenso del amarillo de plomo y del bermellón (sulfuro de mercurio). Contrariamente a lo que uno podría esperar del estilo libre de sus pinceladas, Rembrandt trabajaba muy lentamente, dedicando períodos de dos a tres meses para cada retrato. Luego que la pintura se secaba, volvía a trabajar la superficie hasta que, en algunos casos, la pintura alcanzaba el grosor de medio dedo de la mano. El cuadro “*La novia judía*”, de 1666, es un buen ejemplo del uso de abundantes pigmentos metálicos, aplicados con pinceladas cortas y cargadas, como puede apreciarse claramente en las mangas de la vestimenta del hombre. El efecto de lujo y brillo dorado se ha logrado mediante capas y capas de una combinación de blanco y amarillo de plomo, mientras que el bermellón mercurial es el pigmento dominante en el vestido de la novia (Groen 2011) (Figura 5).



Figura 5: “*La novia judía*”. Rembrandt (1666). Rijksmuseum, Amsterdam. Obsérvese la densidad de las pinceladas con pigmentos de plomo

Ramazzini (1703), en el capítulo dedicado al trabajo de los pintores artísticos, con su característica agudeza clínica escribe: “*También aquejan a los pintores afecciones que hacen temblar sus miembros, que les provocan caquexia y ennegrecen su dentadura, dándole palidez al rostro, melancolía al ánimo, abolición del olfato, y aunque retraten al prójimo en imágenes favorecedoras de su elegancia y fisonomía, sucede raramente que muestren ellos a su vez el buen semblante y la prestancia airosa que en sus reproducciones trasuntan.*” Y agrega en otro párrafo: “*...Fernel narra la historia asaz curiosa de un pintor angevino, víctima primero de temblores en las manos y los dedos, luego la agitación aumentó al punto de*

romperse un brazo durante una de las reiteradas convulsiones, iguales conmociones padeció en los pies, luego dolores tan fuertes en el vientre y ambos hipocondrios, que ni enemas, ni fomentos ni baños ni ningún otro tratamiento coligió aliviarlo. Calmábase únicamente si tres o cuatro hombres se le apoyaban con todo el peso en el vientre, apretándole el abdomen sufría menos. Soportó tres años este martirio y murió extenuado por consumición.”

Ningún signo ni síntoma de la intoxicación plúmbica escapa a esta descripción clínica del gran maestro de Carpi: anemia, caquexia, polineuritis, encefalitis y el ribete gingival de Burton, y una imagen que parece un tanto exagerada pero muy expresiva del cólico saturnino, el que característicamente calma con la compresión del abdomen. La alta toxicidad de las pinturas elaboradas en base a plomo impulsó la creación de otros pigmentos menos peligrosos para la salud de los pintores, en especial, del blanco de zinc a finales del siglo XVIII, y del blanco de titanio en 1920. Actualmente, la venta de pinturas con plomo está prohibida o regulada en muchos países. En los EEUU solo se vende si el comprador firma el compromiso de hacerse el único responsable por las consecuencias de su uso. En Argentina, la Resolución del Ministerio de Salud N° 7/2009 prohibió en todo el territorio del país, la fabricación, la importación para consumo, la comercialización y la entrega a título gratuito de pinturas, lacas y barnices, que contuvieran más de 0,06 gramos de plomo por cien gramos (0,06%) de masa no volátil.

El probable saturnismo de Miguel Ángel

En medicina se conoce como saturnismo a la intoxicación crónica por plomo. Esta denominación proviene de que en la antigüedad, los alquimistas medievales llamaban "Saturno" a dicho elemento químico. Relacionaban cada metal con una deidad que guardara cierto criterio vinculante; en este caso con el dios romano Saturno, divinidad que se asociaba astrológicamente con el carácter frío, gris y plomizo.

De los pintores famosos en la historia del arte que padecieron saturnismo, en solo dos la enfermedad pudo ser fehacientemente comprobada a través de métodos científicos objetivos, Caravaggio y Portinari. En el caso de Caravaggio (1571-1610), a través del descubrimiento de sus restos óseos en el cementerio de Porto Ercole, en los cuales, el historiador y paleopatólogo Silvano Viceti, de la Universidad de Pisa, identificó un nivel muy elevado de plomo (Viceti y Gruppioni 2010). El brasileño Cándido Portinari (1903 - 1961), era

perfectamente consciente que padecía saturnismo (Werner 2019). Pese a desoír los consejos de sus médicos y continuar utilizando pigmentos a base de plomo, periódicamente recaía en crisis graves, hasta morir en una de ellas. En los demás casos, debemos confiar en las informaciones provenientes de sus patobiografías.

Miguel Ángel Buonarroti (1475 - 1564) vivió hasta casi los 89 años, edad inusual que le permitió producir una de las obras más completas y maduras en la historia del arte. Pero a la vez le significó un prolongado sufrimiento debido a la cronicidad de enfermedades sumamente dolorosas, entre las que se destacó el proceso gotoso con complicaciones renales que lo acompañó hasta la muerte. Más allá de los comentarios autobiográficos que nos dejó el artista y los de sus biógrafos contemporáneos, en especial el amigo y admirador Giorgio Vasari, otro gran pintor, Rafael Sanzio, documentó para la posteridad las manifestaciones visibles de la enfermedad de Miguel Ángel (Vasari 1550).

Rafael no simpatizaba con Buonarroti, con quien rivalizaba por los favores del pontífice Julio II. Era una persona sumamente afable y respetuosa de las formas cortesanas, se movía con soltura entre papas y prelados, estaba comprometido con la sobrina de un cardenal y era querido por todos. En contraposición, Miguel Ángel, convencido de su genio, detestaba la adulación y maltrataba a todos por igual, independiente de su condición social o jerarquía en la corte vaticana. Cuando uno ingresa a la Estancia de la Signaturase enfrenta al gran fresco que simboliza la Filosofía en un templo de estilo romano. Un gran número de filósofos famosos delibera en distintos grupos presididos por dos figuras centrales, Aristóteles y Platón, éste con la figura inconfundible de Leonardo Da Vinci. De esta manera, Rafael brindaba su homenaje a quien consideraba el gran maestro del Renacimiento (*Figura 6*).

En los esbozos originales del mural, Miguel Ángel no estaba representado en la obra, pero cuando Rafael contempló la monumental decoración de la Capilla Sixtina consideró que debía superar sus celos y agregarlo al mural. Lo hizo en la figura del filósofo Heráclito de Éfeso, llamado "el Oscuro", por su espíritu confuso y deprimente, encarnadura que le sentaba bien a Miguel Ángel, conocido por su melancolía y genio atormentado. Por eso, la imagen de Heráclito-Miguel Ángel, no pensada originalmente, aparece totalmente fuera de la estudiada estructura simétrica que tiene el cuadro. Para que la figura pueda apoyar el papel de escribir, Rafael inventó una especie de cubo que hace de mesa, que resulta chocante con



Figura 6: “La escuela de Atenas”. Rafael Sanzio (1510). Museo del Vaticano. Obsérvese a Miguel Ángel representado como el filósofo Heráclito, sentado frente a la escalera, mientras escribe en un escritorio improvisado. La imagen fue agregada a último momento, ya que no figuraba en los cartones originales.

la cuidadosa perspectiva general de la enorme obra. Pero la malicia de Rafael llegó aún más lejos, ya que Miguel Ángel nos muestra cruelmente sus rodillas deformadas por la presencia de tofos gotosos (Figura 7).



Figura 7: Fragmentos de “La Escuela de Atenas”. Galería Vaticana. Las rodillas de Miguel Ángel muestran los tofos propios de la gota que lo atormentaba.

La relación estrecha entre el saturnismo y la gota no se conocía en su época. Hoy sabemos que el plomo tiene la capacidad frente a la exposición crónica de inhibir la excreción del ácido úrico, por lo cual se eleva su concentración sanguínea y favorece la producción de gota y de litiasis urinaria. Bennet (1985), reveló que más del 50 % de los pacientes con nefropatía causada por el plomo

sufrían también de gota. A su vez, una investigación de Batuman y colaboradores (Batuman et al. 1981) sugiere que la enfermedad renal es más frecuente y más intensa en pacientes con gota saturnínica que en pacientes con gota primaria. El artista se quejó toda la vida de los cólicos renales que padecía, e incluso en 1549 sufrió un episodio de anuria, seguida de la eliminación de los cálculos. Cuenta Vasari, amigo y primer biógrafo de Miguel Ángel que “Durante muchos años su querido amigo, el médico Realdo Colombo, lo sondó y cuidó muy solícitamente” (Blankaart 1708). En uno de sus poemas autobiográficos, Miguel Ángel se lamenta de que “Ho imparato a conosciere le urine” (He aprendido a conocer la orina) recordando luego que ha eliminado arenilla y piedras por el riñón. Los tofos gotosos, depósitos de sales de ácido úrico en tejidos blandos, hacen su aparición luego de un prolongado padecimiento de artritis gotosa, por lo que sabemos que cuando fue retratado por Rafael, Miguel Ángel cargaba años de sufrimientos.

La inmensidad y complejidad de la pintura de la bóveda de la Capilla Sixtina, poblada por una multitud de seres humanos, de figuras mitológicas y bíblicas, de santos y demonios, da pie para todo tipo de suposición, algunas comprobables y otras muy audaces. Entre éstas, por lo menos en nuestra opinión, podemos situar a quienes ven un riñón en la imagen correspondiente a Dios separando la Tierra y las Aguas, vinculando su presencia con el mensaje que el artista quiso dejarnos sobre el órgano que tanto sufrimiento le provocaba (Eknoyan 2000) (Figura 8).



Figura 8: Representación de Dios separando la Tierras de las Aguas, Capilla Sixtina. Se pretende ver la forma y color de un riñón en el dibujo de las telas de donde emergen las figuras.

¿De dónde provenía el plomo que envenenaba a Miguel Ángel? En primer lugar, de las mismas pinturas; luego de las sostenidas dietas de pan y vino a que se sometía cuando trabajaba con la entrega obsesiva que lo caracterizaba. Nuevamente es Vasari quien comenta que el pintor pasaba días enteros sin otra fuente de alimentación. En aquel tiempo el vino se procesaba y se almacenaba en envases de plomo debido a su maleabilidad, ya que no confiere sabor ni color a los líquidos y alimentos. Por eso se fermentaba el vino en vasijas de plomo, o por lo menos forradas con ese metal, y se desaconsejaban las de cobre que añadían mal sabor. En la Roma antigua, Plinio el Viejo recomendaba la concentración del mosto en recipientes de plomo para endulzarlo y conservarlo más tiempo, y este método no había variado en la Roma del Renacimiento. Aún más, los ácidos frutados del vino, en especial el tartárico, son excelentes diluyentes del plomo de las superficies vidriadas de las vasijas.

Hay que agregar las duras condiciones de trabajo a que se exponía el artista, en especial cuando pintaba la bóveda de la Capilla Sixtina acostado sobre andamios y recibiendo directamente la pintura que caía sobre la cara y las manos. Su enfermiza dedicación al trabajo lo llevaba además a permanecer con la ropa impregnada de pigmentos y suciedad durante largos períodos. En la biografía de su admirado Miguel Ángel, escribe Vasari: *“Sufrió la terrible incomodidad de tener que trabajar con la cabeza echada para atrás, y se fatigó la vista de tal manera, que durante varios meses no pudo leer una carta ni mirar un dibujo si no era en esa postura. Perseveró, sin embargo, estimulado cada vez más por la voluntad de crear y por la comprobación de sus realizaciones y progresos, al punto de no sentir fatiga ni cuidarse de incomodidad alguna”*.

Su genio polifacético lo hizo incursionar también en la poesía, escribiendo más de trescientas obras, principalmente sonetos y madrigales. En uno de estos sonetos, escrito mientras trabajaba en la pintura de la Capilla Sixtina y dirigido a su amigo Giovanni da Pistoia, realiza un bosquejo a mano alzada donde aparece el pintor en pleno trabajo mientras le cae pintura en el rostro. En este soneto, Miguel Ángel comparaba su rostro con un “rico pavimento”, mientras se refería a sí mismo como un “cadáver de pintura” (Clements 1968) (Figura 9).

Dormía muy poco y *“se levantaba por la noche, cogía su cincel y empezaba a trabajar después de ponerse un sombrero confeccionado con cartones en cuyo centro colocaba una vela encendida*



Figura 9: Bosquejo dibujado en un soneto donde Miguel Ángel se retrata pintando el techo de la Capilla Sixtina desde un andamio exponiéndose al riesgo de absorber las pinturas con plomo que gotean hacia su cara.

que iluminaba lo que estaba haciendo” y le dejaba las manos libres”. Agrega Vasari: *“Miguel Ángel me contó que en su juventud dormía a mendo completamente vestido: exhausto por el trabajo, no se preocupaba por desnudarse para no tener que volver a vestirse después”*. Nuevamente es Ramazzini quien observó este mal hábito de los pintores: *“Visten los pintores sucias y pintarrajeadas blusas para trabajar, y al pintar absorben efluvios malignos por la boca y la nariz, los que penetran por el aparato respiratorio, pasan a la sangre, perturban la economía de las funciones naturales y provocan los quebrantos ya mencionados.”*

Otra patología presente en Miguel Ángel atribuible a la intoxicación plúmbica es la depresión, tal como él mismo la reflejó en la figura del profeta Jeremías en la Capilla Sixtina, considerado como su autorretrato. Las propias palabras del artista lo confirman: *“Después de cuatro años torturados, y más de 400 figuras del tamaño de la vida,*

me sentí tan viejo y cansado como Jeremías. Yo sólo tenía 37 años, pero los amigos no reconocían al hombre viejo en que me había convertido" (Figura 10).



Figura 10: Fragmento de la imagen del profeta Jeremías, Capilla Sixtina. Se cree que Miguel Ángel se representó a sí mismo, en una manifiesta expresión de su depresión y melancolía.

El autorretrato probablemente más dramático de Miguel Ángel es el que se puede ver en el complejo fresco de "El Juicio Final" en la Capilla Sixtina, muy cercano a la figura central de Jesucristo. La imagen representa a San Bartolomé, apóstol que fue despellejado en su martirio, sosteniendo en una mano el cuchillo y en otra la piel extraída con la cara de Buonarroti. La decisión de representarse en esta situación tan patética y con una expresión de angustia y horror ha dado lugar a varias explicaciones psicológicas. El mártir dirige la mirada hacia Cristo, como interrogándolo acerca de si debe salvarlo o dejarlo caer al infierno. Precisamente para esta época, Miguel Ángel escribe estas palabras desgarradoras: "Soy una bolsa de piel, repleta de huesos y nervios, mi rostro es la imagen del horror... las tan alabadas artes, de las que yo tanto supe, me han traído hasta aquí... soy como el tuétano en su funda, encerrado, pobre, solitario... la vivienda, que más parece una tumba, me impide remontar el vuelo... Quien haya comido o tomado una pócima deja

sus heces delante de mi puerta, aprendí a distinguir el olor de los tipos de orinas en el canalillo, la pestilencia de los locos que vagan de noche de aquí para allá... Mi amiga es la melancolía, mi reposo el tormento. Yo sería bueno para la figura del bufón, con esta cabaña aquí en medio de los palacios, estoy consumido, desgarrado, roto por tanto esfuerzo... Pobre, viejo, sometido a otros. ¡Me desharé si no muero pronto!". Su identificación con la bolsa de piel no deja dudas sobre la autenticidad del autorretrato en "El Juicio Final". Autorretratarse de esa manera es una forma de dejar a la posteridad el testimonio desgarrador de una personalidad tortuosa y depresiva (Figura 11).



Figura 11: Fragmento de "El Juicio Final", ábside de la Capilla Sixtina en el cual se observa a San Bartolomé mirando hacia Cristo mientras sostiene la piel con el rostro de Miguel Ángel.

En otro sector de la Capilla Sixtina, los expertos creen identificar el rostro de Miguel Ángel en la cabeza decapitada del rey babilonio Holofernes, a quien la judía Judith acaba de degollar aprovechando su embriaguez. En una canasta, la servidora carga la cabeza real hacia la sitiada ciudad de los hebreos, donde, al ser exhibida en las murallas, provocará el desbande de los sitia-

dores. La escena es de una calidad de composición y colorido de gran fuerza dramática; Judith viste ropas lujosas a diferencia de la otra mujer, y el cuerpo desnudo y decapitado de Holofernes yace ensangrentado en un escorzo típico de Miguel Ángel. Observando en detalle, no cabe duda que la cabeza en la bandeja que Judith trata de cubrir con el paño blanco se parece mucho a la del artista. Si es así, la actitud de Buonarroti antecede a la que adoptaría Caravaggio un siglo después, al representar la misma escena bíblica con su propio rostro en la cabeza seccionada por la heroica Judith. Autorretratarse de esa manera es una forma de dejar a la posteridad el testimonio desgarrador de una personalidad tortuosa y depresiva (Figura 12).



Figura 12: A la izquierda: la escena de Judith y Holofernes en la Capilla Sixtina. A la derecha: ampliación que permite ver en detalle el rostro de Miguel Ángel en la cabeza del rey babilonio decapitado.

Existe otro retrato de Miguel Ángel a los 65 años de edad, con una autoría discutida entre el mismo pintor y Jacopino del Conte. En el cuadro, Miguel Ángel nos mira con su habitual tristeza, pero lo interesante es que además muestra una mano deformada, con signos evidentes de malformaciones artrósicas (Figura 13).

Miguel Ángel muere en 1564 a los 88 años, edad poco común en la época, prácticamente con el cincel en la mano, luego de guardar cama por unos pocos días, por primera vez en su vida. Lo único que sabemos sobre la causa del deceso es que fue precedida de una ligera fiebre. Según su

ayudante, poco antes de morir, “seguía dibujando de pie, descalzo y con extrema concentración”. El Papa Pio IV pretendió enterrarlo con honores en la basílica de San Pedro, pero Leonardo, sobrino de Miguel Ángel decidió llevar el cadáver a Florencia, “para lo cual tuvo que sacar los restos a escondidas embalados como si fueran una mercancía más para que no se produjera ningún tumulto en Roma, donde quizá se hubiera tratado de impedir su salida hacia Florencia”.

En conclusión, existen suficientes datos patobiográficos en la vida de Miguel Ángel para aceptar que realmente padeció una larga secuencia de trastornos artrósicos y urinarios debido a la gota, con manifestaciones visibles y comentadas por el artista y por sus biógrafos contemporáneos. Tampoco hay dudas en cuanto a la exposición al plomo, ya sea la ocupacional, atento a que conocemos bien los pigmentos que se usaban en la composición de las pinturas, o bien la originada por la ingestión del vino con agregados plúmbicos comunes en la época. El carácter huraño y el temperamento depresivo podrían a su vez ser componentes del cuadro de saturnismo. Todos estos elementos de su biografía hacen altamente probable el diagnóstico de la intoxicación profesional por plomo.



Figura 13: A la izquierda: retrato de Miguel Ángel por Jacopino del Conte. A la derecha: obsérvense los signos de artrosis en la mano deformada.

Los acúfenos de Miguel Ángel

Como vimos, la pasión del artista por el trabajo era proverbial; dormía solo un par de horas, se alimentaba a pan y vino durante largos periodos, descuidaba todo lo que consideraba frívolo, como la vestimenta y la vida social. A los ochenta años seguía esculpiendo, y se permitió ironizar de esta manera sobre sus achaques:

“Vivo solo y miserable, encerrado como la savia dentro del árbol. Mi voz es como una avispa prisionera en un saco de piel y huesos....”

Mis dientes castañean como las teclas de un viejo instrumento musical...

Mi cara es un espantapájaros...un ruido

Hay unos zumbidos incesantes en mis oídos, en uno una araña teje su red, en el otro, un grillo canta toda la noche...

Mi catarro, que causa un estridor en mi garganta, no me deja dormir.

La fatiga me ha doblegado, y el asilo que me está aguardando, es la Muerte.”

Es muy descriptiva la referencia al padecimiento de acúfenos bilaterales y permanentes: “*Hay unos zumbidos incesantes en mis oídos*”, que a nuestro criterio podrían también relacionarse con una neuropatía tóxica por plomo, con compromiso de las células cocleares y del nervio auditivo. Las referencias a “*la araña que teje*”, pero más al “*grillo que canta toda la noche*” son muy características en estos pacientes. Sucede habitualmente que durante el día, los acúfenos son enmascarados por los ruidos medioambientales, recordando que acústicamente un ruido de banda estrecha, como es el *tinnitus*, es atemperado por otro ruido de banda ancha. Es en el silencio de la noche cuando los acúfenos se adueñan del oído y ejercen libremente su tiranía, como “*el grillo que canta toda la noche*”.

Bibliografía

Batuman V, Maesaka JK, Haddad B, Teppe E, Landry E, Wedeen RP. 1981. The role of lead in gout nephropathy. *N Engl J Med.* 304:520-523.

Kalischer ACh. 1972. En *Beethoven Letters*. With explanatory notes by Kalischer ACh, van Beethoven L, Shedlock JS, Eaglefield Hull A. New York (EEUU): Dover Publication.

Bennett WM. 1985. Lead nephropathy. *Kidney Int.* 28:212-220.

Blankaart S. 1708. *Physical Dictionary*. London (GB): Printed for Sam Crouch John Sprint.

Clements R. 1968. *Michelangelo: A self-portrait:*

texts and sources. New York (EEUU):University Press.

De Meyer S, Vanmeert F, Vertongen R, van Loon A, González V, van der Snickt G, Vandivere A, Janssens K. 2019. Macroscopic x-ray powder diffraction imaging reveals Vermeer’s discriminating use of lead white pigment in *Girl with a Pearl Earring*. *Sciences Advances.* 7: 67.

Eknoyan G. 2000. Michelangelo: Art, anatomy and the kidney. *Historical Archives.* 57(3):1190-1201. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00947.x>.

Groen CM. 2011. *Paintings in the laboratory: scientific examination for art history and conservation* [Thesis]. [Amsterdam (NL)]: University of Amsterdam Press. Digital Academy Repository.

Itard JMG. 1821. *Traité des maladies de l’oreille et de l’audition*. *Memorias de la Academia Real de Medicina*. Paris (FR).

Jasterboff PJ, Hazell JW. 1993. A neurophysiological approach to tinnitus: clinical implicatios. *Br J Audiol.* 27(1):7-17. doi: 10.3109/03005369309077884.

Ramazini B. 1703. En: *Tratado de las enfermedades de los trabajadores (De morbis artificum diatriba)*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT), Asociación Instituto Técnico de Prevención (ITP). España. <https://latecnicalf.com.ar/descargas/material/higieneysseguridad/Tratado%20sobre%20las%20enfermedades%20de%20los%20trabajadores.pdf>

Riolan J. 1601. *Universae medicinaes compendia*. Per Conradum Waldkirch. Paris (FR): Universidad de Gante.

Scarlato E, Werner A. 2014. *Venenos en el Arte*. Buenos Aires (ARG): OLMO.

Vasari G. 1550. En: *Vassari G. Las vidas de los más excelentes arquitectos, pintores y escultores italianos desde Cimabue a nuestros tiempos*. Ed. Grupo Anaya. 2004. Madrid, 416 pp.

Viceti S, Gruppioni G. 2010. *L’enigma Caravaggio. Ipotesi scientifiche sulla morte del pittore*. Armando Editores. Roma (IT).

Werner A, Scarlato E. 2016. *Historias de la Salud y Enfermedad de los Trabajadores*. Buenos Aires (ARG): EAB.

Werner AF. 2019. Cándido Portinari (1903-1962). La pasión aciaga por excelencia. Revista ALMA Cultura y Medicina.

Werner AF. 2015. Miguel Ángel, una vida larga

pero atormentada. Revista DM N° 22. Buenos Aires (ARG).

Werner AF. 2013. Teoría y práctica de las Otoemisiones Acústicas. Buenos Aires (ARG): Edimed.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 0327-9286) es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina. Integra, desde el año 2007, el Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas y se puede acceder a sus artículos a texto completo a través de SciELO Argentina.

Acta Toxicológica Argentina tiene por objetivo la publicación de trabajos relacionados con las diferentes áreas de la Toxicología, en formato de artículos originales, reportes de casos, comunicaciones breves, actualizaciones o revisiones, artículos de divulgación, notas técnicas, imágenes, resúmenes de tesis, cartas al editor y noticias.

Los artículos originales son trabajos de investigación completos y deben presentarse respetando las siguientes secciones: Introducción; Materiales y métodos; Resultados y Discusión (que pueden integrar una sección conjunta).

Los reportes de casos son descripciones de casos clínicos que por sus características signifiquen un aporte importante a la Toxicología.

Las comunicaciones breves son trabajos de menor extensión pero con connotación toxicológica novedosa y que signifiquen un aporte al campo toxicológico.

Las revisiones o actualizaciones comprenden trabajos en los cuales se ha realizado una amplia y completa revisión de un tema importante y/o de gran interés actual en los diferentes campos de la toxicología.

Los artículos de divulgación y artículos especiales son comentarios de diversos temas de interés toxicológico.

Las notas técnicas son descripciones breves de técnicas analíticas o dispositivos nuevos avalados por trabajos experimentales concluyentes.

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

El objetivo de la Sección Imágenes en Toxicología es la publicación de imágenes originales

(1-2 figuras de alta calidad) o clásicas interesantes o hallazgos inusuales que faciliten el diagnóstico clínico, de laboratorio o eco-epidemiológico de causas con origen toxicológico. Las imágenes pueden no ser excepcionales, pero sí ilustrativas.

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

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

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

Se aceptará un máximo de 3 autores por imagen.

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

Los resúmenes de tesis: son resúmenes ampliados que describen tesis de Maestría o Doctorales aprobadas. Estas deben incluir copia de la aprobación de la tesis con la declaración jurada del autor y su director. El texto no debe superar los 1000 caracteres.

Acta Toxicológica Argentina (en adelante *Acta*), publicará contribuciones en español, portugués y/o inglés. Todas serán evaluadas por al menos dos revisores; la selección de los mismos será atributo exclusivo de los editores. Este proceso determinará que el mencionado Comité opte por rechazar, aceptar con cambios o aceptar para su publicación el trabajo sometido a su consideración. La identidad de autores y revisores se mantendrá en forma confidencial.

Envío de manuscritos

El envío de manuscritos se realizará a través del Portal de Publicaciones Científicas y Técnicas (PPCT) del Centro Argentino de Infor-

mación Científica y Tecnológica (CAICYT). En la página web del PPCT-CAICYT <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ata> se encuentran las instrucciones para los autores.

Gratuidad de las publicaciones

El envío, revisión, edición y publicación de cualquier tipo de material técnico científico o de divulgación aceptado por Acta Toxicológica Argentina es totalmente gratuito para los autores, no debiendo estos abonar ningún tipo de costo para su publicación ni para ninguna de las etapas previas.

Derechos de autor

Acta Toxicológica Argentina es una publicación de acceso abierto y posee una Licencia Pública de Creative Commons (CC-BY-NC). Los autores conservan los derechos de autor y garantizan a la revista el derecho de ser la primera publicación del trabajo. Los autores retienen el derecho sobre sus trabajos bajo las normas de la licencia CC de tipo BY-NC, HYPERLINK "<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/>" Licencia Pública de Creative Commons que permite compartir el trabajo reconociendo su publicación inicial en esta revista, pudiendo los autores disponer del trabajo para el fin que consideren, con la sola excepción de su reproducción con fines comerciales, de acuerdo a este tipo de licencia de CC.

Derechos de publicación

Los autores retienen los derechos de publicación. Acta Toxicológica Argentina es una publicación de acceso abierto y posee una Licencia Pública de Creative Commons (CC-BY-NC). Los autores conservan los derechos de publicación y garantizan a la revista el derecho de ser el primer sitio de publicación del trabajo. Los autores retienen el derecho para publicar sus trabajos bajo las normas de la licencia CC de tipo BY-NC, "<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/>" Licencia Pública de Creative Commons que permite compartir el trabajo reconociendo su publicación inicial en esta revista, pudiendo los autores disponer del trabajo para el fin que consideren, con la sola excepción de su reproducción con fines comerciales, de acuerdo a este tipo de licencia de CC.

Aspectos generales en la preparación del manuscrito para artículo original

Los manuscritos deberán redactarse con pro-

cesador de texto (Microsoft Word versión 2003 o superior), a doble espacio (incluso los resúmenes, referencias y tablas) con un tamaño mínimo de letra Arial en 12 puntos. Las páginas deberán numerarse desde la portada. Las letras en negrita o itálica se usarán sólo cuando corresponda.

En la primera página se indicará: título del trabajo, nombres y apellidos completos de todos los autores; lugar de trabajo (nombre de la institución y dirección postal); de haber autores con distintos lugares de trabajo se colocarán superíndices numéricos -no encerrados entre paréntesis- junto a los nombres, de manera de identificar a cada autor con su respectivo lugar de trabajo; fax y/o correo electrónico del autor responsable de la correspondencia (que se indicará con un asterisco en posición de superíndice ubicado junto al nombre).

En la segunda página se incluirá el título en inglés y el resumen en el idioma del artículo y en inglés, seguido cada uno de ellos de una lista de tres a seis palabras clave, en el idioma correspondiente. Si el trabajo estuviese escrito en inglés, deberá tener un resumen en español. Las palabras clave iniciarán con mayúscula e irán separadas por punto y coma.

Introducción. Incluirá antecedentes actualizados acerca del tema en cuestión y los objetivos del trabajo definidos con claridad.

Materiales y métodos. Contendrá la descripción de los métodos, aparatos, reactivos y procedimientos utilizados, con el detalle suficiente para permitir la reproducción de los experimentos.

Consideraciones éticas. En todos los estudios clínicos se deberá especificar el nombre del Comité de Ética e Investigación que aprobó el estudio y que se contó con el consentimiento escrito de los pacientes. En todos los estudios con organismos no humanos, se deberán especificar los lineamientos éticos con respecto al manejo de los mismos durante la realización del trabajo.

Análisis estadístico. Se deberán informar las pruebas estadísticas con detalle suficiente como para que los datos puedan ser verificados por otros investigadores y fundamentar el empleo de cada una de ellas. Si se utilizó un programa estadístico para procesar los datos, éste deberá ser mencionado en esta sección.

Resultados. Se presentarán a través de una de las siguientes formas: en el texto, o mediante tabla/s y/o figura/s. Se evitarán repeticiones y se destacarán sólo los datos importantes. Se

dejará para la sección Discusión la interpretación más extensa.

Las **tablas** se presentarán en hoja aparte, numeradas consecutivamente con números arábigos, con las leyendas y/o aclaraciones que correspondan al pie. Las llamadas para las aclaraciones al pie se harán empleando números arábigos entre paréntesis y superíndice. Sólo los bordes externos de la primera y la última fila y la separación entre los títulos de las columnas y los datos se marcarán con línea continua. No se marcarán los bordes de las columnas. Asegúrese que cada tabla sea citada en el texto.

Las **figuras** se presentarán en hoja aparte, numeradas consecutivamente con números arábigos. Los dibujos deberán estar en condiciones que aseguren una adecuada reproducción. Los gráficos de barras, tortas o estadísticas deberán tener formato GIF. Los números, letras y signos tendrán dimensiones adecuadas para ser legibles cuando se hagan las reducciones necesarias. Las referencias de los símbolos utilizados en las figuras deberán ser incluidas en el texto de la leyenda.

Las **fotografías** deberán ser realizadas en blanco y negro, con buen contraste, en papel brillante y con una calidad suficiente (mínimo 300 dpi) para asegurar una buena reproducción. Los dibujos originales o las fotografías tendrán al dorso los nombres de los autores y el número de orden escritos con lápiz.

Las fotos para la versión electrónica deberán ser realizadas en el formato JPEG o GIF, con alta resolución. Tanto las figuras como las fotografías deberán ser legibles. El tamaño mínimo será media carta, es decir, 21 x 15 cm, a 300 dpi. En todos los casos se deberá indicar la magnificación utilizada (barra o aumento).

Los epígrafes de las figuras se presentarán exclusivamente en una hoja aparte, ordenadas numéricamente y deberán expresar específicamente lo que se muestra en la figura.

Abreviaturas. Se utilizarán únicamente abreviaturas normalizadas. Se evitarán las abreviaturas en el título y en el resumen. Cuando en el texto se emplee por primera vez una abreviatura, ésta irá precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

Unidades de medida. Las medidas de longitud, talla, peso y volumen se deberán expresar en unidades métricas (metro, kilogramo, litro) o sus múltiplos decimales.

Las temperaturas se facilitarán en grados Celsius y las presiones arteriales en milímetros de mercurio.

Todos los valores de parámetros hematológicos y bioquímicos se presentarán en unidades del sistema métrico decimal, de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). No obstante, los editores podrán solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores añadan unidades alternativas o distintas de las del SI.

Nomenclatura. En el caso de sustancias químicas se tomará como referencia prioritaria a las normas de la IUPAC. Los organismos se denominarán conforme a las normas internacionales, indicando sin abreviaturas el género y la especie en itálica.

Discusión. Se hará énfasis sobre los aspectos del estudio más importantes y novedosos y se interpretarán los datos experimentales en relación con lo ya publicado. Se indicarán las conclusiones a las que se arribó, evitando la reiteración de datos y conceptos ya vertidos en secciones anteriores.

Agradecimientos. Deberán presentarse en letra Arial con un tamaño de 10 puntos y en un sólo párrafo.

Bibliografía

Parte 1: citas en texto

El nombre del autor y el año de publicación aparecen entre paréntesis al final de la oración:

Este reclamo fue refutado más tarde (Jones 2008).

Si el nombre del autor se menciona claramente en el texto, puede seguirse directamente por el año de publicación, entre paréntesis:

Jones (2008) luego refutó esta afirmación.

Si tanto el nombre del autor como el año se mencionan claramente en el texto, no es necesario incluir una referencia entre paréntesis:

En 2008, Jones refutó esta afirmación.

Si está citando una parte específica de un documento (por ejemplo, una cita directa o una figura, gráfico o tabla), incluya el número de página en la que se encuentra esa información:

"Estos resultados contradicen claramente los publicados en 2004 por el laboratorio Smith". (Jones 2008, p. 56).

Más de un autor

Si un documento tiene dos autores, incluya

ambos apellidos separados por "y". Para trabajos con tres o más autores, incluya solo el nombre del primer autor, seguido de "et al.":

... (Andrews y Gray 1995).
... (Gómez et al. 2003).

Múltiples obras de diferentes autores.

Si cita varias fuentes a la vez, enumérelas en orden cronológico, o alfabéticamente si se publicaron dos o más obras en el mismo año, y separe cada una con un punto y coma:

... (Samson 1963; Carter y Bowles 1975; Grimes 1975; Anderson et al. 1992).

Múltiples obras del mismo autor publicadas en el mismo año.

Si está citando dos o más obras escritas por el mismo autor en el mismo año, agregue un identificador (a, b, c...) para distinguirlas. Use los mismos identificadores en la lista de referencia:

... (Dubois 1976a; Dubois 1976b).
Dubois J. 1976a. Detección de tendencias en...
Dubois J. 1976b. Patrones de distribución de...

Citando una fuente secundaria o indirecta

Si desea citar una fuente que se cita en otro documento, siempre es mejor consultar y luego citar la fuente original. Sin embargo, si no puede localizar y verificar el documento fuente original, debe citar la fuente secundaria y al mismo tiempo reconocer al autor de la idea original tanto en la cita en el texto como en la referencia final:

... (Rawls 1971, citado en Brown 2008)
Rawls J. 1971. A Theory of Justice. Cambridge (MA): Belknap Press. Cited in: Brown PG. 2008. The Commonwealth of Life: Economics for a Flourishing Earth. 2nd ed. Montreal (QC): Black Rose Books.

Organizaciones como autores

Si el autor de un documento es una organización, corporación, departamento de gobierno, universidad, etc., use una forma abreviada de la organización en la cita en el texto, reteniendo la primera letra de cada palabra en el nombre, o alguna otra reconocida abreviatura:

... (FAO 2006).

Parte 2: lista de referencias

La lista de referencias se encuentra al final de su trabajo e incluye información bibliográfica completa de todas las fuentes citadas en el texto. Las referencias se enumeran en orden alfabético por apellido del primer autor.

Componentes de referencias en la lista de referencias.

Los siguientes componentes, si están disponibles, se incluyen al citar una fuente, en la siguiente secuencia:

Libros y otras monografías.

Autor (es) o Editor (es)
Año de publicación
Título
Contenido o designador medio
Edición
Autor (es) secundario (s)
Lugar de publicación
Editor
Paginación
Serie

Artículos de revistas y periódicos.

Autor (es)
Año de publicación
Título del artículo
Contenido o designador medio
Título de revista o periódico
Volumen
Problema
Paginación

Autor (es) o Editor (es)

Enumere los apellidos e iniciales de los autores en el orden en que aparecen en el documento original, y separe cada uno con una coma.

Mary-Beth Macdonald y Laurence G. Kaufman se convierten en Macdonald MB, Kaufman LG.

Si el documento tiene editores en lugar de autores, coloque los apellidos y las iniciales seguidos de una coma y "editor (es)":

Macdonald MB, Kaufman LG, editores.

Más de diez autores.

Incluya siempre los nombres de los primeros diez autores. Si hay más de diez, incluya solo los primeros diez nombres de autores, seguidos de una coma y "et al".

Autor (es) secundario (s)

Los autores secundarios incluyen traductores, ilustradores, editores o productores, y pueden incluirse en la referencia, además de los autores principales, después del título del libro:

Márquez GG. 1988. Amor en tiempos del cólera. Grossman E, traductor. Nueva York...

Organizaciones como autores

El nombre completo de la organización debe identificarse en la lista de referencias, pero precedido por la abreviatura utilizada en el texto, entre corchetes. Ordene la referencia alfabéticamente por el nombre completo, no por el acrónimo:

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2006. Género y derecho: los derechos de las mujeres en la agricultura...

Título

Incluya tanto el título como los subtítulos, conservando la puntuación utilizada en el documento original. Para libros y títulos de artículos de revistas, escriba en mayúscula solo la primera palabra, así como los nombres propios, siglas e iniciales. Todas las palabras importantes en los títulos de las revistas pueden escribirse en mayúscula:

Libro: Cultivo de células vegetales: métodos esenciales

Revista: Canadian Journal of Animal Science

Designador de contenido

Los designadores de contenido describen el formato de un documento y pueden usarse para proporcionar información adicional con respecto a la naturaleza de un documento (por ejemplo, disertaciones, tesis, bibliografías y ciertos tipos de artículos de revistas, como editoriales, cartas al editor, noticias, etc.) Los designadores de contenido aparecen entre corchetes directamente después del título:

Bernier MH. 2009. Assessing on-farm water use efficiency in southern Ontario [thesis]. Montreal...

Designador medio

Los designadores medios indican que el documento está en un formato no impreso, como "microfichas", "CD-ROM" o "Internet". Se re-

quieren designadores medios y aparecen entre corchetes directamente después del título:

Gooderham CB. 1917. Enfermedades de las abejas [microfichas]. Ottawa...

Lugar de publicación y editorial

El lugar de publicación se refiere a la ciudad donde se encuentra el editor. Esta información generalmente se encuentra en la portada del libro en cuestión, o en el registro del catálogo McGill. Si no se puede encontrar un lugar de publicación, use las palabras [lugar desconocido] entre corchetes. Si aparece más de una ciudad, use solo la primera que aparezca. Ciertas ciudades pueden estar solas (por ejemplo, Nueva York), pero para evitar confusiones, se puede escribir el nombre del país o incluir el código de país ISO de 2 letras (por ejemplo, Reino Unido: GB). Para ciudades canadienses o estadounidenses, se puede incluir el código de provincia o estado de dos letras.

Paginación

Si usa solo una parte de un trabajo publicado (es decir, un artículo de revista o un capítulo de libro), indique la paginación de la sección a la que se refiere. La paginación es opcional si se refiere a todo el trabajo.

Serie

Si el documento es parte de una serie, debe agregar el título de la serie y el número de volumen al final de la entrada.

Parte 3: ejemplos (impresos)

Artículo de revista

Autor (es). Año. Título del artículo. Nombre de la revista Volumen (Edición): páginas.

Holmberg S, Osterholm M, Sanger K, Cohen M. 1987. Drug-resistant Salmonella from animals fed antimicrobials. New England Journal of Medicine. 311(2): 617-622.

Libro

Autor (es). Año. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial.

Carson R. 1962. Silent spring. Boston (MA): Houghton Mifflin.

Capítulo en un libro

Autor (es). Año. Título del capítulo. En: Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial.

pags. Páginas del capítulo.

Carson R. 1962. Earth's green mantle. En: Silent spring. Boston (MA): Houghton Mifflin. p. 63-83.

Libro editado

Nombre (s) del editor, editores. Año. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial.

Springate-Baginski O, Blaikie P, editors. 2007. Forests, people and power: the political ecology of reform in South Asia. London (GB): Earthscan.

Capítulo o artículo en un libro editado

Autor (es). de la parte. Año. Título del capítulo. En: Nombre (s) del editor, editores. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial. pags. Páginas del capítulo.

Banerjee A. 2007. Joint forest management in West Bengal. In: Springate-Baginski O, Blaikie P, editors. Forests, people and power: the political ecology of reform in South Asia. London (GB): Earthscan. p. 221-260.

Artículo en un diccionario o enciclopedia.

Cite como lo haría un artículo en un libro editado; Si no se especifica el autor de la parte, el editor asume el lugar del autor.

Libro en serie

Autor (es). Año. Título del libro. Edición. Lugar de publicación: Editorial. (Título de la serie; vol. #)

Tegos G, Mylonakis E, editors. 2012. Antimicrobial drug discovery: emerging strategies. Wallingford, Oxfordshire (GB): CABI. (Advances in molecular and cellular microbiology; vol.22).

Tesis o disertación

Autor (es). Año. Título [designador de contenido]. [Lugar de publicación]: Editorial (a menudo una universidad).

Bernier MH. 2009. Assessing on-farm water use efficiency in southern Ontario [tesis]. [Montreal (QC)]: McGill University.

Documentos de conferencia o actas

Autor (es). Año. Título del trabajo. En: Nombre (s) del editor, editores. Título del volumen. Número y nombre de la conferencia; fecha de la

conferencia; Lugar de la conferencia. Lugar de publicación: Editorial. pags. Páginas.

Clarke A, Crame JA. 2003. Importance of historical processes in global patterns of diversity. En: Blackburn TM, Gaston KJ, editors. Macroecology: concepts and consequences. Proceedings of the 43rd annual symposium of the British Ecological Society; 2002 Apr 17-19; Birmingham. Malden (MA): Blackwell. p. 130-152.

Parte 4: ejemplos (electrónicos)

La proliferación de información electrónica ha introducido nuevos desafíos, ya que los documentos pueden existir en varios formatos diferentes. Las fuentes electrónicas se citan de la misma manera que sus contrapartes impresas, con algunos elementos específicos de Internet agregados: un designador medio (consulte la descripción anterior), la fecha en que el documento se modificó o actualizó por última vez (si está disponible), la fecha citada y el URL del documento o DOI (identificador de objeto digital). Las opiniones difieren sobre la mejor manera de citar artículos de revistas electrónicas. Generalmente, un artículo electrónico basado en una fuente impresa, en formato PDF, se considera inalterable y se cita como un artículo impreso.

Al ver artículos de revistas en línea, los enlaces que aparecen en el cuadro de dirección de su navegador pueden ser temporales y dejarán de funcionar después de unos días. Muchas bases de datos y editores proporcionarán un enlace permanente o persistente, o buscarán el DOI (identificador de objeto digital) del artículo, que a menudo aparece junto con el resto de la información de citas.

Artículo electrónico en formato PDF.

Los artículos en formato pdf, basados en una fuente impresa, pueden citarse como un artículo de revista impresa (ejemplo en la Parte 3).

Artículo electrónico en formato HTML o de texto.

Autor (es) Año. Título del artículo. Nombre de la revista [designador medio]. [fecha actualizada; fecha de cita]; Volumen (Edición): páginas (si están disponibles). Disponible en: URL o DOI

Woolf D, Amonette JE, Street-Perrott FA, Lehmann J, Joseph S. 2010. Sustainable bio-

char to mitigate global climate change. Nature Communications [Internet]. [citado el 18 de agosto de 2010]; 1(Art. 56). Disponible en: <http://www.nature.com/ncomms/journal/v1/n5/full/ncomms1053.html>

Libro electrónico

Autor (es) o Editor (es). Año. Título del libro [designador medio]. Edición. Lugar de publicación: editorial; [fecha actualizada; fecha de cita]. Disponible en: URL

Watson RR, Preedy VR, editors. 2010. Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables [Internet]. Amsterdam: Academic Press; [citado el 22 de abril de 2010]. Disponible en: www.sciencedirect.com/science/book/9780123746283

Artículo en un diccionario electrónico o enciclopedia.

Cita como lo harías con un artículo en un libro electrónico

Allaby M, editor. 2006. photosynthesis. In: Dictionary of Plant Sciences [Internet]. Rev. ed. Oxford: Oxford University Press; [citado el 31 de agosto de 2010]. Disponible en: www.oxfordreference.com/views/ENTRY.html?subview=Main&entry=t7.e5147

Sitio web

Título del sitio web [designador medio]. Fecha de publicación. Lugar de publicación: Editorial; [fecha actualizada; fecha de cita]. Disponible en: URL

Electronic Factbook [Internet]. 2007. Montreal (QC): McGill University; [actualizado al 30 de marzo de 2007; citado el 11 de enero de 2013]. Disponible en: <http://www.is.mcgill.ca/upo/factbook/index-upo.htm>

Documento en línea

Autor (es) Fecha de publicación. Título [designador medio]. Edición. Lugar de publicación: Editorial; [fecha actualizada; fecha de cita]. Disponible en: URL

Kruse JS. 2007. Framework for sustainable soil management: literature review and synthesis [Internet]. Ankeny (IA): Soil and Water Conservation Society; [citado el 3 de agosto de 2008]. Disponible en: <http://www.swcs.org/documents/filelibrary/BeyondLiteraturereview.pdf>

INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 0327-9286) is the official publication for scientific promotion of the *Asociación Toxicológica Argentina*. It is a member of the *Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas* (Basic Core of Argentinean Scientific Journals) since 2007. Full articles can be accessed through SciELO Argentina electronic library.

The goal of *Acta Toxicológica Argentina* is to publish articles concerning all areas of Toxicology, including original articles, case reports, short communications, revisions, popularization of science articles, technical notes, images, thesis summaries, letters to the editor and relevant news.

Original articles must detail complete research and should be organized into the following sections: Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion (the last two can be combined into one section).

Case reports include description of clinical case studies which represent a contribution to the field of Toxicology.

Short communications are brief, concise articles that contribute to the respective area of Toxicology.

Revisions or updates comprise studies where an extensive revision of a topic of current importance and/or interest has been carried out.

Articles concerned with popular science and special articles can comment on a broad range of toxicological topics.

Technical notes should briefly describe new devices or analytical techniques validated by conclusive experimental studies.

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

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

Such images should be not necessarily exceptional, but illustrative.

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

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

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

No more than three authors may be listed.

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

Thesis summaries are sufficiently detailed abstracts of approved doctoral or magisterial thesis. They must include a copy of acceptance and a sworn statement by the author and director, and should not exceed 1,000 characters.

Articles can be submitted to *Acta Toxicológica Argentina* (henceforth *Acta*) in Spanish, Portuguese or English. All submissions will be evaluated by at least two independent reviewers, selected by the editors. The Editorial board will base its decision to reject, accept with changes or accept for publication the submitted article on these reviews. The identity of authors and reviewers will not be disclosed throughout this process.

Submission of manuscripts

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

Free publishing costs

The submission, reviewing, editing and publishing of any kind of scientific or technical material or of any disclosure material accepted by

Acta Toxicological Argentina is totally free for authors, not having to pay any cost for its publication or for any of the previous stages.

Copyright

Acta Toxicológica Argentina is an open access journal and has a Creative Commons Public License (CC-BY-NC). Authors retain copyright on their work; nevertheless, they guarantee the journal the right to be the first in its publication. Authors retain the rights of their work under the guidelines of the license CC BY-NC, Creative Commons Public License. They can freely share their work (always recognizing its initial publication in this journal) with the sole exception of its reproduction for commercial purposes, according to this kind of CC license.

Publishing rights

Acta Toxicológica Argentina is a open access journal and has a Creative Commons Public License (CC-BY-NC). Authors retain the license of their article and the publication rights on their work; nevertheless, they guarantee the journal the right to be the first in its publication. Authors retain the license and rights to their work under the guidelines of the license CC BY-NC, Creative Commons Public License <http://creativecommons.org/licenses/bync/2.5/ar/>. They can freely share their work (recognizing its initial publication in this journal) with the sole exception of reproduction of the work published for commercial purposes, according to this kind of CC license.

General guidelines in the preparation of manuscripts for original articles

Articles must be written using a word processor (Microsoft Word 2003 or higher) with double-spacing throughout (including abstract, references and tables), and a minimum letter size of Arial 12. Manuscripts must contain page numbers on each page from the first page. The use of bold and italic letters must be limited to the bare minimum necessary.

First page should contain the article title, full name and affiliations of all authors, workplace (name of institution and postal address; if it differs between authors, numerical superscripts, not in parentheses, next to each author should be used to identify it); fax and/or e-mail address of the corresponding author (signaled by a subscript asterisk next to the name).

Second page must include an English title and the abstract, both in the language of submis-

sion and in English, each followed by three to six keywords in the corresponding language. If the article is written in English, then the abstract in Spanish must be provided. Keywords must be headed by capital letters and separated by semicolons.

Introduction. It should include updated background references and clearly stated study goals.

Materials and methods. This section should describe the methods, devices, reagents and procedures used, sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced.

Ethical considerations. All clinical studies must specify the name of the Ethics and Research Committee responsible for the approval of the study, as well as the patients' written consent. Studies involving non human experimental subjects must give assurance that ethical guidelines for the protection of animal handling and welfare were followed.

Statistical analysis. The statistical tests employed should be properly explained and justified to allow verification by other researchers. If statistical software was used to process data, it should be mentioned.

Results can be showed through one of the following formats: text, tables or figures. Authors should avoid repetition, and only the relevant data should be presented. An extensive interpretation of the results should be left for the Discussion section.

Tables must be typed in separate pages and numbered consecutively with Arabic numerals in order of appearance in the text. Legends or explanations should be included as footnotes. Marks for footnotes must be superscript Arabic numerals in parentheses. Continuous lines may be only used for the outer borders of the first and last row and to separate columns and data titles, not for outer borders of columns. Please make sure that each table is cited in the text.

Figures should be numbered consecutively with Arabic numerals and presented in separate pages. Drawings must be of good enough quality to ensure adequate reproduction. Bar, pie or statistical charts must be prepared in GIF format. Numbers, letters and signs within figures must be of the appropriate size to be legible when the final sizing takes place. All signs used must have a reference in the figure caption.

Black-and-white only **photographs** should have proper contrast and a minimum resolution of 300 dpi. Submit all original drawings and

photographs in glossy paper with the authors' name and figure number written in pencil in the back. For the electronic submission, photographs should be in high resolution JPEG or GIF formats. Both figures and photographs must be clearly legible. The minimum size for figures is half-letter paper size (21 x 15 cm) at 300 dpi. Magnification must be indicated whether by a scale bar or the magnification number. Present figure captions in a separate page, accordingly numbered. Only the elements visible in the corresponding figure must be included in the caption.

Abbreviations. Authors should only use conventional abbreviations, avoiding their use in the title and abstract. When an abbreviation is first introduced in the text it must be preceded by the full term, except in the case of unit measures.

Unit measures. Length, size, weight and volume measures should be expressed according to the metric system (meter, kilogram, liter or their decimal multiples). Temperatures will be provided in degrees Celsius; blood pressure in millimeters of mercury.

All hematological and biochemical parameters should follow the metric system, according to the International System of Units (SI). However, editors could require that alternate units be provided before publication.

Nomenclature. For chemicals, authors should primarily adhere to IUPAC norms. Designate organism names according to international norms by stating the unabbreviated genus and species in italic.

Discussion. Emphasis should be placed on the most relevant and novel aspects of the study. Interpret experimental data in terms of previous published findings. Include conclusions without repeating data and concepts stated elsewhere.

Acknowledgements. Limit to a single paragraph, using Arial 10 lettering.

References.

Part 1: in-text citations

The author's name and the year of publication are listed in parentheses at the end of the sentence:

This claim was later refuted (Jones 2008).

If the author's name is clearly mentioned in the text, it can be directly followed by the year of publication, in parentheses:

Jones (2008) later refuted this claim.

If both the author name and year are clearly mentioned in the text, there is no need to include a parenthetical reference:

In 2008, Jones refuted this claim.

If you are citing a specific part of a document (e.g. a direct quotation, or a figure, chart or table), include the page number on which that information is found:

"These results clearly contradict those published in 2004 by the Smith lab." (Jones 2008, p. 56).

More than one author

If a document has two authors, include both surnames separated by "and". For works with three or more authors, include only the first author name, followed by "et al.":

... (Andrews and Gray 1995).

... (Gomez et al. 2003).

Multiple works by different authors

If you are citing several sources at once, list them in chronological order, or alphabetically if two or more works were published in the same year, and separate each one with a semicolon:

... (Samson 1963; Carter and Bowles 1975; Grimes 1975; Anderson et al. 1992).

Multiple works by the same author published in the same year

If you are citing two or more works written by the same author in the same year, add a designator (a, b, c...) to distinguish them. Use the same designators in the reference list:

... (Dubois 1976a; Dubois 1976b).

Dubois J. 1976a. Detection of trends in...

Dubois J. 1976b. Distribution patterns of...

Citing a secondary or indirect source

If you would like to cite a source that is cited in another document, it is always best to consult and then cite the original source. However, if you are unable to locate and verify the original source document, you must cite the secondary source while at the same time acknowledging the author of the original idea in both the in-text citation and end reference:

... (Rawls 1971, cited in Brown 2008)

Rawls J. 1971. *A Theory of Justice*. Cambridge (MA): Belknap Press. Cited in: Brown PG. 2008. *The Commonwealth of Life: Economics for a Flourishing Earth*. 2nd ed. Montreal (QC): Black Rose Books.

Mary-Beth Macdonald and Laurence G. Kaufman become Macdonald MB, Kaufman LG.

If the document has editors rather than authors, follow the names with a comma and “editor(s)”:

Macdonald MB, Kaufman LG, editors.

Organizations as authors

If the author of a document is an organization, corporation, government department, university, etc., use an abbreviated form of the organization in the in-text citation, by retaining the first letter of each word in the name, or some other recognized abbreviation:

... (FAO 2006).

Part 2: reference list

The reference list comes at the end of your paper and includes full bibliographic information for all of the sources cited in the text. The references are listed in alphabetical order by first author last name.

Components of references in the reference list

The following components, if available, are included when citing a source, in the following sequence:

Books and other monographs

Author(s) or Editor(s)

Year of publication

Title

Content or medium designator

Edition

Secondary author(s)

Place of Publication

Publisher

Pagination

Series

Journal and newspaper articles

Author(s)

Year of publication

Article title

Content or medium designator

Journal or newspaper title

Volume

Issue

Pagination

Author(s) or Editor(s)

List the last names and initials of the authors in the order in which they appear in the original document, and separate each one with a comma.

More than ten authors

Always include the names of the first ten authors. If there are more than ten, include the first ten author names only, followed by a comma and “*et al.*”

Secondary author(s)

Secondary authors include translators, illustrators, editors or producers, and may be included in the reference, in addition to the principal author(s), after the book title:

Marquez GG. 1988. *Love in the time of cholera*. Grossman E, translator. New York...

Organizations as authors

The full name of the organization must be identified in the reference list, but preceded by the abbreviation used in the text, in square brackets. Order the reference alphabetically by the full name, not the acronym:

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006. *Gender and law: Women's rights in agriculture...*

Title

Include both the title and subtitle, retaining the punctuation used in the original document. For books and journal article titles, capitalize only the first word, as well as proper nouns, acronyms and initials. All significant words in journal titles may be capitalized:

Book: Plant cell culture: essential methods
Journal: Canadian Journal of Animal Science

Content designator

Content designators describe the format of a document, and may be used to provide additional information with regards to the nature of a document (e.g. dissertations, theses, bibliographies, and certain types of journal articles such as editorials, letters to the editor, news, etc.). Content designators appear in square brackets directly after the title:

Bernier MH. 2009. Assessing on-farm water use efficiency in southern Ontario [thesis]. Montreal...

Medium designator

Medium designators indicate that the document is in a non-print format, such as “microfiche”, “CD-ROM”, or “Internet”. Medium designators are required and appear in square brackets directly after the title:

Gooderham CB. 1917. Bee diseases [microfiche]. Ottawa...

Place of publication and Publisher

The place of publication refers to the city where the publisher is located. This information is usually found on the title page of the book in question, or in the McGill catalogue record. If no place of publication can be found use the words [place unknown] in square brackets. If more than one city is listed, use only the first one that appears. Certain cities may stand alone (e.g. New York), but in order to avoid confusion, the country name may be written out or 2 letter ISO country code included (e.g. United Kingdom: GB). For Canadian or U.S. cities, the two letter province or state code may be included.

Pagination

If using only part of a published work (ie. a journal article, or a book chapter), indicate the pagination of the section you are referring to. Pagination is optional if you are referring to the entire work.

Series

If the document is part of a series, you must add the series title and volume number at the end of the entry.

Part 3: examples (print)

Journal article

Author(s). Year. Article title. Journal name. Volume(Issue): Pages.

Holmberg S, Osterholm M, Sanger K, Cohen M. 1987. Drug-resistant Salmonella from animals fed antimicrobials. *New England Journal of Medicine*. 311(2): 617-622.

Book

Author(s). Year. Book Title. Edition. Place of Publication: Publisher.

Carson R. 1962. *Silent spring*. Boston (MA): Houghton Mifflin.

Chapter in a book

Author(s). Year. Chapter title. In: Book title. Edition. Place of Publication: Publisher. p. Pages of the chapter.

Carson R. 1962. Earth's green mantle. In: *Silent spring*. Boston (MA): Houghton Mifflin. p. 63-83.

Edited book

Editor name(s), editors. Year. Book title. Edition. Place of Publication: Publisher.

Springate-Baginski O, Blaikie P, editors. 2007. *Forests, people and power: the political ecology of reform in South Asia*. London (GB): Earthscan.

Chapter or article in an edited book

Author(s) of the part. Year. Chapter title. In: Editor name(s), editors. Book title. Edition. Place of Publication: Publisher. p. Pages of the chapter.

Banerjee A. 2007. Joint forest management in West Bengal. In: Springate-Baginski O, Blaikie P, editors. *Forests, people and power: the political ecology of reform in South Asia*. London (GB): Earthscan. p. 221-260.

Article in a dictionary or encyclopedia

Cite as you would an article in an edited book; if the author of the part is not specified, the editor assumes the place of the author.

Book in a series

Author(s). Year. Book Title. Edition. Place of Publication: Publisher. (Series title; vol. #)

Tegos G, Mylonakis E, editors. 2012. *Antimicrobial drug discovery: emerging strategies*. Wallingford, Oxfordshire (GB): CABI. (Advances in molecular and cellular microbiology; vol.22).

Thesis or dissertation

Author(s). Year. Title [content designator]. [Place of Publication]: Publisher (often a university).

Bernier MH. 2009. Assessing on-farm water use efficiency in southern Ontario [thesis]. [Montreal (QC)]: McGill University.

Conference papers or proceedings

Author(s). Year. Title of paper. In: Editor name(s),

editors. Title of Volume. Number and name of conference; date of conference; location of conference. Place of publication: Publisher. p. Pages.

Clarke A, Crame JA. 2003. Importance of historical processes in global patterns of diversity. In: Blackburn TM, Gaston KJ, editors. Macroecology: concepts and consequences. Proceedings of the 43rd annual symposium of the British Ecological Society; 2002 Apr 17-19; Birmingham. Malden (MA): Blackwell. p. 130-152.

Part 4: examples (electronic)

The proliferation of electronic information has introduced new challenges, as documents can exist in several different formats. Electronic sources are cited in the same way as their print counterparts, with some internet-specific items added: a medium designator (see description above), the date the document was last modified or updated (if available), the date cited, and the document URL or DOI (digital object identifier)

Opinions differ on how best to cite electronic journal articles. Generally, an electronic article based on a print source, in PDF format, is considered unalterable and is cited like a print article would be. Electronic articles in html or text format could easily be altered or exist in several versions, and should be cited respecting the rules for websites and other electronic documents.

When viewing journal articles online, the links that appear in your browser's address box may be temporary and will no longer work after a few days. Many databases and publishers will provide a permanent or persistent link, or, look for the article's DOI (digital object identifier), which is often listed along with the rest of the citation information.

Electronic article in PDF format

Articles in pdf format, based on a print source, can be cited like a print journal article (example in Part 3).

Electronic article in HTML or text format

Author(s). Year. Article title. Journal name [medium designator]. [date updated; date cited]; Volume(Issue): Pages (*if available*). Available from: URL or DOI

Woolf D, Amonette JE, Street-Perrott FA, Lehmann J, Joseph S. 2010. Sustainable biochar to mitigate global climate change. Nature Communications [Internet]. [cited 2010 Aug 18]; 1(Art. 56). Available from: <http://www.nature.com/ncomms/journal/v1/n5/full/ncomms1053.html>

Electronic book

Author(s) or Editor(s). Year. Book Title [medium designator]. Edition. Place of Publication: Publisher; [date updated; date cited]. Available from: URL

Watson RR, Preedy VR, editors. 2010. Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables [Internet]. Amsterdam: Academic Press; [cited 2010 Apr 22]. Available from: www.sciencedirect.com/science/book/9780123746283

Article in an electronic dictionary or encyclopedia

Cite as you would an article in an electronic book

Allaby M, editor. 2006. photosynthesis. In: Dictionary of Plant Sciences [Internet]. Rev. ed. Oxford: Oxford University Press; [cited 2010 Aug 31]. Available from: www.oxfordreference.com/views/ENTRY.html?subview=Main&entry=t7.e5147

Website

Title of website [medium designator]. Date of publication. Place of publication: Publisher; [date updated; date cited]. Available from: URL

Electronic Factbook [Internet]. 2007. Montreal (QC): McGill University; [updated 2007 Mar 30; cited 2013 Jan 11]. Available from: <http://www.is.mcgill.ca/upo/factbook/index-upo.htm>

Online document

Author(s). Date of publication. Title [medium designator]. Edition. Place of publication: Publisher; [date updated; date cited]. Available from: URL

Kruse JS. 2007. Framework for sustainable soil management: literature review and synthesis [Internet]. Ankeny (IA): Soil and Water Conservation Society; [cited 2008 Aug 3]. Available from: <http://www.swcs.org/documents/filelibrary/BeyondLiteraturereview.pdf>

INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

Acta Toxicológica Argentina (Acta Toxicol. Argent.) (ISSN 0327-9286) é o órgão oficial de difusão científica da Associação Toxicológica Argentina. Integra desde o ano de 2007 o Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas, tem acesso a artigos e textos completos através da SciELO Argentina. *Acta Toxicológica Argentina* tem como objetivo a publicação de trabalhos relacionados com diferentes áreas da Toxicologia, em formato de artigos originais, relatos de casos, comunicações breves, atualizações ou revisões, artigos de divulgação, imagens, resumos da tese, notas técnicas, cartas ao editor e notícias.

Os artigos originais são trabalhos de pesquisa completos e devem ser apresentados respeitando as seguintes seções: Introdução; Materiais e métodos; Resultados e Discussão (que podem integrar uma seção anexa).

Os relatos de casos são descrições de casos clínicos que tenham em suas características um significado ou aporte importante à Toxicologia.

As comunicações curtas são trabalhos de menor extensão, mas, com conotação toxicológica inovadora e com um aporte importante ao campo toxicológico.

As revisões ou atualizações compreendem trabalhos nos quais se tenha realizado uma ampla e completa revisão de um tema importante e/ou de grande interesse atual nos diferentes campos da toxicologia.

Os artigos de divulgação e artigos especiais são comentários de diversos temas de interesse toxicológico.

As notas técnicas são descrições breves de técnicas analíticas ou dispositivos novos ou apoiados por trabalhos experimentais conclusivos.

As imagens em Toxicologia podem corresponder a imagens relacionadas à toxicologia, dos aspectos artísticos aos biológicos: plantas tóxicas, cogumelos tóxicos, animais venenosos, animais venenosos, animais venenosos, florações de algas, químicos, alterações ambientais, casos clínicos, diagnóstico por imagem (raios X, eletrocardiogramas, ecografias, angiografia, tomografia, ressonância magnética, microscopia óptica ou eletrônica, etc.).

O objetivo da Seção Imagens em Toxicologia é

a publicação de imagens originais (1-2 figuras de alta qualidade) ou clássicos interessantes ou descobertas incomuns que facilitem diagnóstico clínico, laboratorial ou eco-epidemiológico com origem toxicológica.

As imagens podem não ser excepcionais, mas sim ilustrativas.

O título deve ser curto e descritivo. Se a imagem é uma imagem clínica, o texto deve ser uma descrição da apresentação do paciente seguido de pontos explicativos relevantes e o diagnóstico final. As imagens devem incluir uma legenda descritiva. Se a imagem corresponde a outros pontos da toxicologia uma breve descrição do contexto deve ser incluída no texto. Favor usar setas ou sinais para identificar pontos de interesse na imagem. Nos casos clínicos, favor remover qualquer caso de identificação de pacientes.

O máximo de palavras recomendada é: resumo 200, texto 1000 e não mais de 12 referências. Será aceito um máximo de 3 autores por imagem.

Caso a imagem não seja original, ela deve ser acompanhada pela autorização do proprietário ou quem quer que seja o proprietário dos direitos, deve ser indicada na nota a ser submetida ao Editorial ao Conselho Editorial da *Acta Toxicológica*.

Resumos de tese: Resumos ampliados que descrevem teses de Mestrado e Doutorado aprovadas. Estas devem incluir cópia da aprovação da tese com a declaração juramentada do autor e seu orientador. O texto não deve ultrapassar 1000 caracteres.

Acta Toxicológica Argentina (em adiante *Acta*) publicará contribuições em espanhol, português e/ou inglês. Todas serão avaliadas por pelo menos dois revisores; a seleção dos mesmos será atributo exclusivo dos editores. Este processo determinará que o mencionado Comitê opte por rejeitar, aceitar com alterações ou aceitar para publicação o trabalho submetido à sua consideração. A identidade dos autores e revisores será mantida de forma confidencial.

Envio de trabalhos

Os manuscritos devem ser submetidos através do Portal de Publicações Científicas e Técnicas (PPCT) do Centro Argentino de Informação Científica e Tecnológica (CAICYT). No site do

PPCT-CAICYT <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ata> você encontrará instruções para os autores.

Gratuidade das publicações

O envio, revisão, edição e publicação de qualquer tipo de material técnico científico ou de divulgação aceito pela *Acta Toxicológica Argentina* é completamente livre de custos para os autores, que não são obrigados a pagar nenhum tipo de custo de publicação ou para qualquer uma das etapas anteriores.

Direitos autorais

Os autores retêm os direitos da publicação. *Acta Toxicológica Argentina* é um acesso aberto e detém uma Licença Pública Creative Commons (CC-BY-NC). Os autores conservam os direitos de publicação e garantia à revista o direito para ser o primeiro local de publicação do trabalho. Os autores retêm o direito ao seu trabalho sob o Regras da licença CC do tipo BY-NC "<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/>" Licença Pública Creative Commons que permite compartilhar o trabalho, reconhecendo sua publicação inicial nesta revista, os autores podem dispor da obra para qualquer finalidade que considerem adequada, com a única exceção de sua reprodução para fins comerciais, de acordo com este tipo de licença CC.

Direitos de publicação

Os autores conservam os direitos de publicação. *Acta Toxicológica Argentina* é um acesso aberto

publicação de livre acesso e detém um Licença Pública Creative Commons (CCBY-NC). Os autores retêm os direitos de publicação direitos de publicação e conceder à revista o direito de ser a primeira ser o primeiro site de publicação da obra. Os autores retêm o direito de publicar seu trabalho de acordo com as regras do a licença CC BY-NC, "<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/>" Licença Pública Creative Commons que permite que o trabalho seja compartilhado, reconhecendo sua publicação inicial nesta revista, com os autores os autores podem utilizar a obra para qualquer finalidade a única exceção de sua reprodução para fins comerciais de acordo com este tipo de licença CC.

Aspectos gerais na preparação do manuscrito para artigo original

Os manuscritos devem ser escritos usando um processador de texto (Microsoft Word versão

2003 ou superior), espaçamento duplo (incluindo resumos, referências e tabelas) fonte Arial e tamanho mínimo 12. As páginas devem ser numeradas a partir da página de título. Negrito ou itálico ou itálico deve ser usado somente quando apropriado.

Na primeira página deve ser indicado: título do artigo, nomes e sobrenomes completo de todos os autores, local de trabalho (nome da instituição e endereço postal); se houver autores com diferentes locais de trabalho, os sobrescritos numéricos devem ser utilizados - não colocar entre parênteses - ao lado dos nomes, de modo a identificar cada autor com seu respectivo local de trabalho; fax e/ou e-mail do autor responsável pela correspondência (a ser indicada com um asterisco em sobrescrito ao lado do nome).

A segunda página deve incluir o título em inglês e o resumo no idioma do artigo e em inglês, cada uma seguida por uma lista de três a seis palavras-chave m no idioma correspondente. Se o artigo for escrito em inglês, deve ter um resumo em espanhol. As palavras-chave devem começar com uma letra maiúscula e separados por ponto-e-vírgula.

Introdução. Deve incluir antecedentes atualizados sobre o tema em questão e objetivos do trabalho definidos com clareza.

Materiais e métodos. Deverá conter a descrição dos métodos, equipamentos, reativos e procedimentos utilizados, com detalhes suficientes para permitir a repetição dos experimentos.

Considerações éticas. Em todos os estudos clínicos deverá estar especificado o nome do Comitê de Ética e Investigação que aprovou o estudo e que foi realizado com o consentimento escrito dos pacientes. Em todos os estudos com organismos não humanos, devem estar especificadas os procedimentos éticos com respeito ao manejo dos mesmos durante a realização do trabalho.

Análises estatísticas. Devem ser informadas as provas estatísticas com detalhe suficiente para que os dados possam ser revisados por outros pesquisadores descrevendo detalhes de cada uma delas. Se for utilizado um programa estatístico para processar os dados, este deverá ser mencionado nesta seção.

Resultados. Deverão ser apresentados através de uma das seguintes formas: no texto, ou através de tabelas e/ou figura/s. Deverão ser evitadas repetições e serão destacados somente dados importantes. Deverá ser deixada

para a seção Discussão a interpretação mais extensa.

As **tabelas** deverão ser apresentadas em folha à parte, numeradas consecutivamente com números arábicos, com as descrições correspondentes no rodapé. Os avisos para esclarecimentos de rodapé deverão ser realizados empregando números arábicos entre parênteses e sobrescrito. Somente as bordas externas da primeira e última linhas e a separação entre os títulos das colunas e os dados deverão ser marcados com linha contínua. Não marcar as bordas das colunas. Assegurar-se de que cada tabela seja citada no texto.

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

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

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

O título das figuras deverá ser apresentado exclusivamente em folha à parte, ordenadas e numeradas, e deverão expressar especificamente o que mostra a figura.

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

Unidades de medida. As medidas de longitude, tamanho, peso e volume deverão ser expressas em unidades métricas (metro, quilograma, litro) ou seus múltiplos decimais. As temperaturas serão expressas em graus Cel-

sus e as pressões arteriais em milímetros de mercúrio. Todos os valores de parâmetros hematológicos e bioquímicos deverão ser apresentados em unidades do sistema métrico decimal, de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI). Não obstante, os editores poderão solicitar que, antes de publicar o artigo, os autores agreguem unidades alternativas ou diferentes das do SI.

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

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

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

Bibliografia

Parte 1: citações no texto

O nome do autor e ano de publicação aparecem entre parênteses no final da frase:

Esta afirmação foi posteriormente refutada (Jones 2008).

Se o nome do autor for claramente mencionado no texto, pode ser seguido diretamente pelo ano de publicação entre parênteses:

Jones (2008) posteriormente refutou essa afirmação.

Se o nome do autor e o ano forem claramente mencionados no texto, não é necessário incluir uma referência entre parênteses:

Em 2008, Jones refutou essa afirmação.

Se você está citando uma parte específica de um documento (por exemplo, uma citação direta ou uma figura, gráfico ou tabela), inclua o número da página onde essas informações podem ser encontradas:

"Esses resultados contradizem claramente o publicado

em 2004 pelo laboratório Smith". (Jones 2008, p. 56).

Mais de um autor

Se um documento tiver dois autores, inclua ambos os sobrenomes separados por "e". Para trabalhos

com três ou mais autores, inclua apenas o nome do primeiro autor, seguido de "et al.":

... (Andrews e Gray 1995).

... (Gómez *et al.* 2003).

Múltiplas obras de diferentes autores.

Se citar várias fontes ao mesmo tempo, liste-as em ordem cronológica, se foram publicados duas ou mais obras no mesmo ano liste-as em ordem alfabética, e separe cada uma por ponto e vírgula:

... (Samson 1963; Carter e Bowles 1975; Grimes 1975; Anderson *et al.* 1992).

Vários trabalhos publicados pelo mesmo autor no mesmo ano.

Se você está citando duas ou mais obras escritas pelo mesmo autor no mesmo ano, adicione um identificador (a, b, c ...) para distingui-los. Use os mesmos identificadores na lista de referência:

... (Dubois 1976a; Dubois 1976b).

Dubois J. 1976a. Detecção de tendência dentro...

Dubois J. 1976b. Padrões de distribuição de ...

Citando uma fonte secundária ou indireta

Se deseja citar uma fonte que já é citada em outro documento, é sempre melhor consultar e fazer a citação da fonte original. No entanto, se não conseguir localizar e verificar o documento original, você deve citar a fonte secundária e ao mesmo tempo reconhecer o autor da ideia original tanto na citação no texto quanto na referência final:

... (Rawls 1971, citado em Brown 2008)

Rawls J. 1971. A Theory of Justice. Cambridge (MA): Belknap Press. Citado em: Brown PG. 2008. The Commonwealth of Life: Economics para uma Terra florescente. 2ª ed. Montreal (QC): Black Rose Books.

Organizações como autores

Se o autor de um documento for uma organização, corporação, departamento governamental, universidade etc., use uma forma abreviada da organização na citação no texto, mantendo a primeira letra de cada palavra do nome, ou alguma outra abreviatura reconhecida:

... (FAO 2006).

Parte 2: lista de referências

A lista de referências está no final de seu trabalho e inclui informações bibliográficas completas de todas as fontes citadas no texto. As referências são listadas em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor.

Componentes de referências na lista de referências.

Os seguintes componentes, se disponíveis, são incluídos ao citar uma fonte, na seguinte sequência:

Livros e outras monografias.

Autor (es) ou Editor (es)

Ano de publicação

Título

Conteúdo ou designador médio

Edição

Autor (es) Secundário (s)

Local de publicação

Editor

Paginação

Série

Artigos de revistas e periódicos/jornais.

Autor (es)

Ano de publicação

Título do artigo

Conteúdo ou designador médio

Título de revista ou jornal

Volume

Problema

Paginação

Autor (es) ou Editor (es)

Liste os sobrenomes e iniciais dos autores na ordem em que aparecem no documento original, e separe cada um com uma vírgula.

Mary-Beth Macdonald e Laurence G. Kaufman se convertem em Macdonald MB, Kaufman LG.

Se o documento tiver editores em vez de autores, coloque os sobrenomes e as iniciais seguidas de uma vírgula e "editor (es)":

Macdonald MB, Kaufman LG, editores.

Mais de dez autores.

Sempre inclua os nomes dos dez primeiros autores. Se houver mais de dez, inclua apenas os primeiros dez nomes de autores, seguidos de uma vírgula e "et al".

Autor (es) Secundário (s)

Os autores secundários incluem tradutores, ilustradores, editores ou produtores, e podem ser incluídos na referência, além dos autores principais, após o título do livro:

Marquez GG. 1988. Amor em tempos de cólera. Grossman E, tradutor. Nova York...

Organizações como autores

O nome completo da organização deve ser identificado na lista de referências, mas precedido pela abreviatura usada no texto, entre colchetes. Ordene a referência em ordem alfabética pelo nome completo, não por acrônimo:

[FAO] Organização das Nações Unidas para Alimentos e Agricultura. 2006. Gênero e direito: direitos das mulheres na agricultura ...

Título

Inclui o título como os subtítulos, mantendo a pontuação usada no documento original. Para livros e títulos de artigos de revistas, escreva em maiúsculo somente a primeira palavra, bem como nomes próprios, siglas e iniciais. Todas as palavras importantes nos títulos das revistas podem ser escritas em letras maiúsculas:

Livro: Cultura de células vegetais: métodos essenciais
Revista: Canadian Journal of Animal Science

Designador de conteúdo

Os designadores de conteúdo descrevem o formato de um documento e podem ser usados para fornecer informações adicionais em relação à natureza de um documento (por exemplo, dissertações, teses, bibliografias e certos tipos de artigos de revistas, como edito-

riais, cartas ao editor, notícias etc.) Os designadores de conteúdo aparecem entre colchetes logo após o título:

Bernier MH. 2009. Assessing on-farm water use efficiency in southern Ontario [tese]. Montreal ...

Designador médio

Os designadores médios indicam que o documento está em um formato não impresso, como "DISQUETES", "CD-ROM" ou "Internet". É requerido designadores médios e aparecem entre colchetes logo após o título:

Gooderham CB. 1917. Doenças das abelhas [DISQUETES]. Ottawa ...

Local de publicação e editorial

O local de publicação refere-se à cidade onde o editor está localizado. Esta informação é normalmente encontrada na capa do livro em questão, ou no registro do catálogo McGill. Se não encontrar o lugar de publicação, use as palavras [lugar desconhecido] entre colchetes. Se aparecer mais de uma cidade, use apenas a primeira que aparecer. Certas cidades podem estar sozinhas (por exemplo, Nova York), mas para evitar confusão, se pode escrever o nome do país ou incluir o Código ISO de 2 letras do país (por exemplo, Reino Unido: GB). Para cidades canadenses ou estadunidenses, se pode incluir o código do estado ou província de duas letras.

Paginação

Se você usar apenas parte de um trabalho publicado (isto é, um artigo de revista ou um capítulo de livro), indique a paginação da seção que se refere. A paginação é opcional se fizer referência a todo o trabalho.

Série

Se o documento fizer parte de uma série, deve se adicionar o título da série e o número do volume no final da entrada.

Parte 3: exemplos (impresso) Artigo de revista

Autor (es). Ano. Título do artigo. Nome da revista. Volume (edição): páginas.

Holmberg S, Osterholm M, Sanger K, Cohen M. 1987. Drug-resistant Salmonella

from animals fed antimicrobials. *New England Journal of Medicine*. 311 (2): 617-622.

(Advances in molecular and cellular microbiology; vol.22).

Livro

Autor (es). Ano. Título do livro. Edição. Lugar de publicação: Editora.

Carson R. 1962. *Silent spring*. Boston (MA): Houghton Mifflin.

Capítulo em um livro

Autor (es). Ano. Título do capítulo. In: Título de livro. Edição. Local de publicação: Editora. pags. Páginas do capítulo.

Carson R. 1962. *Earth's green mantle*. In: *Silent spring*. Boston (MA): Houghton Mifflin. p. 63-83.

Livro editado

Nome (s) do editor, editores. Ano. Título do livro. Edição. Local de publicação: Editora.

Springate-Baginski O, Blaikie P, editores. 2007. *Forests, people and power: the political ecology of reform in South Asia*. London (GB): Earthscan.

Capítulo ou artigo em um livro editado

Autor (es). da parte. Ano. Título do capítulo. In: Nome (s) do editor, editores. Título do livro. Edição. Local de publicação: Editorial. pags. Páginas do capítulo.

Banerjee A. 2007. *Joint forest management in West Bengal*. In: Springate-Baginski O, Blaikie P, editors. *Forests, people and power: the political ecology of reform in South Asia*. London (GB): Earthscan. p. 221-260.

Artigo em um dicionário ou enciclopédia.

Cite como faria com um artigo em um livro editado; Se o autor da parte não for especificado, o editor assume o lugar do autor.

Livro de série

Autor (es). Ano. Título do livro. Edição. Local de publicação: Editorial. (Título da série; vol. #)

Tegos G, Mylonakis E, editors. 2012. *Antimicrobial drug discovery: emerging strategies*. Wallingford, Oxfordshire (GB): CABI.

Tese ou Dissertação

Autor (es). Ano. Título [designador de conteúdo]. [Local de publicação]: Editor (frequentemente uma universidade).

Bernier MH. 2009. *Assessing on-farm water use efficiency in southern Ontario* [tesis]. [Montreal (QC)]: McGill University.

Documentos de conferência ou atas

Autor (es). Ano. Título do trabalho. Em: nome (s) do (s) editor (es), editores. Título do volume. Número e nome da conferência; data da conferência; Local da conferência. Local de publicação: Editorial. p. Páginas.

Clarke A, Crame JA. 2003. *Importance of historical processes in global patterns of diversity*. En: Blackburn TM, Gaston KJ, editors. *Macroecology: concepts and consequences*. Proceedings of the 43rd annual symposium of the British Ecological Society; 2002 Apr 17-19; Birmingham. Malden (MA): Blackwell. p. 130-152.

Parte 4: exemplos (eletrônico)

A proliferação de informações eletrônicas introduziu novos desafios, como os documentos que podem existir em vários formatos diferentes. Fontes eletrônicas são citadas da mesma forma que suas homólogas impressas, com alguns elementos específicos da Internet agregados: um designador médio (ver descrição anterior), a data do documento foi modificada ou atualizada pela última vez (se está disponível), a data citada e a URL do documento ou o DOI (identificador de objeto digital).

As opiniões divergem sobre a melhor maneira de citar artigos de periódicos eletrônicos. Geralmente, um artigo eletrônico baseado em uma fonte impressa, em formato PDF, é considerada inalterável e citado como um artigo impresso.

Artigo eletrônico em formato PDF.

Artigos em formato pdf, baseados em uma fonte impressa, podem ser citados como artigos de revista impressa (exemplo na Parte 3).

Artigo eletrônico em formato HTML ou texto.

Autor (es) Ano. Título do artigo. Nome da revista [designador médio]. [data atualizada; Data da citação]; Volume (edição): páginas (se estiverem disponíveis). Disponível em: URL ou DOI

Woolf D, Amonette JE, Street-Perrott FA, Lehmann J, Joseph S. 2010. Sustainable biochar to mitigate global climate change. Nature Communications [Internet]. [citado el 18 de agosto de 2010]; 1(Art. 56). Disponível em: <http://www.nature.com/ncomms/journal/v1/n5/full/ncomms1053.html>

Livro eletrônico

Autor (es) ou Editor (es). Ano. Título do livro [designador médio]. Edição. Local de publicação:

editorial; [data atualizada; data da citação]. Disponível em: URL

Watson RR, Preedy VR, editors. 2010. Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables [Internet]. Amsterdam: Academic Press; [citado el 22 de abril de 2010]. Disponível em: www.sciencedirect.com/science/book/9780123746283

Artigo em um dicionário eletrônico ou enciclopédia.

Cite como faria com um artigo de livro Eletrônico

Allaby M, editor. 2006. photosynthesis. In: Dictionary of Plant Sciences [Internet]. Rev. ed. Oxford: Oxford University Press; [citado em 31 de agosto de 2010]. Disponível em: www.oxfordreference.com/entries/ENTRY.html?subview=Main&entry=t7.e5147

Site web

Título do site [designador médio]. Data de publicação. Local de publicação: Editorial; [data atualizada; Data da citação]. Disponível em: URL

Electronic Factbook [Internet]. 2007. Montreal (QC): McGill University; [atualizado al 30 de março de 2007; citado em 11 de janeiro de 2013]. Disponível em: <http://www.is.mcgill.ca/upo/factbook/index-upo.htm>

Documento online

Autor (es). Data de publicação. Título [designador médio]. Edição. Local de publicação: Editorial; [data atualizada; Data da citação]. Disponível em: URL

Kruse JS. 2007. Framework for sustainable soil management: literature review and synthesis [Internet]. Ankeny (IA): Soil and Water Conservation Society; [citado em 3 de agosto de 2008]. Disponível em: <http://www.swcs.org/documents/filelibrary/BeyondLiteraturereview.pdf>