

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 30
N° 1
Abril 2022

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 Editorial 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.*

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

Laura C. Lanari, *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 Científico

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 Rio 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 Sêvcik, *Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela.*

Fransisco 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)

Caso Clínico

Botulismo del lactante grave por toxina tipo A y uso de antitoxina equina AB luego de 5 días de evolución, reporte de caso y revisión bibliográfica.

Robla Vilá, Nuria Magalí*; Popity, Agostina; Dozoretz, Daniel; Aguirre Celiz, Adriana Iris.5

Artículos Originales

Oxidative stress and changes in hematological and biochemical biomarkers in *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom-induced acute kidney injury in rats.

Yoshida, Edson Hideaki¹; Dini, Murilo Melo Juste¹; Fontana-Oliveira, Isadora Caruso¹; Matiello-Filho, José Antonio¹; Cogo, José Carlos²; da Cruz-Höfling, Maria Alice⁴; Grotto, Denise^{1,3}; Hyslop, Stephen⁵; Hanai-Yoshida, Valquíria Miwa³; Oshima-Franco, Yoko^{1*} 14

Relationship between the toxicity of raw *Annona muricata* leaves extract and 7,12-dimethylbenzathracene (DMBA) with histopathological changes in *wistar* rats.

Splendor, Maria Clara¹; Souza-Kaneshima, Alice Maria de²; Becker, Tania Cristina Alexandrino^{2,5}; Mello, João Carlos Palazzo de^{1,3}; Souza, Paola da Costa⁴; Pedroso, Raissa Bocchi⁵; Pelegrini, Brenda Barroso⁵; Kaneshima, Edilson Nobuyoshi^{1,4} 32

Artículo Especial

Horacio Quiroga y su relación con los venenos

Zopatti, Damian¹; Bourbotte, Juan¹; Tejerina, Sergio¹; Cáceres, Cecilia¹; Werner, Antonio²; Arcidiacono, G.²; Scarlato, Eduardo², * 40

Recensión

Toxicología Clínica / Fundamentos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de las intoxicaciones

Prof. Mgtr. Aldo Sergio Saracco 49

Instrucciones para los autores 50

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

CASO CLÍNICO

Botulismo del lactante grave por toxina tipo A y uso de antitoxina equina AB luego de 5 días de evolución, reporte de caso y revisión bibliográfica Severe infant botulism due to type A toxin and use of equine AB antitoxin AB after 5 days of evolution, a case report and literature review

Robla Vilá, Nuria Magalí*; Popity, Agostina; Dozoretz, Daniel; Aguirre Celiz, Adriana Iris.

Servicio de toxicología, Hospital Interzonal Especializado en Pediatría "Superiora Sor María Ludovica" de La Plata.
*roblanuria@hotmail.com

Recibido: 13 de enero de 2022.

Aceptado: 21 de abril de 2022.

EDITOR DEL MANUSCRITO: ALDO SERGIO SARACCO.

Resumen. El botulismo del lactante (BL) es una enfermedad neurológica potencialmente grave que afecta a niños menores de un año, ocasionada por la ingesta y germinación de esporas de la bacteria del género *Clostridium* en tubo digestivo y la producción in situ de toxina botulínica (TB). Ésta se absorbe de manera intermitente y puede ser sostenida en el tiempo, condicionando una mayor exposición a la TB respecto a otras formas de botulismo. La TB representa el agente más letal conocido para el ser humano, con capacidad de producir parálisis flácida descendente, insuficiencia respiratoria y la muerte. Los lactantes representan la población más susceptible a esta toxiinfección. El eje central del manejo del BL radica en el diagnóstico precoz y tratamiento de sostén adecuado y oportuno. Si bien en la bibliografía consultada se describe que el tratamiento específico con antitoxina botulínica humana (BabyBIG®) reduce el tiempo de hospitalización y estadía en Unidad de Cuidados Intensivos, la misma no se encuentra disponible en muchos países, incluida la Argentina. En nuestro país se encuentra disponible la antitoxina botulínica de origen equino (AtBE) bivalente A-B. La misma no posee indicación formal para el tratamiento del BL por la escasa experiencia en esta población, su corta vida media y los efectos adversos descritos, como son la sensibilización a antígenos equinos de por vida y posibles reacciones anafilácticas más graves en lactantes, basados en trabajos de la década de 1980 y opiniones de expertos. Se presenta el caso de una paciente de 5 meses asistida en el Hospital de Niños "Superiora Sor María Ludovica" con BL severo, con requerimientos de asistencia ventilatoria mecánica y deterioro clínico durante la internación. Recibió AtBE a los 48 días de enfermedad, con respuesta favorable, a partir de una búsqueda bibliográfica sobre la eficacia y el perfil de seguridad de la AtBE en BL grave y la eficacia de su administración luego de 5 días de inicio del cuadro. A pesar de no haberse hallado bibliografía que avale la eficacia de la AtBE pasados 5 días de evolución, se plantea su uso en pacientes con BL grave e indicadores compatibles con presencia de TB en circulación, como la intensificación de la hipotonía muscular o la identificación de TB en materia fecal o suero. La búsqueda realizada arrojó datos sobre posibles beneficios de su uso, tanto antes como después de los 5 días de evolución del cuadro, y la ausencia de reportes de reacciones adversas severas en lactantes. Se concluye que el uso de la AtBE podría ser una opción terapéutica frente a la ausencia de BabyBIG® en pacientes con BL grave confirmado que requieran cuidados intensivos con soporte ventilatorio mecánico, frente a indicadores compatibles con TB circulante, independientemente del tiempo de evolución.

Palabras claves: Botulismo del Lactante; Toxina Botulínica; Antitoxina Botulínica Humana; Antitoxina Botulínica Equina.

Abstract. Infant botulism (BL) is a potentially serious neurolgic disease that affects children under one year old, caused by the ingestion and germination of spores of the *Clostridium* genus bacterium in the digestive tract and the in situ production of botulinum toxin (TB), which is absorbed intermittently and can be sustained over time, with longer exposure time to TB than other botulism forms. The TB represents the most lethal toxin known to humans and can cause descending flaccid paralysis, respiratory failure and death. Infants represent an especially susceptible population. Early diagnosis and supportive care are the cornerstone of BL management. Although specific treatment with human botulinum antitoxin (BabyBIG®) has shown to reduce the hospitalization time and Intensive Care Unit stay in the consulted bibliography, it is not currently available in many countries, including Argentina. Botulinum antitoxin of equine origin (AtBE) bivalent A-B is available in our country. This antitoxin has not a formal indication in BL due to the limited experience of its use in this population, its short half-life and the adverse effects described, such as lifelong sensitization to equine antigens and possible more severe anaphylactic reactions in infants, based on studies from the 1980s and expert opinions. We present the case of a 5 month old patient assisted at the Children's Hospital "Superiora Sor María Ludovica" with severe BL, in need of mechanical ventilatory assistance and worsening of her clinical state during hospitalization, who received ATBE at 48 days of illness with a favorable response. A bibliographic search was carried out on the efficacy and safety profile of AtBE in severe BL and the efficacy of its administration after 5 days of illness onset. Even though bibliography on efficacy of ATBE after 5 days of evolution was not found, its use is proposed in patients with compatible indicators of circulating TB, such as worsening of muscular hypotonia or TB presence in feces or serum in severe ill patients. The carried out search has shown data of the possible benefits of its use, both before and after 5 days of disease onset, and the absence of severe adverse reaction reports in infants. We concluded that the use of AtBE could be a therapeutic option in absence of BabyBIG® in patients with confirmed severe BL who require intensive care with mechanical ventilatory support and compatible indicators with circulating TB, regardless of the evolution time.

Key words: Infant Botulism; Botulinum toxin; Human Botulinum Antitoxin; Equine Botulinum Antitoxin.

Introducción

El botulismo del lactante (BL) es una entidad potencialmente grave que afecta a niños menores de un año (Ministerio de Salud 2012) ocasionada por la ingesta de esporas de la bacteria del género *Clostridium* y producción in situ de toxina botulínica (TB). Se caracteriza por un cuadro de parálisis flácida aguda descendente, de instalación progresiva y severidad variable. Afecta principalmente a niños entre las 2 y 24 semanas de vida (Ministerio de Salud 2012). La principal causa de muerte es la insuficiencia respiratoria, con requerimiento en casos graves de asistencia ventilatoria mecánica (AVM).

Nuestro país ocupa el segundo lugar con mayor incidencia de BL luego de Estados Unidos (Jong y Fernández 2012), siendo ésta además la presentación clínica más frecuente de botulismo en Argentina (Jong y Fernández 2012, Ministerio de Salud 2012).

La primera identificación de toxiinfección por botulismo en lactantes humanos a partir de la ingesta de esporas fue comunicada en Estados Unidos (EEUU) por Arnon *et al.* en 1977. En Argentina los primeros casos confirmados datan del año 1982 (Lentini *et al.* 1986), constituyendo desde 1999 un evento de notificación obligatoria inmediata por medio del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SNVE) (Ministerio de Salud 2012).

Si bien el manejo de esta entidad se basa principalmente en el tratamiento de sostén, cuenta con tratamiento específico que consiste en la administración temprana, dentro de los 5 días desde inicio de los síntomas, de antitoxina botulínica (AtB). La misma se encuentra disponible en dos formas: derivada de suero humano o BabyBIG® y derivada de suero equino, en Argentina en forma bivalente A-B. Ésta última es utilizada para botulismo por heridas o alimentario sin indicación formal para BL, principalmente por posibles reacciones de hipersensibilidad.

El objetivo del presente trabajo es exponer un caso clínico de BL grave con aislamiento de TB tipo A, tratado con antitoxina botulínica bivalente equina A-B (AtBE), más allá de los 5 días de evolución y presentar una revisión bibliográfica sobre las indicaciones de AtBE en BL y su perfil de seguridad.

Caso clínico

Paciente femenina de 5 meses que es derivada al Hospital Interzonal de Agudos Especializado

en Pediatría “Superiora Sor María Ludovica” de La Plata desde un hospital de menor complejidad del partido de Merlo, provincia de Buenos Aires, en su décimo día de internación. Ingresó con diagnóstico de encefalopatía en estudio en contexto de shock séptico sin aislamiento bacteriológico, con hipotonía generalizada asociada a estatus epiléptico y AVM. Precede a su hospitalización un cuadro de decaimiento, succión débil y rechazo parcial del alimento de 48 horas de evolución. Al momento de la recepción en nuestra institución, por antecedentes, evolución y cuadro clínico, se sospecha BL. No surge de la anamnesis antecedente de ingesta de miel o medicina folclórica, pero se destaca que habita en una vivienda en construcción, sobre calle de tierra y haber estado días previos en una zona rural. A partir de esto se mantienen las medidas de cuidados críticos y se solicita identificación de TB en muestras de suero y materia fecal al centro de referencia ANLIS “Dr. Carlos Malbrán”, con confirmación de TB tipo A en materia fecal. Por cuadro de constipación de aproximadamente 12 días de evolución, se inicia tratamiento con enemas evacuantes. La paciente presenta catarsis positiva y mejoría clínica progresiva. A los 27 días de evolución se observa deterioro clínico, intensificándose la hipotonía muscular generalizada, persistiendo con requerimientos de AVM. Se replantea el tratamiento instaurado, identificándose en nuevas muestras de materia fecal y sangre la presencia de TB tipo A. Se decide, luego de una revisión bibliográfica, utilizar antitoxina botulínica A-B producida en el Instituto Biológico “Dr. Tomás Perón”, inmunoglobulina G purificada de origen equino, en el día 48 desde el inicio del cuadro. El procedimiento es bien tolerado por la paciente, sin presentar efectos adversos y con respuesta favorable. Se otorga el egreso hospitalario con traqueostomía y sonda nasogástrica para manejo de líquidos a los 166 días de iniciado el cuadro, con seguimiento por servicios de toxicología, neurología, fonoaudiología y gastroenterología, sin complicaciones a 1 año de su seguimiento.

Discusión

Según datos extraídos del Boletín Integrado de Vigilancia del período comprendido entre 2012 y 2021, en Argentina se registraron un total de 669 casos notificados (incluyendo casos sospechosos, probables, confirmados y descartados) y 396 casos confirmados de BL. Las provincias con mayor prevalencia de casos con-

firmados en orden decreciente fueron: Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C.A.B.A.), Mendoza, Córdoba, Río Negro y San Luis (Tabla 1). En el mismo período, las regiones geográficas con mayor frecuencia de casos confirmados fueron: Centro, Cuyo y Patagonia (Tabla 2) (Ministerio de Salud de la República Argentina 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020 y 2021). En la Tabla 3 se expone la cantidad de habitantes por provincia según el último el Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas (CNPHyV), realizado en el año 2010 (INDEC 2010). Se observa predominio franco de la provincia de Buenos Aires, que con la población del conurbano bonaerense y del interior

de la provincia posee el 39,8% del total de la población del país, seguido por las provincias de Córdoba con 8,25%, Santa Fe con 7,96%, C.A.B.A. con 7,2% y Mendoza con 4,33% (Tabla 3). Basado en lo expuesto en las Tablas 1 y 3 se observa que las provincias de la región Centro, que poseen predominio de clima templado subhúmedo-húmedo, suman la mayor cantidad de casos, pero también concentran la mayor cantidad de habitantes con el 65,4% del total. En segundo lugar se encuentra la región de Nuevo Cuyo, con clima árido-semiárido, ventoso y escasas precipitaciones, que representa solo el 7,94% de la población total (INDEC 2010).

Tabla 1. Prevalencia de Botulismo del Lactante por Provincia. Período enero 2012 a diciembre 2021. CB: Conurbano Bonaerense, IP: Interior de la Provincia. (Ministerio de Salud de la República Argentina 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021)

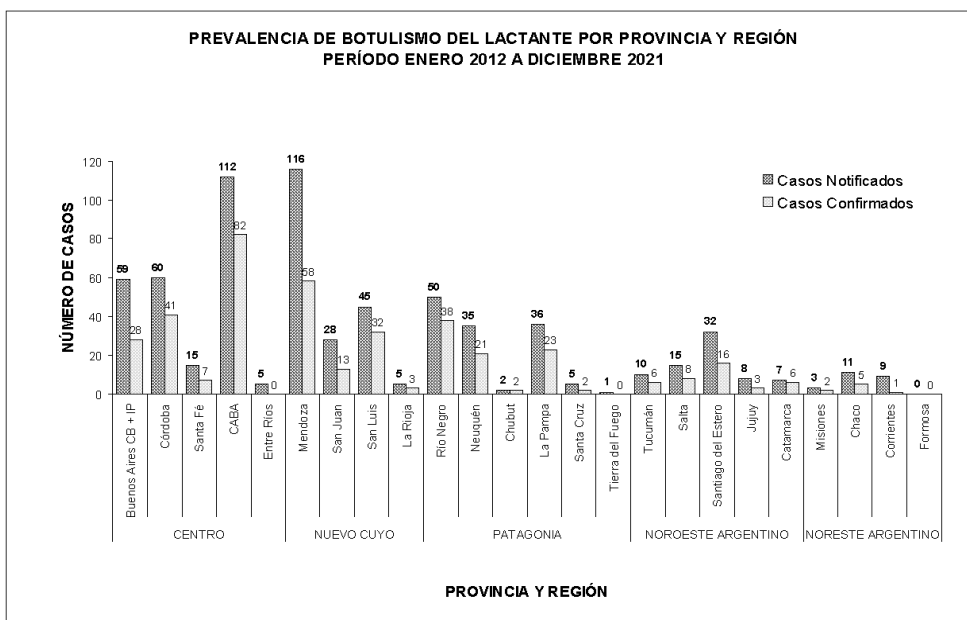


Tabla 2. Prevalencia de Botulismo del Lactante por Región Geográfica. Período enero 2012 a diciembre 2021. (Ministerio de salud de la República Argentina 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021)

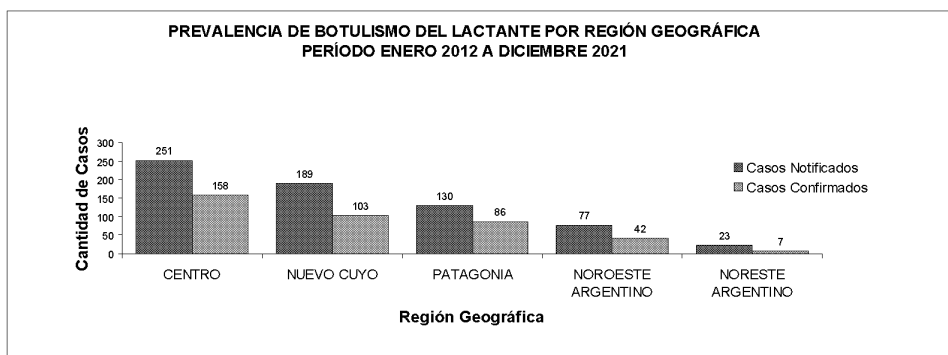
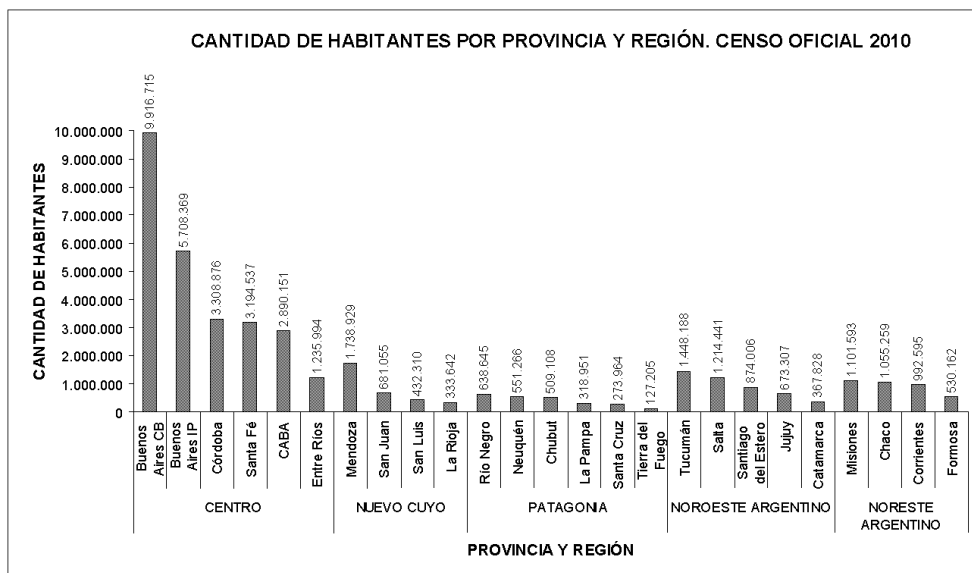


Tabla 3. Cantidad de habitantes por provincia y región, Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas. 2010. CB: Conurbano Bonaerense, IP: Interior de la Provincia. (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de la República Argentina, 2010)



El agente involucrado en BL es *Clostridium botulinum*, un bacilo anaerobio gram positivo de distribución ubicua que se encuentra en los suelos, capaz de formar esporas. Estas estructuras resguardan el material genético, confiriéndole la capacidad de resistir a condiciones ambientales adversas. Las mismas se hallan en el polvo ambiental pudiendo contaminar agua, alimentos y fómites (Ministerio de Salud 2012). Se considera que el ingreso del agente al organismo es por la vía oral, tanto por ingesta de alimentos como por la deglución de secreciones respiratorias contaminadas. Dentro de los alimentos involucrados con más frecuencia se destacan la miel, el jarabe de maíz y las hierbas medicinales, razón por la cual se desaconseja su administración a niños menores de un año (Martín de Santos *et al.* 2011). Se postula que los lactantes son especialmente susceptibles, por su pH gástrico mayor y la inmadurez tanto de su flora intestinal como de su sistema inmune (Ministerio de Salud 2012; Nelson *et al.* 2019). Existe controversia respecto al efecto protector de la lactancia materna (LM). En pacientes con LM se describe mayor prevalencia de BL, pero con mayor edad al momento de la presentación, mientras que en pacientes alimentados con leche de fórmula se observa mayor prevalencia de cuadros graves (Ministerio de Salud 2012; Peruffo *et al.* 2014; Rosow y Strober 2015; Nel-

son *et al.* 2019). Debido a esto en 2015 Rosow y Strober sugirieron mantener la LM, aún en los pacientes que hayan presentado botulismo del lactante. En cuanto a condiciones geográficas, presentan mayor riesgo aquellos niños que habitan en zonas rurales, regiones áridas, ventosas, con bajas precipitaciones, baja humedad ambiental (Ministerio de Salud 2012) y cerca de sitios en construcción, por presencia de polvo aerolizado (Nelson *et al.* 2019). Una vez dentro del intestino del lactante la espóra encuentra condiciones favorables para su germinación y producción de TB, la cual, luego de alcanzar la circulación general, tiene tropismo específico por las terminales nerviosas colinérgicas periféricas. Compuesta por dos cadenas peptídicas, la TB ingresa a las células por unión a receptores específicos por medio de su cadena pesada. Luego, por medio de la liberación de su cadena liviana, generará destrucción y pérdida de función del complejo de proteínas de membrana presináptica denominadas SNARE (proteínas de fusión entre membranas, sensible a la N-etilmaleimida) involucradas en la exocitosis de acetilcolina (ACh), conduciendo al déficit del neurotransmisor en biofase (Arnon *et al.* 2001; Nelson *et al.* 2019). Este complejo incluye a las proteínas Sinaptobrevina, SNAP25 (sinaptosoma asociado a proteína de 25 kDa) y Sintaxina. La unión al sitio diana es irreversible.

Se describen ocho serotipos de toxinas, nombradas de la A a la H, que son producidas en diferente medida por distintas especies del género *Clostridium*, siendo *Clostridium botulinum* capaz de producir los ocho serotipos. Diferentes serotipos de TB escinden diferentes proteínas de la familia SNARE, lo que probablemente explique su espectro diverso de toxicidad (Nelson *et al.* 2019). Las TB tipo B, D, F y G escinden la Sinaptobrevina, los tipos A, C y E la SNAP-25 y la tipo C la Sintaxina (Cortés Monroy *et al.* 2014). Los serotipos más frecuentemente asociados al BL en Argentina son el A y B (Jong y Fernández 2012), dato fundamental al momento de utilizar sueros antitoxina botulínica específicos.

Este proceso resulta en una parálisis muscular flácida, progresiva, simétrica y descendente, precedida frecuentemente por constipación, afectación de pares craneales y musculatura proximal. En el BL se evidencia llanto débil, ptosis palpebral bilateral, pérdida de expresión facial, pérdida del sostén cefálico, midriasis y dificultad para deglutir y alimentarse. Se pueden observar signos de disfunción autonómica como anhidrosis, xerostomía, enrojecimiento facial, retención urinaria, hipertensión o hipotensión arterial y arritmias cardíacas. Lo característico de esta patología es la hipotonía generalizada con hiporreflexia o arreflexia osteotendinosa, por lo que puede observarse la "postura de rana" en miembros inferiores. Se presenta con diferentes niveles de gravedad, pudiendo sobrevenir la muerte secundaria a la parálisis de músculos respiratorios con insuficiencia respiratoria en una primera etapa, o por complicaciones inherentes a los cuidados intensivos prolongados en una segunda etapa (Griese *et al.* 2017). Se postula una relación entre las presentaciones fulminantes de BL y el Síndrome de Muerte Súbita del Lactante (Nelson *et al.* 2019).

Dentro de los principales diagnósticos diferenciales del BL se plantea: sepsis, deshidratación con alteraciones hidroelectrolíticas, Guillain-Barré variante Miller-Fisher y meningoencefalitis (Ministerio de Salud 2012). Debido a su baja incidencia es necesario un alto grado de sospecha clínica. Se propone como tríada patognomónica: constipación, hipotonía y abolición del reflejo fotomotor (Ministerio de Salud 2012).

El diagnóstico se basa en el cuadro clínico, antecedentes epidemiológicos y aislamiento de TB en suero o materia fecal. En el BL es

más frecuente el aislamiento de TB en materia fecal, con bajo rescate en sangre. La prueba diagnóstica "gold estándar" es el método de bioensayo por inoculación intraperitoneal en ratón albino (Nelson *et al.* 2019). La misma consiste en la inoculación de suero o cultivo de materia fecal del paciente, en peritoneo de ratón y su observación durante el término de 24 a 48 horas. De ser positivo, se procede a la exposición de las mismas muestras a ratones de iguales características, previamente expuestos a antitoxina botulínica específica, con el fin de identificar el serotipo de TB. Se trata de una prueba con alta sensibilidad, pero costosa, laboriosa y que no permite un diagnóstico rápido.

Respecto al tratamiento, la terapia de soporte es primordial, debiendo jerarquizar el acceso precoz a los cuidados intensivos, sobre todo cuando el paciente presenta compromiso de la mecánica ventilatoria. La mejoría en la calidad de la misma a lo largo de los años, se ha relacionado con mayor sobrevida de estos pacientes. Un cuidadoso monitoreo del estado respiratorio, utilizando parámetros como oximetría de pulso, presión de CO₂ y presencia o ausencia de reflejo de protección de vía aérea o reflejo nauseoso, es esencial para determinar la necesidad de intubación orotraqueal. Se ha descrito que la posición de Trendelenburg invertida a 20-25° con soporte cervical podría ser beneficiosa, ya que disminuye el riesgo de aspiración mientras reduce la presión que generan las vísceras abdominales sobre el diafragma, reduciendo el esfuerzo ventilatorio. Sin embargo, su aplicación clínica en pacientes con compromiso de la función respiratoria no ha sido validado (Nelson *et al.* 2019). La kinesioterapia respiratoria y la rehabilitación física son fundamentales.

En cuanto a la alimentación, se recomienda instalar precozmente una sonda nasogástrica o nasoyeyunal y aportar leche materna como fuente nutricional de elección. No se recomienda de rutina el uso de alimentación parenteral, ya que aumentaría los riesgos de infecciones secundarias (Ministerio de Salud 2012).

La constipación suele ser un problema frecuente. Se describe el uso inicial de enemas evacuantes, para disminuir la carga de esporas y obtener las muestras para diagnóstico, pudiendo luego continuar con ablandadores de heces y aumento del aporte de líquidos. Se reporta el uso de catárticos y enemas para eliminar la toxina del tracto gastrointestinal

(Ministerio de Salud 2012; O'Horo *et al.* 2018), aunque se debate la utilidad de las enemas (Puig de Centorbi y Calleri de Milán 1984) y se recomienda evitar el uso de laxantes diferentes a los ablandadores de heces (Ministerio de Salud 2012). Es de suma importancia el manejo cuidadoso de las excretas, ya que estos pacientes pueden eliminar esporas y toxinas en las heces hasta 4 meses después de iniciados los síntomas (Ministerio de Salud 2012).

No se recomienda el uso de antibióticos de forma rutinaria, debiendo ser considerados sólo en caso de infecciones sobreagregadas. Se recomienda la profilaxis para trombosis venosa profunda y el monitoreo continuo de la función cardíaca, debido a la posibilidad de disfunción autonómica (Nelson *et al.* 2019).

El tratamiento específico del BL es la administración temprana de AtB, ya que la misma neutraliza la TB libre en plasma previo a su internalización. A las medidas de sostén junto con el uso de la AtB se les atribuye, según estadísticas de EEUU, la reducción de la mortalidad de más del 60% a principios del siglo XX, a menos del 5% en la actualidad (O'Horo *et al.* 2018).

En el año 2003 la FDA aprobó en EEUU la AtB humana BabyBIG[®], que demostró en un ensayo clínico randomizado una reducción significativa en la duración de AVM y de nutrición parenteral o enteral, de la estadía hospitalaria, del tiempo de requerimientos de cuidados intensivos y del costo de hospitalización frente a placebo, sin causar efectos adversos (EA) serios (Nelson *et al.* 2019), con una vida media de 28 días (Ministerio de Salud 2012; Rosow y Strober 2015). Si bien se trata de una medida terapéutica efectiva, resulta de alto costo (Jang *et al.* 2020) y al momento de la elaboración de este trabajo no se encuentra disponible en muchos países, incluida la Argentina. Respecto a la AtBE, existe experiencia limitada en su utilización para BL (Ministerio de Salud 2012). Es utilizada ampliamente en pacientes adultos, pero no cuenta con indicación formal para el BL. La contraindicación de muchos autores en este sentido, se basa en la aparición de EA en series de pacientes adultos con botulismo alimentario expuestos a AtBE (Black y Gunn 1980; Tacket *et al.* 1984), la sensibilización potencial de por vida a las proteínas equinas (Arnon *et al.* 2006; Rosow y Strober 2015) y la posibilidad descrita en trabajos antiguos, de que las reacciones anafilácticas frente a los productos derivados de suero equino resulten

más graves en los lactantes (CDC 1998; Vanella de Cuetos *et al.* 2011). Por otro lado, su corto tiempo de vida media entrvida media, entre 5 y 7 días, se ha considerado inadecuado para un cuadro causado por la generación in situ de TB con absorción intestinal intermitente y sostenida en el tiempo (Hatheway *et al.* 1984; Fox *et al.* 2005; Ministerio de Salud 2012). Sin embargo, actualmente es la única opción disponible en Argentina, en forma bivalente A-B. Su eficacia para el tratamiento de BL no ha sido evaluada en ensayos clínicos controlados (Vanella de Cuetos *et al.* 2011). Todos los trabajos hallados evalúan la eficacia dentro de los primeros 5 días y no identificaron EA severos en lactantes. En 2011, Vanella de Cuetos *et al.* publicaron un estudio analítico observacional retrospectivo de pacientes con BL asistidos entre 1993 y 2007 en la provincia de Mendoza, Argentina. Se incluyeron 31 pacientes con BL grave confirmado, con menos de 5 días de evolución, tratados con AtBE vs 18 pacientes tratados con medidas de sostén. Los autores concluyen que el uso de AtBE resulta beneficioso con resultados estadísticamente significativos. Como EA, se describieron reacciones de hipersensibilidad leve, como rash cutáneo, que también se han reportado con el uso de BabyBIG[®] (Vanella de Cuetos *et al.* 2011). No hemos hallado reportes de EA graves en la bibliografía revisada.

Algunos autores recomiendan considerar el uso de AtBE como opción terapéutica en pacientes con BL confirmado que requieran cuidados intensivos con soporte ventilatorio mecánico (Arnon *et al.* 1977; Vanella de Cuetos *et al.* 2011; Ministerio de Salud 2012). Su uso podría plantearse de utilidad aún cuando la TB no sea detectada en el suero del paciente, ya que la misma puede ser absorbida desde el tracto intestinal en forma intermitente o bien encontrarse en cantidades no detectables por las pruebas diagnósticas disponibles (Ministerio de Salud 2012). Si bien no se han hallado trabajos que evalúen la eficacia de AtBE pasados los 5 días, la neutralización de cualquier toxina circulante debería ser beneficiosa (Rao *et al.* 2021). La evidencia revisada no indica un punto en el curso de la enfermedad más allá del cual, la administración de AtBE no proporcione algún beneficio. (Rao *et al.* 2021). En contexto de pacientes con diagnóstico de botulismo sin tratamiento específico, la parálisis que progresa indicaría la presencia de TB circulante, por lo que dichos pacientes podrían

beneficiarse al recibir AtB para proteger los músculos no afectados, independientemente de la cantidad de días de evolución del cuadro (Rao *et al.* 2021). Sin embargo, la AtB no revierte la parálisis ya instalada y la recuperación de la misma lleva semanas a meses, incluso después de la administración de la misma (Rao *et al.* 2021).

Respecto a las pruebas intradérmicas con AtBE previo a su administración, indicada rutinariamente a lo largo de los años, ya no se recomiendan. Esto es debido a que para su correcta realización se requiere capacitación especializada, mucho tiempo para realizar el procedimiento, presenta baja sensibilidad y especificidad y no proporciona una base fiable para predecir qué pacientes corren mayor riesgo de padecer enfermedad del suero o reacción anafiláctica (Black y Gunn 1980; Rao *et al.* 2021).

Conclusión

Coincidiendo con el trabajo de Vanella de Cuetos *et al.* (2011) nuestra paciente presentó evolución favorable luego de la administración de AtBE, con buena respuesta y sin presentar EA, aun habiendo sido administrada posterior a los 5 días de iniciado el cuadro.

Se remarca la importancia del tratamiento de sostén en BL grave con abordaje precoz y cuidados intensivos efectivos, junto a AVM de ser requerida. El uso de AtB, si bien no es fundamental, se ha asociado a la reducción del tiempo de permanencia hospitalaria y AVM, disminuyendo significativamente la probabilidad de complicaciones secundarias a éstos.

En base a la bibliografía evaluada concluimos que la AtBE debe ser considerada como tratamiento específico alternativo para el BL grave cuando la BabyBIG® no está disponible. Si bien no hemos encontrado indicación formal del uso de AtBE en lactantes más allá de los 5 días, tampoco hemos hallado evidencia de EA significativos que lo contraindiquen, pudiendo resultar beneficioso el uso de la misma en casos de BL grave confirmado en los que se sospeche la presencia de TB circulante, independientemente del tiempo de evolución.

Para finalizar, se remarca la necesidad de contar con estudios clínicos controlados que demuestren la seguridad y eficacia de AtBE en BL más allá de los 5 días de inicio de los síntomas.

Bibliografía

Arnon SS, Midura TF, Clay SA, Wood RM, Chin

J. 1977. Infant botulism: epidemiological, clinical, and laboratory aspects. *Journal of the American Medical Association.* 237(18):1946-1951.

Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Barlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M, *et al.* 2001. Botulinum Toxin as a Biological Weapon. *Journal of the American Medical Association.* 285(8):1059-1070.

Arnon SS, Schechter R, Maslanka SE, Jewell NP, Hatheway CL. 2006. Human Botulism Immune Globulin for the Treatment of Infant Botulism. *N Engl J Med.* 354(5):462-471.

Black RE, Gunn RA. 1980. Hypersensitivity reactions associated with botulin antitoxin. *The American Journal of Medicine.* 69(4):567-570.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 1998. Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for Epidemiologists, Clinicians and Laboratory Workers. Atlanta (GA).

Cortés Monroy C, Soza S. 2014. Usos Prácticos De La Toxina Botulínica en Adultos en Medicina Física Y Rehabilitación. *Rev. Med. Clin. Condes.* 25(2):225-236.

Fox CK, Keet CA, Strober JB. 2005. Recent advances in infant botulism. *Pediatric Neurology.* 32(3):149-154.

Griese SE, Kisselburgh HM, Bartenfeld MT, Thomas E, Rao AK, Sobel J, Dziuban EJ. 2017. Pediatric botulism and use of equine botulinum antitoxin in children: a systematic review. *Clin Infect Dis.* 66(1):S17-29.

Hatheway CH, Snyder JD, Seals JE, Edell TA, Lewis GE Jr. 1984. Antitoxin levels in Botulism Patients Treated with Trivalent Equine Botulism Antitoxin to Toxin Types A, B, and E. *J Infect Dis.* 150(3):407-412.

INDEC (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de la República Argentina). 2010. Cuadros estadísticos. Censo 2010, Población por sexo e índice de masculinidad, superficie censada y densidad, según provincia. [Internet].

[Citado el 20 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.indec.gov.ar/indec/web/Nivel4-Tema-2-18-77>

Jang HG, Jang J, Jung HJ, Jung DE. 2020. The First Reported Case of Infant Botulism in Korea: Treatable Infantile Neuromuscular Disease. *Journal of Korean Medical Science*. 35(14):e93.

Jong L, Fernández R. 2012. Botulismo del lactante en Mendoza: transmisión y factores de riesgo. Publicado en la Plataforma de información para políticas públicas de la Universidad Nacional de Cuyo. [Internet]. [Citado el 15 de abril de 2021]. Disponible en: <http://www.politicaspUBLICAS.uncu.edu.ar/articulo/botulismo-del-lactante-en-mendoza-transmision-y-factores-de-riesgo#:~:text=En%20el%20mecanismo%20de%20transmisi%C3%B3n,de%20esporas%20para%20la%20transmisi%C3%B3n>.

Lentini E, Fernández RA, Arenas GN. 1986. Botulismo del lactante. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 8(6):351-354.

Martín de Santos MR, Herrera Marteache A, Lorente Toledano F, Martínez López A, Ortega Hernández-Agero T, Alonso Andicoberry C. 2011. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el botulismo infantil. *Revista del Comité Científico de la AESAN*. 14:9-26.

Ministerio de Salud. 2012. Guía de Prevención, Diagnóstico, Tratamiento y Vigilancia Epidemiológica del Botulismo del Lactante. 1°Ed. Buenos Aires, Argentina.

Ministerio de salud de la República Argentina. Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica número 203 – SE 03. 2014. [Citado el 15 de abril de 2022]. Disponible en: <https://bancos.salud.gov.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n203-se3-11022014>.

Ministerio de salud de la República Argentina. Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica número 244 – SE 04. 2015. [Citado el 15 de abril de 2022]. Disponible en: <https://bancos.salud.gov.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n244-se4-03022015>.

Ministerio de salud de la República Argentina. Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica número 296 – SE 05. 2016. [Citado el 15 de abril de 2022]. Disponible en: <https://bancos.salud.gov.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n296-se05-11022016>.

Ministerio de salud de la República Argentina. Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica número 345 – SE 04. 2017. [Citado el 15 de abril de 2022]. Disponible en: <https://bancos.salud.gov.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n345-se4-02022017>.

Ministerio de salud de la República Argentina. Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica número 397 – SE 05. 2018. [Citado el 15 de abril de 2022]. Disponible en: <https://bancos.salud.gov.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n397-se05-05022018>.

Ministerio de salud de la República Argentina. Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica número 439 – SE 06. 2019. [Citado el 15 de abril de 2022]. Disponible en: <https://bancos.salud.gov.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n439-se6-15022019>.

Ministerio de salud de la República Argentina. Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica número 481 – SE 02. 2020. [Citado el 15 de abril de 2022]. Disponible en: <https://bancos.salud.gov.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n485-se06-2020>.

Ministerio de salud de la República Argentina. Boletín Integrado de Vigilancia Epidemiológica número 582 – SE 52. 2021. [Citado el 15 de abril de 2022]. Disponible en: <https://bancos.salud.gov.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n582-se52-2021>.

Nelson L, Howland MA, Lewin N, Smith S, Goldfrank L, Hoffman R. 2019. 38: Botulism. En: McGraw Hill education. Goldfrank's Toxicologic Emergencies. 11th Edition. p. 574-585.

O'Horo JC, Harper EP, El Rafei A, Ali R, DeSimone DC, Sakusic A, Abu Saleh OM, Marcellin JR, Tan EM, Rao AK, *et al.* 2018. Efficacy of Antitoxin Therapy in Treating Patients with Foodborne Botulism: A Systematic Review and Meta-analysis of Cases, 1923–2016. *Clin Infect Dis*. 66(1):S43–S56.

Peruffo MV, Malvaso R, Maffía S, Azrak MA, Fernández Z. 2014. Botulismo del Lactante. Presentación de 3 casos y revisión bibliográfica. *Revista del Hospital de Niños de Buenos Aires*. 56(255):171-176.

Puig de Centorbi ON, Calleri de Milán MC. 1984. Botulismo del lactante. *Arch Arg Pediatr*. 82(3):221-223.

Rao AK, Sobel J, Chatham-Stephens K, Luquez C. 2021. Clinical Guidelines for Diagnosis and Treatment of Botulism. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations and Reports. 70(2):1-30.

Rosow LK, Strober JB. 2015. Infant botulism:

review and clinical update. *Pediatric neurology*. 52(5):487-492.

Tacket CO, Shandera WX, Mann JM, Hargrett NT, Blake PA. 1984. Equine antitoxin use and other factors that predict outcome in type A foodborne botulism. *The American Journal of Medicine*. 76(5):794-798.

Vanella de Cuetos E, Fernandez RA, Bianco MI, Sartori OJ, Piovano ML, Lúquez C, de Jong LI. 2011. Equine botulinum antitoxin for the treatment of infant botulism. *Clinical and vaccine immunology*. 18(11):1845-1849.

miológica del Botulismo del Lactante. 1°Ed. Buenos Aires, Argentina. salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-

ARTÍCULO ORIGINAL

Oxidative stress and changes in hematological and biochemical biomarkers in *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom-induced acute kidney injury in rats Estrés oxidativo y alteraciones en biomarcadores hematológicos y bioquímicos en lesión renal aguda inducida por el veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cascabel de America del Sur) en ratones

Yoshida, Edson Hideaki¹; Dini, Murilo Melo Juste¹; Fontana-Oliveira, Isadora Caruso¹; Matiello-Filho, José Antonio¹; Cogo, José Carlos²; da Cruz-Höfling, Maria Alice⁴; Grotto, Denise^{1,3}; Hyslop, Stephen⁵; Hanai-Yoshida, Valquíria Miwa³, Oshima-Franco, Yoko^{1*}

¹Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, University of Sorocaba (UNISO), Sorocaba, SP, Brazil. ²Bioengineering Program, Technological and Scientific Institute, Brazil University. ³Post-Graduate Program in Technological and Environmental Processes, University of Sorocaba (UNISO), Sorocaba, SP, Brazil. ⁴Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil. ⁵Section of Pharmacology, Department of Translational Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

*yoko.franco@prof.uniso.br

Received: April 1, 2021.

Accepted: April 30, 2022.

EDITOR: ADOLFO RAFAEL DE ROODT

Abstract. Acute kidney injury (AKI) is the major cause of mortality following bites by the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. We investigated the early onset of *Crotalus durissus terrificus* venom-induced AKI in rats within 2 h of venom injection and its attenuation by antivenom. Several biomarkers were used to monitor AKI in the absence or presence of antivenom. Male Wistar rats were divided into five groups (n=5 each): G1, rats injected with saline (control); G2, rats injected with venom (6 mg kg⁻¹, intraperitoneally) and euthanized after 2 h to evaluate AKI; G3 and G4, rats injected with 0.9% sterile saline or antivenom 2 h after venom, respectively, and monitored until death or up to 24 h post-venom, and G5, rats injected with antivenom alone and monitored for 24 h. Blood, urine and renal tissue samples were collected immediately after death to assess oxidative stress, hematological and biochemical alterations, and renal histological damage. Venom caused AKI within 2 h (G2) that persisted for up to 8.2 ± 1.6 h (G3), as confirmed by increases in blood urea, creatinine, and renal proteinuria; these increases were attenuated by antivenom. There were no changes in blood protein concentrations in G2 and G3, whereas there were increases in blood reduced glutathione, glutathione peroxidase, and plasma TBARS (but not in catalase) that were attenuated to varying extents by antivenom. There were no marked changes in platelets or leukocytes, but an increase in erythrocytes after 8.2 h with venom alone was attenuated by antivenom. Renal glomerular and tubular damage was greatest after 2 h post-venom groups alone was attenuated by antivenom. Renal glomerular and tubular damage was greatest after 2 h post-venom and declined thereafter. Venom caused early-onset AKI, with variable effects on lipid peroxidation and oxidative stress. Antivenom attenuated the AKI, as shown by the decrease in blood urea and the normalization of proteinuria, without protecting against lipid peroxidation.

Keywords: Acute kidney injury; Antivenom; Biomarkers; *Crotalus durissus terrificus*; Oxidative stress.

Resumen. La injuria o lesión renal aguda (LRA) es la mayor causa de mortalidad debido a las mordeduras por cascabeles *Crotalus durissus terrificus*. Se estudió la instalación precoz de LRA, en ratas, inducida por el veneno de *Crotalus durissus terrificus* después de 2 h de su inoculación y la atenuación por el antiveneno. Se utilizaron diversos biomarcadores para monitorear LRA en ausencia o presencia del antiveneno. Ratas Wistar machos fueron divididos en 5 grupos (n=5 por grupo): G1, ratas inoculadas con solución salina (control); G2, ratas inoculadas con veneno (6 mg kg⁻¹ dosis, vía intraperitoneal), y sacrificadas después de 2 h para evaluar LRA; G3 y G4, ratas inoculadas con 0.9% de solución salina esterilizada o antiveneno luego de 2 h después de inoculado el veneno, respectivamente, y monitoreadas hasta su muerte o hasta 24 h después de inoculado el veneno; y G5, ratas inoculadas con antiveneno solo y monitoreadas durante 24 h. Las muestras de sangre, orina, y tejido renal fueron colectadas inmediatamente después de la muerte de los animales para evaluar estrés oxidativo, alteraciones hematológicas y bioquímicas, y daño histológico renal. El veneno causó LRA dentro de las 2 h (G2) persistiendo durante más de 8,2 ± 1,6 h (G3), estando esto confirmado por el incremento de urea sanguínea, creatinina, y proteinuria renal; estos aumentos disminuyeron con la aplicación del antiveneno. No se

observaron alteraciones en las concentraciones de proteínas sanguíneas en G2 y G3, mientras que se encontraron incrementos en glutatión reducido sanguíneo, glutatión peroxidasa y TBARS plasmática (pero no en catalasa), que disminuyeron con la aplicación del antiveneno aunque en diferente grado. No ocurrieron alteraciones marcadas de plaquetas o leucocitos, mientras que el aumento de glóbulos rojos observado luego de 8,2 h de la inoculación con veneno, disminuyó con el antiveneno. El daño renal glomerular y tubular fue más importante luego de 2 h de la inoculación con veneno y posteriormente disminuyó. El veneno causó LRA precoz a las 2 h, con efectos variables sobre la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo. El antiveneno redujo el daño renal, conforme lo demostrado por la disminución en la urea sanguínea y por la normalización de la proteinuria, aunque no se observó protección contra la peroxidación lipídica.

Palabras clave: Antiveneno; Biomarcadores; *Crotalus durissus terrificus*; Estrés oxidativo; Lesión renal aguda.

Background

Nephrotoxicity is an important clinical complication of snakebite by crotalid and viperid snakes (Warrell 2004; Sitprija 2006; Albuquerque *et al.* 2013, Gutiérrez *et al.* 2017; Albuquerque *et al.* 2020) and is frequently characterized by a combination of acute tubular necrosis, acute tubulointerstitial nephritis, renal cortical necrosis, mesangiolytic vasculitis, glomerulonephritis, proteinuria, hematuria, and myoglobinuria (Sitprija 2006, 2008), as well as alterations in renal ion transport (Sitprija and Sitprija, 2016). The high vascularization of the kidneys and their involvement in blood filtration and the excretion of endogenous and xenobiotic substances makes these organs particularly prone to the actions of circulating snake venoms and their toxins (Sitprija 2006, 2008; Sanhajariya *et al.* 2018).

In Brazil, most cases of snakebite-induced acute kidney injury (AKI) result from envenomation by lanceheads (*Bothrops* spp.) and the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus* = *C. d. terrificus*) (Pinho *et al.* 2008; Rodrigues Sgrignolli *et al.* 2011; Berger *et al.* 2012; Albuquerque *et al.* 2013). Although *Bothrops* spp. are responsible for 87% of the bites by venomous snakes in this country compared to 9% by *C. d. terrificus* (data for the period 2001-2014), the overall mortality associated with the latter species is 2.6-fold greater than with the former genus (0.97% vs. 0.37%) (SINAN 2019). The greater lethality associated with envenomation by *C. d. terrificus* has been attributed primarily to its high content of crotoxin, a phospholipase A₂ (PLA₂) β-neurotoxin that accounts for ~50% of the venom dry weight (Hadler and Vital Brazil 1966; Sampaio *et al.* 2010).

Snake venom PLA₂ display a variety of activi-

ties, such as presynaptic neurotoxicity, myonecrosis, edema formation, cardiotoxicity, anticoagulant activity, activation/inhibition of platelet aggregation, hemorrhage, hemolysis and cytotoxicity (Kini 2003; Harris and Scott-Davery 2013). Most of these effects reflect the PLA₂-mediated hydrolysis of cell membrane phospholipids to release arachidonic acid that can be oxidized to generate reactive oxygen species (ROS) that in turn produce lipid peroxides, leading to cellular injury (Spiteller *et al.* 2001; Kini 2003; Teixeira *et al.* 2003).

Human envenomation by *C. d. terrificus* is characterized by peripheral neurotoxicity (palpebral ptosis, external ophthalmoplegia and facial weakness that produce 'myasthenic facies', generalized muscle weakness, mydriasis and, rarely, respiratory failure requiring mechanical ventilation), systemic myonecrosis (rhabdomyolysis, with a marked increase in serum myoglobin and creatine kinase, and myoglobinuria, as well as generalized myalgia), coagulopathy (afibrinogenemia leading to prolonged clotting time with no thrombocytopenia), and AKI, with little or no local manifestations such as hemorrhage, edema or necrosis at the bite site (pain related to traumatism caused by the bite may be present but is soon followed by paresthesia and anesthesia) (Amorim and Mello 1954; Rosenfeld 1971; Azevedo-Marques *et al.* 1985, 1987; Silveira and Nishioka 1992; Sano-Martins *et al.* 2001; Bucarechi *et al.* 2002; Warrell 2004; Pinho *et al.* 2005; Berger *et al.* 2012; Frare *et al.* 2019; Medeiros *et al.* 2020). AKI is the major clinical complication and the principal cause of death in individuals who survive the severe initial phase of envenomation (Pinho *et al.* 2005; Frare *et al.* 2019).

Although the clinical profile of AKI induced by

C. d. terrificus venom in humans has been extensively studied, with an important mechanism of kidney damage being the renal deposition of myoglobin released by the rhabdomyolytic activity of the venom (Rosenfeld 1971; Azevedo-Marques *et al.* 1985, 1987; Silveira and Nishioka 1992; Bucaretychi *et al.* 2002; Warrell 2004; Pinho *et al.* 2005; Albuquerque *et al.* 2013; Fraire *et al.* 2019), relatively few experimental studies have investigated the mechanisms involved in this phenomenon. The renal lesions caused by this venom in humans can be reproduced to varying extents in dogs (Sangiorgio *et al.* 2008) and mice (Frezzatti and Silveira 2011). In mice, *C. d. terrificus* venom causes renal dysfunction and oxidative stress (Yamasaki *et al.* 2008) that can be attenuated to varying extents by compounds such as lipoic acid (Alegre *et al.* 2010), allopurinol (Frezzatti and Silveira 2011), and N-acetyl-L-cysteine (Barone *et al.* 2014). The renal functional alterations seen after envenomation may be mediated directly by venom components such as crotoxin/PLA₂ (Monteiro *et al.* 2001; Amora *et al.* 2008) or indirectly by mediators released by cells such as macrophages exposed to the venom (Martins *et al.* 2003; Cruz *et al.* 2005).

Physiological and pathophysiological studies have shown that rats respond more like humans than do mice and has led to the extensive use of these rodents as a model for investigating normal and diseased states (National Human Genome Research Institute 2004), but no reports have examined the response to *C. d. terrificus* venom in this species. Hence, in this work, we examined the ability of *C. d. terrificus* venom to induce AKI after intraperitoneal (i.p.) injection in rats as a potentially useful model for the experimental evaluation of new therapeutic strategies to treat systemic envenomation.

We assessed AKI 2 h after venom injection to simulate the time interval between envenomation and seeking medical assistance in the clinical setting, including antivenom administration [mean interval of 3 h, according to Pinho *et al.* (2005)]. The occurrence of AKI was considered a positive confirmation of envenomation, and several other biochemical, hematological, and histological parameters were monitored to assess the extent of renal damage. We also examined the ability of antivenom given i.p. 2 h post-venom to rescue rats from the lethal effects of the venom and to attenuate the renal functional alterations associated with AKI.

Methods

Animals

Standard laboratory practices for animal care were followed according to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council of the National Academies 2011) and the Animal Research: Reporting of *In vivo* Experiments (ARRIVE) guidelines (Kilkenny *et al.* 2010). The experimental protocols were approved by the institutional Committee for the Care and Use of Experimental Animals at the University of Sorocaba (protocol no. 031/2014). Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) (290-400 g; 3-6 months old) purchased from the Central Animal Facility of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo (São Paulo, SP, Brazil) were housed (3 rats/plastic cage on a wood shavings substrate) at the University of Sorocaba animal facility at 22 ± 3 °C and 50 ± 5% humidity on a 12 h light/dark cycle (lights on at 6 a.m.), with access to food and water *ad libitum*.

Venom

Crotalus d. terrificus venom was collected manually from 20 male and female young adult snakes (200-400 g, ~2 years-old) captured in the Paraíba Valley close to the city of São José dos Campos (23° 11' 0" S; 45° 53' 0" W) and kept in the serpentarium of the Center for Nature Studies (under Environmental Secretariat License SMA 15.380/2012) at the University of Vale do Paraíba (UNIVAP, São José dos Campos, SP, Brazil). The use of the venom was registered with the Brazilian National System for the Management of Genetic Patrimony and Associated Traditional Knowledge (SISGEN, registration no. ACB5FCO). The venom was lyophilized and stored at 4-8 °C until used.

Antivenom

Therapeutic crotalic antivenom raised against *C. d. terrificus* venom (lot 135202/1, expiry date for human use: October 2016) produced by the Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) was kindly donated by the Escritório Regional de Saúde (ERSA) in Piracicaba, SP, Brazil. Although the antivenom was used beyond the expiry date for human use, the solution nevertheless conserved the macroscopic properties generally considered to be indicative of quality maintenance, i.e., lack of turbidity and no formation of precipitates. Indeed, previous studies have demonstrated the usefulness of antivenoms beyond their formal expiry dates

(O'Leary *et al.* 2009; Sanchez *et al.* 2019; Tan *et al.* 2019). The dose of antivenom was calculated based on the manufacturer's stated potency in which 1 mL of antivenom neutralizes the lethality of 1.5 mg of reference *C. durissus* ssp. venom in mice.

In vivo protocols

All rats were anesthetized i.p. (always on the left side) using a schedule based on the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. The anesthetic mixture consisted of xylazine (10 mg kg⁻¹) and ketamine (10 mg kg⁻¹) (both purchased from Ceva®, Paulínia, SP, Brazil), with midazolam (1 mg kg⁻¹) being used for initial sedation (before venom administration) and tramadol (5 mg kg⁻¹) as an analgesic (both from Medley®, Campinas, SP, Brazil) administered soon after venom injection.

Urine, blood, and renal tissue samples were collected at death (with venom alone, ~8.2 h post-venom; see later) or 2 h or 24 h post-venom when the rats were killed with an overdose of isoflurane (Cristália®, Itapira, SP, Brazil). Hematological (leukocytes, platelets, and erythrocytes) and biochemical (protein, creatinine, and urea) parameters were determined in blood and urine, whereas blood and renal tissue samples were used to evaluate oxidative stress markers (glutathione – GSH, glutathione peroxidase – GPx, catalase – CAT, thiobarbituric acid reactive substances – TBARS). Alterations in renal morphology were analyzed by light microscopy. In a preliminary set of experiments, rats were injected with different doses of *C. d. terrificus* venom (5, 6, 7.5, and 10 mg kg⁻¹, i.p.; one dose per rat, n=3 rats/dose, a total of 12 animals) to determine an appropriate minimal venom dose able to induce AKI. The venom was injected in a volume of 0.5 mL, which is considerably less than the volume of 10 mL kg⁻¹ recommended elsewhere (Morton *et al.* 2001), and the venom dose of 6 mg kg⁻¹ was selected based on a marked increase in blood urea and creatinine concentrations. These biomarkers are frequently used as indicators of renal dysfunction because they reflect a decrease in the glomerular filtration rate in response to renal alterations (Sato 2012). The rats were randomly distributed into five groups (n=5/group; total N = 25 rats), as follows: Group 1 (G1) – Saline (sham) control (n=5): Rats received 0.5 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS, i.p.) and were killed 2 h later with an overdose of isoflurane for blood and tissue sample collection; Group

2 (G2; n=5) – rats were injected with *C. d. terrificus* venom (6 mg kg⁻¹, i.p.) and killed 2 h later with an overdose of isoflurane for blood and tissue sample collection. Pharmacokinetically, this 2 h interval provided sufficient time for the absorption and diffusion of the venom and its main toxin, crotoxin, from the site of application (Barral-Netto and von Sohsten 1991; Cura *et al.* 2002), with subsequent binding to the presynaptic terminations of striated muscle (Cura *et al.* 2002); Group 3 (G3) – Assessment of survival time (n=5): Rats were injected with venom (6 mg kg⁻¹, i.p.) and 2 h later received PBS (0.5 mL, i.p., n=5) after which they were monitored until imminent death when blood and tissue samples were collected; the rats in this group survived for 8.2 ± 1.6 h. Group 4 (G4) – *C. d. terrificus* venom followed by antivenom (n=5): Rats were injected with venom (6 mg kg⁻¹, i.p.) and 2 h later they received crotalic antivenom (from 1.3 to 1.9 mL, i.p.; 1 mL of antivenom neutralizes 1.5 mg of *C. d. terrificus* reference venom, according to the manufacturer) in a rescue model conceptualized by Baudou *et al.* (2017); blood and tissue samples were collected 24 h after venom injection (22 h after antivenom). Group 5 (G5) – PBS followed by antivenom (n=5): Rats were injected with PBS (0.5 mL, i.p.) and 2 h later they received crotalic antivenom i.p. (the same volume as in group G4); blood and tissue samples were collected 24 h after PBS injection (22 h after antivenom). The rats in groups G4 and G5 were killed with an overdose of isoflurane before blood and tissue sample collection.

Groups G1-G5 were all injected with PBS, venom, or antivenom on the right side. *Figure 1* shows the experimental schedule described above.

Hematological parameters

Blood samples were collected in polypropylene tubes (Injex® Indústria Cirúrgica Ltda., Ourinhos, SP, Brazil) containing ethylenediaminetetraacetic acid tripotassium salt (EDTA). Total leukocyte, platelet and erythrocyte counts were determined in triplicate per sample using a Sysmex XS 1000i™ Hematology Analyzer (Roche, Basel, Switzerland). Whole blood samples (~20 µL) were injected into the analyzer and platelets and erythrocytes were counted using an impedance detection method combined with hydrodynamic focusing technology (Yoshida *et al.* 2020). Leukocytes were counted using fluorescent flow cytometry.

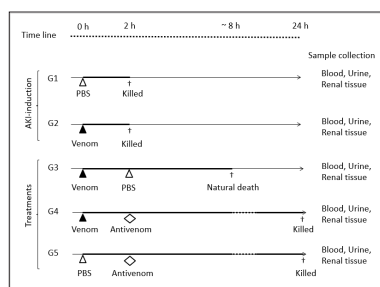


Figure 1. Experimental timeline for induction of AKI with *C. d. terrificus* venom (6 mg kg^{-1} , i.p.) and subsequent treatments. AKI, acute kidney injury; Antivenom, crotalic antivenom; PBS, phosphate-buffered saline.

Assessment of oxidative stress

Glutathione (GSH) was determined by sulfhydryl (SH) quantification using the Ellman method (Ellman 1959). Briefly, $100 \mu\text{L}$ of Triton X-100 was added to $150 \mu\text{L}$ of blood followed by $100 \mu\text{L}$ of 10% trichloroacetic acid (TCA). After centrifugation ($5,000 \text{ rpm}$, 10 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$) the supernatant was diluted in 1 M phosphate buffer (pH 7.4) and an aliquot was subsequently mixed with 10 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to yield a yellow complex, the absorbance of which was read at 412 nm . A similar procedure was used for renal tissue homogenates in which 250 mg of tissue was suspended in 5 mL of 0.15 mM KCl and homogenized with an ultrasonic tissue homogenizer in an ice bath. Thereafter, $600 \mu\text{L}$ of homogenate was mixed with $100 \mu\text{L}$ of TCA, centrifuged, and an aliquot of $250 \mu\text{L}$ was diluted in PBS and mixed with 10 mM DTNB. The GSH concentration was expressed in mM for blood or mmol g^{-1} for tissue.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was assayed according to Paglia and Valentine (1967). Briefly, $10 \mu\text{L}$ of diluted blood was mixed with $390 \mu\text{L}$ of 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7, containing 1 mM GSH, 0.1 U of GSH-reductase/ mL , 0.15 mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), 1.25 mM sodium azide and $100 \mu\text{L}$ of 0.4 mM hydrogen peroxide (H_2O_2). Tissue samples were processed as described in the preceding paragraph. GPx activity was monitored as the decay in NADPH absorbance (greater activity = greater decay) for 2 min at 340 nm and was expressed in $\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ of hemoglobin (Hb) for blood, or $\text{nmol NADPH min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ of tissue.

Catalase (CAT) activity was assayed according to Aebi (1984). Briefly, $10 \mu\text{L}$ of blood was

diluted in $590 \mu\text{L}$ of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7. A $20 \mu\text{L}$ aliquot was mixed with $70 \mu\text{L}$ of H_2O_2 to start the reaction and the enzymatic decomposition of H_2O_2 by CAT was monitored for 3 min at 240 nm . The reaction was run at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A similar procedure was used for tissue homogenates prepared as described above. Enzyme activity was expressed as $\text{k min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ of Hb for blood or $\text{k min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ of tissue, where k is a rate constant.

Lipid peroxidation was assessed by quantifying thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to Ohkawa *et al.* (1979). Briefly, $150 \mu\text{L}$ of plasma was mixed with $50 \mu\text{L}$ of 3 M NaOH and incubated at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min . This step was followed by the addition of $250 \mu\text{L}$ of 6% H_3PO_4 , $250 \mu\text{L}$ of 0.8% thiobarbituric acid (TBA), and $100 \mu\text{L}$ of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) followed by incubation at $80 \text{ }^\circ\text{C}$ for 60 min . A similar procedure was used for tissue homogenates prepared as described above. Thereafter, $250 \mu\text{L}$ of the homogenate was mixed with 1.5 mL of 6% H_3PO_4 , $500 \mu\text{L}$ of 0.8% TBA and $100 \mu\text{L}$ of 10% SDS. The reaction between lipid peroxidation products and TBA results in a pink/rose-colored compound detected spectrophotometrically at 532 nm . The results were expressed as TBARS concentration in $\mu\text{mol mL}^{-1}$ of plasma or $\mu\text{mol g}^{-1}$ of tissue.

Biochemical parameters

The biochemical parameters of renal function were assessed using commercial ready-to-use kits for spectrophotometric assays purchased from Bioclin® (Belo Horizonte, MG, Brazil) or Labtest® (Lagoa Santa, MG, Brazil). Total protein (biuret method; 545 nm), urea (urease method; 600 nm) and creatinine (alkaline picrate method; 510 nm) were evaluated in blood samples; urinary protein was quantified by the pyrogallol red method (600 nm), while urinary urea and creatinine were assayed with the same kits as used for blood samples. Control serum (Biocontrol N, normal) was used as an internal control and yielded the following values: protein = 5.3 g dL^{-1} (normal range values (NRV) provided by the manufacturer: $4.7\text{-}5.9 \text{ g dL}^{-1}$), urea = 16.0 mg dL^{-1} (NRV: $12.0\text{-}20.0 \text{ mg dL}^{-1}$) and creatinine = 1.43 mg dL^{-1} (NRV: $1.14\text{-}1.72 \text{ mg dL}^{-1}$).

Histological analysis of renal tissue

At the end of the experiments, the kidneys from groups G1-G5 ($n=5/\text{group}$) were excised, washed in physiological solution, and imme-

diately fixed in 10% buffered formalin solution for 24 h at room temperature. The kidneys were then sectioned sagittally and immersed in 70% ethanol until histological processing using standard procedures for dehydration and embedding in paraffin. Sections (4 μm thick) were mounted on slides, dewaxed, cleared in xylene, and hydrated in running tap water, after which they were double-stained with hematoxylin-eosin (H&E) and examined with a light microscope (Olympus CBA, Tokyo, Japan). The slides from each group were examined for venom-induced alterations to the following structures: the glomeruli (hypercellularity due to mesangial proliferation and/or invasion, dilation of glomerular capillaries to form microaneurysms), tubules (loss of brush border, occurrence of cell swelling, hydropic alterations, presence of luminal cell casts), interstitium (medullary or cortical proliferation and/or loss of interstitium) and vessels (congestion, particularly in the arterioles). The potential protective effects of crotalic antivenom on renal morphology were also assessed. Representative histological fields from each group were captured using a digital 16-megapixel camera, with a 10x objective for a panoramic overview (1 cm = 20 μm) and a 40X objective (1 cm = 40 μm) for a detailed view.

The observational frequency of such alterations ranged arbitrarily from 0 to 6, with 0-1 representing the absence or presence of few alterations (the latter mainly due to tissue manipulation), 2-3 indicating a moderate number of alterations, and 5-6 representing a high frequency of morphological alterations.

Data analysis

All numerical parameters were expressed as the mean \pm SD. Statistical comparisons among the experimental groups were done using one-way ANOVA followed by the Tukey-Kramer multiple comparisons test, with $p < 0.05$ indicating significance in all cases. The normality of the data was assessed using the Shapiro-Wilk test prior to the statistical comparisons. All data analyses were done using Origin[®] v.8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) or Statistica v.8.0 (Dell, Round Rock, TX, USA).

Results and discussion

Crotalus d. terrificus venom induces AKI in humans (Warrell 2004; Pinho *et al.* 2005, 2008; Albuquerque *et al.* 2013) and experimental animals such as mice (Yamasaki *et al.* 2008);

venom-induced renal lesions have also been reported in dogs (Frezza and Silveira 2011), although this species is resistant to AKI (Souza-Silva *et al.* 2003). Whereas the venom of *C. d. terrificus* and related subspecies causes functional and histological alterations in rat isolated perfused kidneys (Monteiro *et al.* 2001; Amora *et al.* 2008), the renal effects of *C. d. terrificus* venom *in vivo* in rats have not been investigated, in contrast to *Bothrops* venoms (Boer-Lima *et al.* 1999, 2002; Linardi *et al.* 2011; Gois *et al.* 2017; Yoshida *et al.* 2020). In this work, we examined the ability of *C. d. terrificus* venom injected *i.p.* to induce AKI in rats and the ability of antivenom to protect against this damage. We also assessed the potential changes in several renal biochemical, hematological, and histological parameters in response to the venom. Although not the normal or usual route of venom inoculation during a 'natural' bite, at least in humans, *i.p.* injection of venom could potentially occur in rodent prey bitten by snakes with long fangs. Since there have been no experimental studies of AKI induced by *C. d. terrificus* venom in rats we chose to use this route of administration because we had used it in an earlier investigation of AKI caused by *Bothrops jararaca* venom (Yoshida *et al.* 2020). The results of this study show that venom injected *i.p.* was able to cause AKI and that this could be a suitable model for studying venom-induced renal damage.

Biochemical parameters

Rats injected with venom (groups G2 and G3, but especially G3) showed an increase in the blood (Fig. 2A,C) and urine (Fig. 2B,D) concentrations of urea and creatinine compared to rats injected with saline alone (control, G1), a finding compatible with the development of AKI. The persistent elevation in blood urea and creatinine concentrations for up to 7.2 h indicated sustained and worsening renal damage after venom injection. Increases in urea and creatinine are standard criteria for defining and monitoring the progression of AKI (Mehta *et al.* 2007; Cerdá *et al.* 2008) but are considered by some to be insensitive, nonspecific, and of limited usefulness for the early detection of AKI (Vaidya *et al.* 2008). Although blood protein concentrations were generally unaltered (Fig. 2E), proteinuria indicative of defective glomerular filtration was observed (Fig. 2F). Renal proteinuria is a common indicator of AKI and is frequently seen after snakebites (Sitprija 2006),

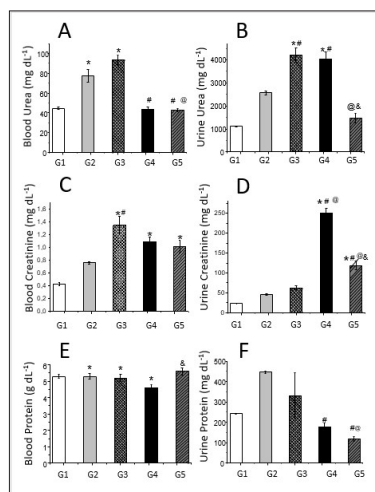


Figure 2. Urea, creatinine, and protein concentrations in blood (A, C, and E, respectively) and urine (B, D, and F, respectively) in rats injected with phosphate-buffered saline (PBS; G1), *C. d. terrificus* venom (6 mg kg⁻¹, i.p.; G2 – analyzed 2 h post-venom; G3 – analyzed 7.2 h post-venom), venom + *C. d. terrificus* antivenom (G4, analyzed 24 h post-venom) and antivenom alone (G5 – 24 h after antivenom). In groups G4 and G5, antivenom was administered 2 h after the injection of venom (G4) or PBS (G5). The antivenom:venom ratio used was based on the manufacturer's recommended ratio in which 1 mL of antivenom neutralizes the lethality of 1.5 mg of reference *C. durissus* ssp. venom in mice. The columns represent the mean \pm SD (n=3-5/group). *, #, @, & p<0.05 compared to G1(*), G2(#), G3(@), and G4(&).

including by *C. d. terrificus* in humans (Pinho *et al.* 2005), dogs (Sousa-e-Silva *et al.* 2003), as well as rats (as shown here; *Fig. 2F*).

Antivenom administered 2 h after venom was effective in preventing the increase in blood urea and renal proteinuria (*Fig. 2A,F*), but failed to prevent the changes in the other blood and urinary biochemical parameters (*Fig. 2B-E*). Most of these alterations are likely mediated by crotoxin that is rapidly cleared from the circulation in mice (Barral-Netto and von Sohsten, 1991) and Amaral *et al.* (1997) reported that *C. d. terrificus* venom and crotoxin were undetectable in most of their patients who were treated >8 h post-bite, and that crotoxin was undetectable in most patients by 4-8 h after being bitten. A kinetic analysis has shown that in humans crotoxin has a distribution half-life of 22 min and a terminal elimination half-life of 5.2 h (Cura *et al.* 2002). As shown here, by 2 h post-venom, when a considerable proportion of the crotoxin would have been distrib-

uted and bound to tissues, antivenom still offered some protection against the deleterious effects of the venom. The time interval of 2 h after venom injection used here was chosen to simulate the delay seen clinically between envenomation and treatment since in humans the mean interval between these events is ~3 h and antivenom is frequently given at post-envenomation intervals that are considerably greater than that used here (Bucaretschi *et al.* 2002; Pinho *et al.* 2005).

The lack of protection by antivenom against certain venom-induced alterations may reflect the availability of a less than optimal amount of antivenom to neutralize that particular effect, even though the antivenom:venom ratio used was that recommended by the manufacturer; poor neutralization because of a suboptimal amount of antivenom has also been noted by others (Baudou *et al.* 2017).

Crotalic antivenom did not prevent the venom-induced increase in urinary creatinine, but instead markedly enhanced the level of this marker (~10-fold increase compared to saline control in G1 and ~5-fold increase compared to G3; *Fig. 2D*). The marked elevation in creatinine in this group 22 h after antivenom administration was possibly related to venom-induced muscle damage (rhabdomyolysis), with the resulting myoglobinuria contributing to the development of AKI (Azevedo-Marques *et al.* 1985, 1987; Nogueira and Sakate 2006).

Creatinine, an uncharged endogenous substance (113 kDa) that is not bound to serum proteins, is generated from the nonenzymatic conversion of creatine and creatine phosphate, 95% of which is found in muscle (Thongprayoon *et al.* 2016). As shown here, antivenom alone increased the creatinine concentration in blood and urine after 22 h (*Fig. 2C,D*), although the increase in urine was less than in G4 rats. One possible explanation for the antivenom-induced increase in serum creatinine could be related to changes in creatinine kinetics (in this case enhanced elimination) resulting from alterations to the glomerular filtration rate (GFR), as occurs in paraquat poisoning (Mohamed *et al.* 2015). This finding suggests that the increase in creatinine concentrations in G4 rats treated with antivenom should not be attributed entirely to *C. d. terrificus* venom. In contrast to this effect, antivenom alone (G5) reduced the proteinuria to below the baseline concentration in G1 (*Fig. 2F*). This change had minimal effect on the creatinine concentration because

creatinine shows little tendency to bind other proteins.

Oxidative stress parameters

The antioxidant system of tissues, which consists of a series of enzymes and small molecules, provides an effective defense mechanism against renal damage by xenobiotics by delaying or inhibiting the oxidation of substrates and the generation of damaging reactive oxygen species (ROS) (Ferreira and Matsumura 1997). An increase in antioxidant enzyme activity generally has a protective effect whereas a decrease can lead to renal damage. Given the physiological importance of antioxidant mechanisms in tissue protection and the fact that lipid peroxidation, one of the first events in oxidative damage initiated by ROS, has been implicated in snake venom toxicity (Santosh *et al.* 2013), we examined the changes in lipid peroxidation (TBARS) and oxidative stress (GSH, GPx and CAT activity) in blood and renal tissue of rats injected with *C. d. terrificus* venom and the ability of crotalic antivenom to protect against these alterations.

Lipid peroxidation is a free radical-mediated chain of reactions that results in the oxidation of polyunsaturated lipids (Hampel *et al.* 2016), leading to the damage of membrane lipids and the attenuation of cell and tissue viability (Mylonas and Kouretas 1999). *Figure 3A,B* shows that 2 h post-venom (G2) there was no relevant increase in blood TBARS, whereas shortly before death (~8 h post-venom) TBARS had increased by approximately two-fold; there was no significant change in the TBARS levels in urine. This finding that TBARS increased in G3 but not in G2 indicated that lipid peroxidation was a late event and agrees with previous studies showing that *C. d. terrificus* venom and some of its components cause lipid peroxidation in other tissues (Silva *et al.* 2011; Gonçalves *et al.* 2014; Toyama *et al.* 2019). Treatment with antivenom 2 h post-venom did not attenuate the venom-induced increase in TBARS, possibly because antivenom alone also caused some lipid peroxidation.

Glutathione, which exists in reduced (GSH) or oxidized (GSSG) states, is one of the most important ROS scavengers (Halliwell and Gutteridge 1999) and increases in GSH levels have been observed in patients with chronic renal failure, possibly as a compensatory protective mechanism to deal with the oxidative imbalance produced by kidney disease (Lucchi

et al. 2005). As shown here, there was only a small increase in blood GSH in response to venom alone after 2 h and ~8 h (*Fig. 3C,D*) but a marked increase in renal GSH after 2 h (G2) that returned to normal after ~8 h (G3). Treatment with antivenom (G4) attenuated the small increase in blood GSH seen with venom alone after ~8 h but did not markedly affect the renal levels of GSH. Antivenom alone (G5) slightly reduced the concentration of circulating (blood) GSH but increased the renal content of GSH. Glutathione peroxidase (GPx) is a selenium-containing antioxidant enzyme that reduces H_2O_2 to water and lipid peroxides to lipid alcohols. In the absence of adequate GPx activity or GSH levels, hydrogen and lipid peroxides are not detoxified and are converted to OH- and lipid peroxy radicals, respectively, by transition metals (Fe^{2+}) (Tabet and Touyz 2007). GPx oxidizes glutathione to glutathione disulfide in

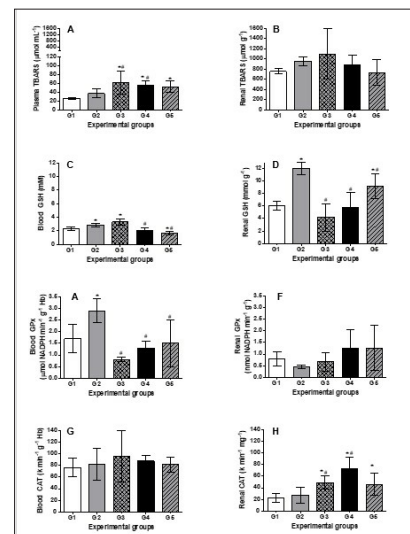


Figure 3. Oxidative stress biomarkers (TBARS, GSH, GPx, and CAT) in blood (A, C, E, and G, respectively) and urine (B, D, F and H, respectively) of rats injected with phosphate-buffered saline (PBS; G1), *C. d. terrificus* venom (6 mg kg⁻¹, i.p.; G2 – analyzed 2 h post-venom, G3 – analyzed 7.2 h post-venom), venom + *C. d. terrificus* antivenom (G4, analyzed 24 h post-venom) and antivenom alone (G5 – 24 h after antivenom). In groups G4 and G5, antivenom was administered 2 h after the injection of venom (G4) or PBS (G5). The antivenom:venom ratio used was based on the manufacturer's recommended ratio as defined in the legend of Figure 2. The columns represent the mean ± SD (n=5/group). *,#p<0.05 indicate differences compared to G1(*) or G2(#). CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; GSH, glutathione; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

the cytosol, mitochondria, and a small percentage of the endoplasmic reticulum of mammalian tissues (Lu 2013). Glutathione is released as reduced GSH to extracellular spaces, including blood plasma, epithelial lining fluids, and exocrine secretions (Ballatori *et al.* 2009) in response to physiological disturbances. The GSH/GPx system thus acts as a buffer to protect crucial proteins against modifications induced by ROS (Chen *et al.* 2015).

Venom caused an increase in blood GPx activity after 2 h but this returned to below saline (control) levels after ~8 h (Fig. 3E). Antivenom did not markedly alter the response to venom (G4) compared to that seen in G3, nor did antivenom alone have a relevant effect on GPx activity. There were no marked venom-induced alterations in renal GPx activity after 2 h and ~8 h with venom alone, or after treatment with antivenom (Fig. 3F).

CAT is an enzyme located in peroxisomes that converts H₂O₂ to water and oxygen (Weydert and Cullen 2010). Neither venom nor antivenom (in the absence or presence of venom) markedly affected the blood CAT activity (Fig. 3G), but there was a venom-induced increase in the activity of this enzyme in renal tissue after ~8 h that was not attenuated by antivenom; antivenom alone increased the renal CAT activity to a level like venom alone (Fig. 3H). Indeed, antivenom alone (G5) enhanced the levels of several parameters, particularly blood and urinary creatinine, and to a lesser extent, renal GSH, blood TBARS and renal CAT in relation to saline-treated (control) rats but reduced the level of blood GSH and renal proteinuria.

These findings suggest that antivenom alone can alter the redox status in blood and renal tissue by mechanisms that could involve the activation of defense pathways against horse immunoglobulins (Bahrami *et al.* 2016) and an adverse reaction to antivenom (Silva *et al.* 2015). Adverse reactions to snake antivenom include both acute (anaphylactic or pyrogenic) and delayed (serum sickness type) reactions (León *et al.* 2013; de Silva *et al.* 2016; Negrin *et al.* 2021), but no reports have described such reactions in response to the i.p. injection of antivenom in rats. Intraperitoneal injection is considered a safe route of administration (Guarnieri 2016; Al Shoyaib *et al.* 2019), but no studies have reported on the renal responses to crotoalic antivenom alone, such as done here. The i.p. administration of bothropic antivenom in rats resulted in proteinuria (Yoshida *et al.* 2020),

one of the earliest signs of renal diseases and indicative of glomerular damage (Gowda *et al.* 2010). Thus, it is possible the potential effect of antivenom itself on a variety of parameters may have been masked by the concomitant administration of venom in studies that did not include an experimental group with antivenom alone. An additional source of interference could be the phenol used as a preservative in antivenom solutions since this chemical can impair leukocyte-endothelial interactions *in vivo* (Zychar *et al.* 2008), and high phenol inhalation for several weeks paralysis and severe injury to the heart, liver, kidneys, and lungs, and in some cases, death in experimental animals (Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2008). The use of lyophilized antivenom (Mendonça-da-Silva *et al.* 2017) could potentially avoid phenol-related problems.

Hematological parameters

Hematological alterations are a common manifestation of systemic envenoming after snakebite and the detection of abnormal blood parameters is an important step in the management of envenomed persons. Figure 4 shows the hematological results for the various experimental groups. There was a slight reduction in leukocyte numbers in G2 and mild leukocytosis in G3; treatment with antivenom appeared to attenuate the leukocytosis in group G4. This attenuation may have been partly mediated by the antivenom itself, independently of its effect on venom, since antivenom alone caused a reduction in leukocyte numbers. Mild leukocytosis has been observed in humans (Sano-Martins *et al.* 2001) and dogs (Sousa-e-Silva *et al.* 2003; Nogueira and Sakate 2006; Nogueira *et al.* 2007) envenomed by *C. d. terrificus* and has been attributed to neutrophilia (Sousa-e-Silva *et al.* 2003). Nogueira *et al.* (2007) argued that this neutrophilia involved an acute-phase response with the release of catecholamines and cellular mediators; serum chemotactic factors have also been implicated in human envenomation by *C. d. terrificus* (Martins *et al.* 2002). Souza-e-Silva *et al.* (2003) reported that leukocytosis persisted for up to 48 h in dogs injected with a venom dose of 1 mg kg⁻¹, i.m., and was reversed by treatment with antivenom i.v. 2 h after envenomation, as also observed here in rats using antivenom (G4 in Fig. 4A).

Platelet number was unaffected by the venom (Fig. 4B), a finding in general agreement with studies in dogs (Sousa-e-Silva *et al.* 2003)

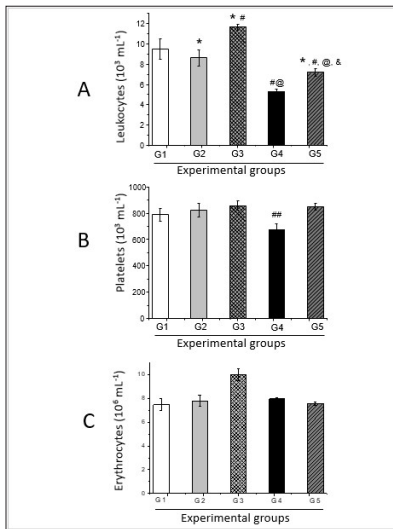


Figure 4. Hematological parameters (leukocyte, platelet and erythrocyte counts) in rats injected with phosphate-buffered saline (PBS; G1), *C. d. terrificus* venom (6 mg kg⁻¹, i.m.; G2 – analyzed 2 h post-venom, G3 – analyzed 7.2 h post-venom), venom + *C. d. terrificus* antivenom (G4, analyzed 24 h post-venom) and antivenom alone (G5 – 24 h after antivenom). In groups G4 and G5, antivenom was administered 2 h after the injection of venom (G4) or PBS (G5). The antivenom:venom ratio used was based on the manufacturer’s recommended ratio as defined in the legend of Figure 2. The columns represent the mean \pm SD (n=3-5/group). *,#,@,&,##p<0.05 compared to G1 (*), G2 (#), G3 (@), G4 (&), and G3 and G5 (##).

and humans (Sano-Martins *et al.* 2001) that also reported unaltered platelet numbers after envenomation by *C. d. terrificus*. Antivenom alone (G5) did not affect platelet number but decreased this number when associated with venom (G4). However, this decrease was not clinically relevant since there was no significant difference compared to saline-treated (control) rats (G1). The lack of effect on circulating platelet numbers could perhaps be the most useful parameter for distinguishing between clinical envenomation by *C. d. terrificus* (Sano-Martins *et al.* 2001) and *Bothrops* species (Sano-Martins *et al.* 1997; Yoshida *et al.* 2020) since venoms of the latter genus can cause marked thrombocytopenia. Such a distinction would be of clinical relevance in facilitating the choice of the appropriate antivenom, thereby ensuring better treatment of the patient, particularly in cases where the offending snake is not brought for identification.

There was no difference in the number of erythrocytes 2 h (G2 vs. G1) or 7.2 h (G3 vs. G1) after envenomation (Fig. 4C). The delayed administration of antivenom (G4) attenuated the slight increase in the number of erythrocytes in G3 to a level similar to that seen with saline and antivenom alone (Fig. 4C). Other reports have also observed no alterations in the number of erythrocytes, the hematocrit, or the hemoglobin concentration in dogs (Sousa-e-Silva *et al.* 2003) and humans (Sano-Martins *et al.* 2001) envenomed by *C. d. terrificus*.

Histological analysis

The kidneys regulate the body’s internal composition through a complex network of nephrons and collecting ducts that filter, absorb and secrete fluid and electrolytes and promote the elimination of metabolic waste products via the urine (Santoro *et al.* 2008). Glomerular damage leads to several pathologies (Greka and Mundel 2012) and circulating snake venom components can cause morphological abnormalities that result in functional disturbances.

Figure 5 shows representative panels and insets for the different groups that illustrate the main histological alterations seen in the renal parenchyma. Histological analysis of renal sections from the different experimental groups (G2-G5) showed that morphological changes were not evenly distributed throughout the renal parenchyma since there were areas with visible abnormalities juxtaposed to regions normal in appearance. This heterogeneity reflected the differential effects of venom components on the kidney in that all nephrons were not affected simultaneously or in the same manner.

Except for G1 (saline control) that showed the typical normal morphology of renal corpuscles, proximal and distal convoluted tubules, the loop of Henle and collecting ducts (Fig. 5A,B), all the other groups exhibited varying degrees of alterations in their structural segments (Fig. 5C-J). The changes included glomerular alterations (indicated by arrows in the panels and insets of Fig. 5). Major and more numerous glomerular alterations were seen in G2 and G3 (see insets); antivenom (G4) partially prevented the glomerular morphological alterations (inset in G4). Of note were the glomerular alterations in G5 (inset in G5) that received antivenom alone. The greatest structural changes in the cortical tubular nephron segments and medullary collecting tubules were seen in G2: the changes included loss or central collapse of the brush

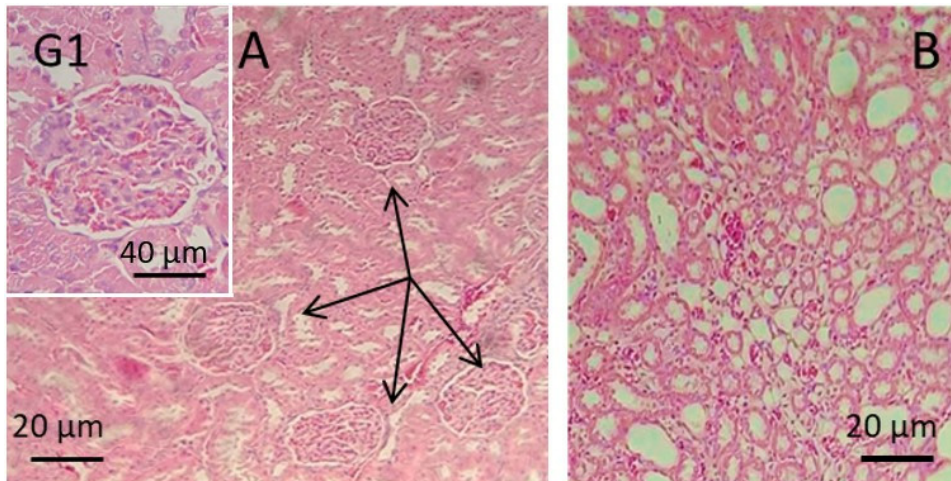
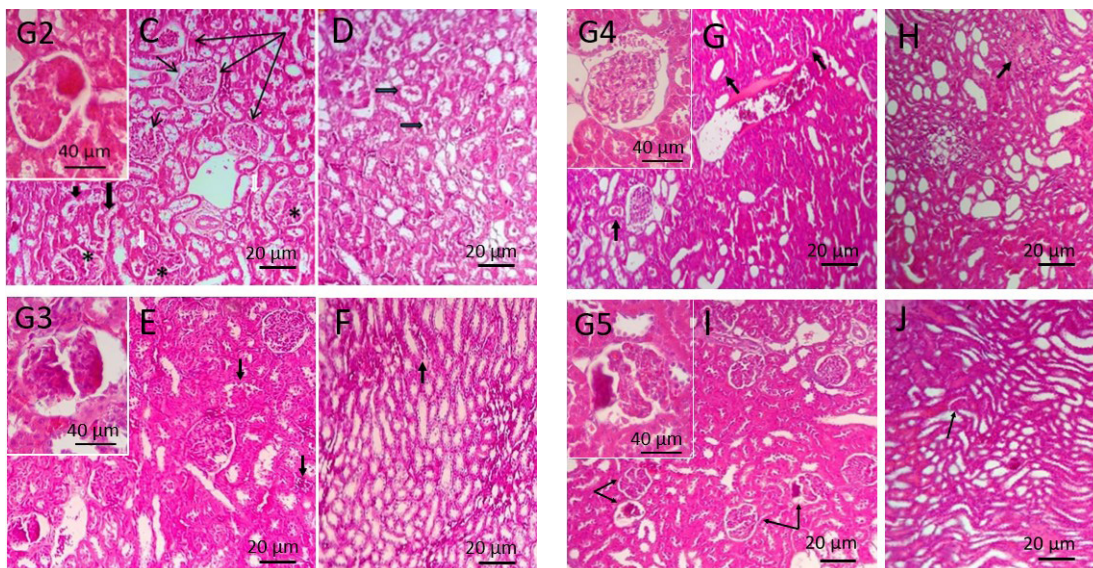


Figure 5. Histological renal tissue assessment in groups G1 (A and B), G2 (C and D), G3 (E and F), G4 (G and H), and G5 (I and J) (scale bar = 20 µm in all major panels). Insets in all groups show renal corpuscles (scale bar = 40 µm in all inserts). G1 (control rats injected with phosphate-buffered saline; arrows indicate the normal appearance of renal corpuscles). The effects of severe damage induced by *C. d. terrificus* venom are seen in G2 (venom group): panel C, long arrows = widened filtration space and hypercellularity; short arrows = microaneurysms; panel D = luminal cellular casts resulting from detachment of tubular epithelial lining; G3 (rats treated with venom and saline): panel E = hyalinization of both cortical segments and glomeruli; panel F, medullary segments showing few alterations. G4 (rats treated with venom and antivenom) and G5 (rats treated with antivenom): all panels show tissue hyalinization leading to poorly defined cell limits; panels G and I = hemorrhagic foci and glomerular microaneurysms (arrows); panels H and J = medullary sections showing the flattened epithelial lining of tubular segments with a distended luminal space. A description of the alterations is provided in the text.



border in the proximal tubules, and luminal widening with cellular casts in the proximal and distal tubules and collecting ducts (Fig. 5C,D). Groups G3, G4, and G5 had a general hyaline appearance in the nephron segments located in the renal cortex that obscured visualization

of their cellular constituents (Fig. 5E,G,I). The renal medulla showed less damage in envenomed rats treated with physiological saline solution (G3) (Fig. 5F), whereas greater damage was seen in envenomed rats treated with antivenom (G4) and in rats treated with antivenom

alone (G5) (Fig. 5H,J) compared to G3 (Fig. 5F); similar renal alterations in response to antivenom have been described elsewhere (Oliveira *et al.* 2021), but the reasons remain to be investigated. All the changes observed here are characteristic of renal disease (Cardoso *et al.* 1993; Haraldsson *et al.* 2008).

A comparative analysis of the frequency of histological alterations in groups G1-G5 yielded the following scores: G2 = a score of 5-6 representing a very high-frequency of alterations; G3 = 2-3, a relatively low-to-moderate frequency of alterations; G4 and G5 = 4 indicating a high frequency, and G1 = 0-1 indicating few or no alterations (most of the alterations were attributable to technical artifacts).

The results of this study allow us to address two specific issues: (a) The early onset of AKI: Pinho *et al.* (2005) have shown that approximately two-thirds of patients who develop AKI following envenomation by *C. d. terrificus* do so within 24 h of being bitten and that the mean time between being bitten and receiving antivenom (among patients with and without AKI) was 3 h (range: 1-48 h). Risk factors for the development of AKI included age (greater for children <12 years old), the time until antivenom administration (the greater the interval, the greater the risk), and CK >2000 IU/mL; a diuresis >90 mL/h was considered a protective factor. The 2 h time frame used to assess AKI and for antivenom administration in the present study was based on the mean interval until antivenom administration noted by Pinho *et al.* (2005). (b) The parameters used to assess AKI: Parameters commonly used to analyze AKI induced by *C. d. terrificus* include urinary output (diuresis) and glomerular filtration rate (based on creatinine clearance), fractional excretion of Na⁺ and K⁺, serum creatine kinase (CK), serum and urinary creatinine and proteinuria, although not all of these have the same usefulness (sensitivity or predictive value); additional ancillary parameters include hemoglobin, hematocrit, and platelet counts. The choice of parameters used here (creatinine, urea, and proteinuria) as markers for AKI was based on previous reports in the literature and also because these can be easily measured in serum and urine, samples of which can be obtained with relative ease in the clinical setting.

Conclusion

The findings of this study show that *C. d. terrificus* venom (6 mg kg⁻¹, i.p.) induced AKI in rats

within 2 h, with an increase in blood and renal urea, creatinine, and GSH concentrations, as well as enhanced blood GPx activity and renal protein concentrations. These parameters, together with histological analysis, could be potentially useful biomarkers for assessing the severity of AKI. Antivenom was effective in attenuating the increase in blood urea, in normalizing the proteinuria, and in inactivating antioxidant defense through CAT activity, but did not protect against lipid peroxidation.

Acknowledgments

The authors thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/Prosuc (Finance code 001), Probic/Uniso, Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, grant no. 01.10.0659.00), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant no. 2016/12599-2) for fellowships. This work was supported by FAPESP (grant nos. 2015/01420-9 and 2016/12599-2).

Conflict of interest: The authors have no conflicts of interest related to this work.

Authors' contributions: EHY, MMJD, ICFO, and JAMF did the experiments under supervision by YOF; JCC milked the snakes and provided the venom; DG was responsible for interpreting the oxidative stress data; MACH was responsible for the histological analyses. VMHY and YOF designed the study, and YOF, DG, MACH, and SH wrote the manuscript.

References

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105:121-126.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2008. Toxicological Profile for Phenol. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. [Accessed July 2, 2020]. Available from: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts115.pdf>
- Albuquerque PL, Jacinto CN, Silva Junior GB, Lima JB, Veras MS, Daher EF. 2013. Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 55(5):295-301.

Albuquerque PLMM, Paiva JHHGL, Martins AMC, Meneses GC, da Silva GB, Buckley

N, Daher EF. 2020. Clinical assessment and pathophysiology of *Bothrops* venom-related acute kidney injury: a scoping review. Journal of Venomous Animals and their Toxins Including Tropical Diseases. 26:e20190076.

Alegre VS, Barone JM, Yamasaki SC, Zambotti-Villela L, Silveira PF. 2010. Lipoic acid effects on renal function, aminopeptidase activities and oxidative stress in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. Toxicon. 56(3):402-410.

Al Shoyaib A, Archie SR, Karamyan VT. 2019. Intraperitoneal route of drug administration: should it be used in experimental animal studies? Pharmaceutical Research. 37(1):12.

The missing reference Amaral et al. (1997) (cited at the bottom of the left-hand column of page 20 of the main text) into the reference list, placing it before this work by Amora et al. (2008). DN, Martins AMC, Roesner N, Senter R, Ostrowsky T, Weinberg JM, Monteiro HSA. 2008. Mitochondrial dysfunction induced by pancreatic and crotalic (*Crotalus durissus terrificus*) phospholipases A₂ on rabbit proximal tubules suspensions. Toxicon. 52(8):852-857.

Amorim MF, Mello RF. 1954. Intermediate nephrosis from snake poisoning in man. American Journal of Pathology. 30(3):479-499.

Azevedo-Marques MM, Cupo P, Coimbra TM, Hering SE, Rossi MA, Laure CJ. 1985. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. Toxicon. 23(4):631-636.

Azevedo-Marques MM, Hering SE, Cupo P. 1987. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. Toxicon. 25(11):1163-1168.

Bahrami S, Shahriari A, Tavalla M, Azadmansh S, Hamidinejat H. 2016. Blood levels of oxidant/antioxidant parameters in rats infected with *Toxoplasma gondii*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016:8045969.

Ballatori N, Krance SM, Marchan R, Hammond CL. 2009. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and

pathophysiology. Molecular Aspects of Medicine. 30(1-2):13-28.

Barone JM, Frezzatti R, Silveira PF. 2014. Effects of N-acetyl-L-cysteine on redox status and markers of renal function in mice inoculated with *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms. Toxicon. 79:1-10.

Barral-Netto M, von Sohsten RL. 1991. Serum kinetics of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice: evidence for a rapid clearance. Toxicon. 29(4-5):527-531.

Baudou FG, Litwin S, Lanari LC, Laskowicz RD, Damin CF, Chippaux JP, de Roodt AR. 2017. Antivenom against *Crotalus durissus terrificus* venom: Immunochemical reactivity and experimental neutralizing capacity. Toxicon. 140:11-17.

Berger M, Vieira MAR, Guimarães JA. 2012. Acute kidney injury induced by snake and arthropod venoms. In: Polenakovic M, editor. Renal failure - The facts. London: InTech Open. p. 157-186. [Accessed April 30, 2022]; Available from: <https://www.intechopen.com/books/renal-failure-the-facts/acute-kidney-injury-induced-by-snake-and-arthropod-venoms>.

Boer-Lima PA, Gontijo JA, Cruz-Höfling MA. 1999. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 61(5):698-706.

Boer-Lima PA, Gontijo JA, Cruz-Höfling MA. 2002. *Bothrops moojeni* snake venom-induced glomeruli changes in rat. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 67(2):217-222.

Bucaretychi F, Herrera SRF, Hyslop S, Baracat ECE, Vieira RJ. 2002. Snakebites by *Crotalus durissus* ssp. in children in Campinas, São Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 44(3):133-138.

Cardoso JLC, Fan HW, França FOS, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, Avila A, Sano-Martins IS, Tomy SC, Santoro M, et al. 1993. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. Quarterly Journal of Medicine. 86(5):315-325.

- Cerdá J, Lameire N, Eggers P, Pannu N, Uchino S, Wang H, Bagga A, Levin A. 1988. Epidemiology of acute kidney injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 3(3):881-886.
- Chen J, Bhandar B, Kavdia M. 2015. Interaction of ROS and RNS with GSH and GSH/GPX systems. *FASEB Journal*. 29(Supplement):636.7 (Abstract).
- Cruz AH, Mendonça RZ, Petricevich VL. 2005. *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophages. *Mediators of Inflammation*. 2005(6):349-359.
- Cura JE, Blanzaco DP, Brisson CB, Cura MA, Cabrol R, Larrateguy L, Mendez C, Sechi JC, Silveira JS, Theiller E, *et al.* 2002. Phase I and pharmacokinetic study of crotoxin (cytotoxic PLA₂, NSC-624244) in patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research*. 8:1033-1041.
- de Silva HA, Ryan NM, de Silva HJ. 2016. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. *British Journal of Clinical Pharmacology* 81(3):446-452.
- Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82(1):70-77.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 43(1):61-68.
- Frare BT, Silva Resende YK, Dornelas BC, Jorge MT, Souza Ricarte VA, Alves LM, Izidoro LFM. 2019. Clinical, laboratory, and therapeutic aspects of *Crotalus durissus* (South American rattlesnake) victims: a literature review. *BioMedical Research International*. 2019:1345923.
- Frezzatti R, Silveira PF. 2011. Allopurinol reduces the lethality associated with acute renal failure induced by *Crotalus durissus terrificus* snake. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 5(9):e1312.
- Gois PHF, Martines MS, Ferreira D, Volpini R, Canale D, Málaque C, Crajoinas R, Girardi ACC, Shimizu MHM, Seguro AC. 2017. Allopurinol attenuates acute kidney injury following *Bothrops jararaca* envenomation. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 11(11):e0006024.
- Gonçalves R, Vargas LS, Lara MVS, Güllich A, Mandredini V, Ponce-Soto L, Marangoni S, Dal Belo CA, Mello-Carpes PB. 2014. Intrahippocampal infusion of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* alters plasma and brain biochemical parameters. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11:11438-11449.
- Gowda S, Desai PB, Kulkarni SS, Hull VV, Math AAK, Vernekar SN. 2010. Markers of renal function tests. *North American Journal of Medical Science*. 2(4):170-173.
- Greka A, Mundel P. 2012. Cell biology and pathology of podocytes. *Annual Review of Physiology*. 74:299-323.
- Guarnieri M. 2016. Considering the risks and safety of intraperitoneal injections. *Laboratory Animals* 45:131.
- Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. 2017. Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers*. 3:17063.
- Hadler WA, Vital Brazil O. 1966. Pharmacology of crystalline crotoxin. IV. Nephrotoxicity. *Memórias do Instituto Butantan*. 33(3):1001-1008.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. Antioxidant defense enzymes: the glutathione peroxidase family. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds.) *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford: Clarendon Press. p. 140-146.
- Hampel M, Blasco J, Martín Díaz ML. 2016. Biomarkers and effects. In: Blasco J, Chapman PM, Campana O, Hampel M (eds.) *Marine ecotoxicology*. New York: Academic Press. p. 121-165.
- Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. 2008. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiological Reviews*. 88(2):451-487.
- Harris JB, Scott-Davey T. 2013. Secreted phospholipases A₂ of snake venoms: effects

on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A₂ in disorders of the CNS and their uses in industry. *Toxins*. 5(12):2533-2571.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. 2010. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*. 8(6):e1000412.

Kini RM. 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*. 42(8):827-840.

León G, Herrera M, Segura Á, Villalta M, Vargas M, Gutiérrez JM. 2013. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. *Toxicon*. 76:63-76.

Linardi A, Rocha e Silva TAA, Miyabara EH, Franco-Penteado CF, Cardoso KC, Boer PA, Moriscot AS, Gontijo JAR, Joazeiro PP, Colares-Buzato CB, *et al.* 2011. Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: expression and activity of Na⁺/K⁺ ATPase. *Biochimica Biophysica Acta - General Subjects*. 1810(9):895-906.

Lu SC. 2013. Glutathione synthesis. *Biochimica Biophysica Acta*. 1830(5):3143-3153.

Lucchi L, Bergamini S, Iannone A, Perrone S, Stipo L, Olmeda F, Caruso F, Tomasi A, Albertazzi A. 2005. Erythrocyte susceptibility to oxidative stress in chronic renal failure patients under different substitutive treatments. *Artificial Organs*. 29(1):67-72.

Martins AMC, Toyama MH, Havt A, Novello JC, Marangoni S, Fonteles MC, Monteiro HS. 2002. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. *Toxicon*. 40(8):1165-1171.

Martins AMC, Lima AAM, Toyama MH, Marangoni S, Fonteles MC, Monteiro HSA. 2003. Renal effects of supernatant from macrophages activated by *Crotalus durissus cascavella* venom: the role of phospholipase A₂ and cyclooxygenase. *Pharmacology and Toxicology*. 92(1):14-20.

Medeiros JM, Oliveira IS, Ferreira IG, Alexan-

dre-Silva GM, Cerni FA, Zottich U, Pucca MB. 2020. Fatal rattlesnake envenomation in northernmost Brazilian Amazon: a case report and literature overview. *Reports*. 3(2):9.

Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A. 2007. Acute kidney injury network. Report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical Care*. 11(2):R31.

Mendonça-da-Silva I, Tavares AM, Sachett J, Sardinha JF, Zapparolli L, Santos MFG, Lacerda M, Monteiro WM. 2017. Safety and efficacy of a freeze-dried trivalent antivenom for snakebites in the Brazilian Amazon: An open randomized controlled phase IIb clinical trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 11(11):e0006068.

Mohamed F, Endre Z, Jayamanne S, Pianta T, Peake P, Palangasinghe C. 2015. Mechanisms underlying early rapid increases in creatinine in paraquat poisoning. *PLoS One*. 10(3):e0122357.

Monteiro HSA, da Silva IMSC, Martins AMC, Fonteles MC. 2001. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34(10):1347-1352.

Morton DB, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, Inglis I, James R, Page C, Sharman I, *et al.* 2001. Joint Working Group on Refinement. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVA/AVMA/FRAME/RSPCA/UFPAW Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. *Laboratory Animals*. 35(1):1-41.

Mylonas C, Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*. 13(3):295-309.

National Human Genome Research Institute. 2004. Rat genome compared with human, mouse. The Wellcome Trust. January 4, 2004. [Accessed July 2, 2020]. Available from: http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020720.htm.

National Research Council of the National Academies. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Washington DC: National Academies Press. [accessed September 14, 2019]. Available from: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-Care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>

Negrin A, Battocletti MA, Juanena C, Morais V. 2021. Reports of doses administered and adverse reactions to snake antivenom used in Uruguay in 2018. *Frontiers in Toxicology*. 3:690964

Nogueira RMB, Sakate M. 2006. Clinical and hematological alterations in dogs during experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom and treated with antiophidic serum. *Journal of Venomous Animals and their Toxins including Tropical Diseases*. 12(2):285-296.

Nogueira RMB, Sakate M, Sangiorgio F, Laposy CB, Melero M. 2007. Experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom in dogs treated with antiophidic serum – part I: clinical evaluation, hematology and myelogram. *Journal of Venomous Animals and their Toxins including Tropical Diseases*. 13(4):800-810.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95(2):351-358.

O'Leary MA, Kornhauser RS, Hodgson WC, Isbister GK. 2009. An examination of the activity of expired and mistreated commercial Australian antivenoms. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 103(9):937-942.

The missing reference to Oliveira et al. (2021) (cited in the first paragraph of page 25 of the proofs) here in the list, before Paglia: Oliveira ICF, Yoshida EH, Dini MMJ, Paschoal ABO, Cogo JC, da Cruz-Höfling MA, Hyslop S, Oshima-Franco Y. 2021. Evaluation of protection by caffeic acid, chlorogenic acid, quercetin and tannic acid against the in vitro neurotoxicity and in vivo lethality of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom. *Toxins*. 13(11):801. DE, Valentine WN. 1967. Study on the quantitative and qualitative char-

acterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 70(1):158-169.

Pinho FMO, Zanetta DMT, Burdmann EA. 2005. Acute renal failure after *Crotalus durissus* snakebite: a prospective survey on 100 patients. *Kidney International*. 67(2):659-667.

Pinho FMO, Yu L, Burdmann EA. 2008. Snakebite-induced kidney injury in Latin America. *Seminars in Nephrology*. 28(4):354-362.

Rodrigues Sgrignolli L, Florido Mendes GE, Carlos CP, Burdmann EA. 2011. Acute kidney injury caused by *Bothrops snake* venom. *Nephron Clinical Practice*. 119(2):c131-136; discussion c137.

Rosenfeld G. 1971. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Bücherl W, Buckley EE, Deulofeu V, editors. *Venomous animals and their venoms*. Vol. 2. New York: Academic Press. p. 345-384.

Sampaio SC, Hyslop S, Fontes MR, Prado-Franceschi J, Zambelli VO, Magro AJ, Brigatte P, Gutierrez VP, Cury Y. 2010. Crotoxin: novel activities for a classic α -neurotoxin. *Toxicon*. 55(6):1045-1060.

Sánchez EE, Migl C, Suntravat M, Rodriguez-Acosta A, Galan JA, Salazar E. 2019. The neutralization efficacy of expired polyvalent antivenoms: An alternative option. *Toxicon*. 168:32-39.

Sangiorgio F, Sakate M, Nogueira RMB, Tostes RA. 2008. Histopathological evaluation in experimental envenomation of dogs with *Crotalus durissus terrificus* venom. *Journal of Venomous Animals and their Toxins including Tropical Diseases*. 14(1):83-87.

Sanhajariya S, Duffull SB, Isbister GK. 2018. Pharmacokinetics of snake venom. *Toxins*. 10(2):E73.

Sano-Martins IS, Santoro ML, Castro SC, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RD. 1997. Platelet aggregation in patients bitten by the Brazilian snake *Bothrops jararaca*. *Thrombosis Research*. 87(2):183-195.

Sano-Martins IS, Tomy SC, Campolina D, Dias

- MB, de Castro SCB, de Sousa-e-Silva MCC, Amaral CFS, Rezende NA, Kamiguti AS, Warrell DA, *et al.* 2001. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil. Quarterly Journal of Medicine. 94(10):551-559.
- Santoro ML, Sano-Martins IS, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RD, Warrell DA. 2008. Butantan Institute Antivenom Study Group. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. Toxicon. 51(8):1440-1448.
- Santosh MS, Sundaram MS, Sunitha K, Kemparaju K, Girish KS. 2013. Viper venom-induced oxidative stress and activation of inflammatory cytokines: a therapeutic approach for overlooked issues of snakebite management. Inflammation Research. 62(7):721-731.
- Sato N. 2012. Blood urea nitrogen as an integrated biomarker for hospitalized heart failure. Circulation Journal. 76(10):2329-2330.
- Silva HA, Ryan NM, de Silva HJ. 2015. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. British Journal of Clinical Pharmacology. 81(3):446-452.
- Silva JG, Soley BS, Gris V, Pires ARA, Caderia SMSC, Eler GJ, Hermoso APM, Bracht A, Dalsenter PR, Acco A. 2011. Effects of the *Crotalus durissus terrificus* snake venom on hepatic metabolism and oxidative stress. Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology. 25(3):195-203.
- Silveira PVP, Nishioka SA. 1992. South American rattlesnake bite in a Brazilian teaching hospital. Clinical and epidemiological study of 87 cases with analysis of factors predictive of renal failure. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 86(5):562-564.
- SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação [Brazilian Information System for Notifiable Diseases.] 2019. [Accessed September 4, 2019]; Available at <http://www.portalsinan.saude.gov.br>.
- Sitprija V. 2006. Snakebite nephropathy. Nephrology (Carlton). 11(5):442-448.
- Sitprija V. 2008. Animal toxins and the kidney. Nature Clinical Practice Nephrology. 4(11):616-627.
- Sitprija V, Sitprija S. 2016. Animal toxins and renal ion transport: Another dimension in tropical nephrology. Nephrology (Carlton). 21(5):355-362.
- Sousa-e-Silva MC, Tomy SC, Ravares FL, Navajas L, Larsson MH, Lucas SR, Kogika MM, Sano-Martins IS. 2003. Hematological, hemostatic and clinical chemistry disturbances induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom in dogs. Human and Experimental Toxicology. 22(9):491-500.
- Spiteller P, Kern W, Reiner J, Spiteller G. 2001. Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. Biochimica Biophysica Acta. 1531(3):188-208.
- Tabet F, Touyz RM. 2007. Reactive oxygen species, oxidative stress, and vascular biology in hypertension. In: Lip G, Hall J, editors. Comprehensive hypertension. St. Louis (MO): Mosby Elsevier. p. 337-347.
- Tan KY, Liew ST, Tan QY, Abdul-Rahman FN, Azmi NI, Sim SM, Tan NH, Khomvilai S, Sitprija V, Tan CH. 2019. Evaluating the physicochemical properties and efficacy of recently expired and aged antivenom products from Thailand and Taiwan. Toxicon. 160:55-58.
- Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, Chacur M, Cury Y. 2003. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. Toxicon. 42(8):947-962.
- Thongprayoon C, Cheungpasitporn W, Kashani K. 2016. Serum creatinine level, a surrogate of muscle mass, predicts mortality in critically ill patients. Journal of Thoracic Disease. 8(5):E305-E311.
- Toyama MH, Costa CR, Belchor MN, Novaes DP, de Oliveira MA, le R, Gaeta HH, Toyama DO. 2019. Edema induced by sPLA₂ from *Crotalus durissus terrificus* involves PLC and PKC signaling, activation of cPLA₂, and oxidative stress. In: Kumar V, Salgado AA, Athari SS, editors. Inflammation in the 21st Century. London: IntechOpen. Available from: <https://www>.

intechopen.com/chapters/65249 doi: 10.5772/intechopen.80848

Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. 2008. Biomarkers of acute kidney injury. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 48:463-493.

Warrell DA. 2004. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. In: Campbell JA, Lamar WW, editors. *Venomous reptiles of the Western hemisphere*. Vol. 2. Ithaca (NY): Comstock Publishing Associates/Cornell University Press. p. 709-761.

Weydert CJ, Cullen JJ. 2010. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*. 5(1):51-66.

Yamasaki SC, Villarroel JS, Barone JM, Zambotti-Villela L, Silveira PF. 2008. Aminopeptidase activities, oxidative stress and renal function in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. *Toxicon*. 52(3):445-454.

Yoshida EH, Dini MMJ, Campanholi J, Cogo JC, Grotto D, Hyslop S, Hanai-Yoshida VM, Oshima-Franco Y. 2020. Acute kidney injury caused by the intraperitoneal injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. *Natural Products Research*. 34(17):2533-2538.

Zychar BC, Castro NC Jr, Marcelino JR, Gonçalves LR. 2008. Phenol used as a preservative in *Bothrops* antivenom induces impairment in leukocyte-endothelial interactions. *Toxicon*. 51(7):1151-1157.

Relationship between the toxicity of raw *Annona muricata* leaves extract and 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) with histopathological changes in *wistar* rats. Relación entre la toxicidad del extracto de hojas crudas de *Annona muricata* y el 7,12-dimetilbenz antraceno (DMBA) con cambios histopatológicos en ratas *Wistar*.

Splendor, Maria Clara¹; Souza-Kaneshima, Alice Maria de²; Becker, Tania Cristina Alexandrino^{2,5}; Mello, João Carlos Palazzo de^{1,3}; Souza, Paola da Costa⁴; Pedroso, Raissa Bocchi⁵; Pelegrini, Brenda Barroso⁵; Kaneshima, Edilson Nobuyoshi^{*1,4}

¹Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil. ²Department of Basic Health Sciences, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil. ³Department of Pharmacy, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil. ⁴Department of Medicine, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil. ⁵Post-Graduate Program in Health Sciences, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil.

*enkaneshima@uem.br

Received: January 11, 2022

Accepted: April 30, 2022.

EDITOR: RICARDO ANTONIO FERNÁNDEZ

Abstract. Aims: To identify the histopathological alterations in organs of *Wistar* rats to evaluate toxic effects of use of *Annona muricata* Raw Leaf Extract (AMRLE) alone or in association with DMBA. Settings and Design: Sixty female *Wistar* rats were used, separated into groups and treated with a single dose of 65 mg/kg of DMBA and/or with 50; 100 and 200 mg/kg of AMRLE. Hematoxylin-Eosin (HE) and 1% methylene blue stains were used in the histopathological analysis and quantification of Aberrant Crypts (ACs) and Aberrant Crypt Focus (ACF). Fischer and Kruskal Wallis tests were used in the statistical analysis. **Results:** The administration of 65 mg/kg of DMBA and/or 50, 100 and 200 mg/kg of AMRLE did not influence weight development. Some histopathological alterations (hepatic steatosis; inflammatory foci in the liver, kidney and lung; pulmonary lymphoid hyperplasia, ectasia and hyperplasia in mammary gland epithelium) and the development of ACs and ACF in the intestinal colon were observed in all groups, except in the group negative control, with no statistical difference between analysed groups. **Conclusions:** Histopathological alterations and the formation of ACs and ACF did not show a statistically significant difference between the groups analysed. However, although AMRLE has antioxidant effects due to the presence of phenolic components, there was still the formation of some pathological processes that may be related to the isolated toxic action of DMBA and/or associated with other components of AMRLE, since these changes were not seen in the negative control group.

Keywords: *Annona muricata*; Graviola; DMBA; Toxicity.

Resumen. Objetivos: Identificar las alteraciones histopatológicas en órganos de ratas *Wistar* para evaluar los efectos tóxicos del uso del Extracto de Hoja Cruda de *Annona muricata* (AMRLE) solo o en asociación con DMBA. **Configuración y diseño:** Se utilizaron sesenta ratas hembras *Wistar*, se separaron en grupos y se trataron con una dosis única de 65 mg/kg de DMBA y/o con 50, 100 y 200 mg/kg de AMRLE. Se utilizaron tinciones de hematoxilina-eosina (HE) y azul de metileno al 1% en el análisis histopatológico y la cuantificación de criptas aberrantes (CA) y focus de criptas aberrantes (FCA). En el análisis estadístico se utilizaron las pruebas de Fischer y Kruskal Wallis. **Resultados:** La administración de 65 mg/kg de DMBA y/o 50, 100 y 200 mg/kg de AMRLE no influyó en el desarrollo del peso. Se observaron algunas alteraciones histopatológicas (esteatosis hepática; focus inflamatorios en el hígado, riñón y pulmón; hiperplasia, ectasia en epitelio de la glándula mamaria e hiperplasia linfoide pulmonar) y el desarrollo de CA y FCA en el colon intestinal en todos los grupos, excepto en el grupo control negativo, sin diferencias estadísticas entre los grupos analizados. **Conclusiones:** Las alteraciones histopatológicas y la formación de CA y FCA no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados. Sin embargo, aunque AMRLE tiene efectos antioxidantes debido a la presencia de componentes fenólicos, aún existe la formación de algunos procesos patológicos que pueden estar relacionados con la acción tóxica aislada del DMBA y/o asociados con otros componentes de AMRLE, ya que estos cambios no fueron observados en el grupo control negativo.

Palabras clave: *Annona muricata*; Graviola; DMBA; Toxicidad.

Introduction

Plant extracts are sources of phytochemical substances (Ramos 2008). The *Annona muricata* tree is commonly known as soursop, be-

ing widely used in folk medicine and some studies report that extracts from seeds, branches, roots, stems and fruits have several biological

activities (Heinrich *et al.* 1992; Vieira *et al.* 2010). Extracts from different parts of the soursop tree were studied and 212 phytochemical components were identified, mainly acetogenins, alkaloids, flavonoids, sterols and others (Rady *et al.* 2018). In 2015, George *et al.* suggest that the components of the *A. muricata* extract have powerful antioxidant properties, being capable of scavenging significant free radicals, with a strong correlation with the phenolic components. The extract from the leaves of *A. muricata* has antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, apoptosis-inducing and cytotoxic activity properties (Roslida *et al.* 2010; Abdulah *et al.* 2017).

In 2018, Rady *et al.* reported that there is no correlation between the consumption of soursop and/or infusions of some parts of the soursop with neurotoxic effects. Arthur *et al.* (2011) reported that doses higher than 5 g/kg of aqueous extract may be related to toxicity in laboratory animals' organs. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) are environmental pollutants, and 7, 12 - dimethylbenzanthracene (DMBA) is a PAH that undergoes metabolic activation, producing free radicals and reactive oxygen species capable of inducing deleterious effects and causing oxidative damage in various organs and tissue, being widely used in experimental models using laboratory animals (Macejova and Brtko 2001; Choi 2008).

The objective of this work was to identify the histopathological alterations in organs of *Wistar* rats to evaluate the toxic effects of the use of Raw Extract of *Annona muricata* Leaves alone or in association with DMBA.

Methods

- Obtaining the Raw Extract of *Annona muricata* Leaves (AMRLE).

The leaves of the soursop tree were collected in Maringá-PR (Brazil) and botanical identification was performed by Herbarium of Maringá State University (HMSU) with the exsiccate deposited under number 31314. The AMRLE was obtained as described by Barbosa and Mello (2004), where about 30 kg of *A. muricata* leaves were crushed and submitted to extraction by turbolysis in Ultra-Turrax® (UTC-115KT) for 15 minutes, with an interval of 15 minutes repeated 3 times. 50% ethanol was used as extracting liquid and the material obtained during the extraction process was subjected to filtration and lyophilization for 24 hours, placed in a plastic bottle and stored in a freezer (-20°C).

- Quantification of total phenols.

The content of total phenols present in AMRLE was determined using the phosphomolybdotungstic reagent by the Folin-Ciocalteu method. The samples and the previously validated standard curve were read in a spectrophotometer ($\lambda = 760 \text{ nm}$) (BRASIL Anvisa, 2010).

- Animals and experimental design.

Sixty female *Wistar* rats aged 55 days were used, provided by the Maringá State University's Central Bioterium and kept in an experimental bioterium. The animals were weighed and randomly divided into 6 groups of 10 animals: Group 1 (G1) – Experimental group treated with 50 mg/kg of AMRLE + DMBA (65 mg/kg) Group 2 (G2) – Experimental group treated with 100 mg/kg of AMRLE + DMBA (65 mg/kg) Group 3 (G3) – Experimental group treated with 200 mg/kg of AMRLE + DMBA (65 mg/kg) Group 4 (G4) – Group treated only with 200 mg/kg of AMRLE Group 5 (G5) – DMBA treated group (65 mg/kg) Group 6 (G6) – Negative control group (without AMRLE/DMBA)

The animals were housed in polypropylene boxes under standardized conditions of temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$; $50 \pm 10\%$ relative humidity and 12h day-night cycle with free access to feed and water. On the first day of the experiment, animals from G1; G2; G3 and G5 groups received 65 mg/kg of DMBA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri/USA) diluted in 1 mL of corn oil orogastrically (gavage) in a single dose. For 20 weeks, all animals in groups G1; G2; G3 and G4 received 1mL of AMRLE at concentrations of 50 or 100 or 200 mg/kg which was also administered by gavage. While animals in groups G5 and G6 were administered 1 mL of sterile water. At the end of the 20th week, all animals were euthanized using a thiopental solution at dose of 30 mg/kg, administered intravenously. After euthanasia, part of the breast tissue and lung, liver and kidney fragments were surgically removed and fixed in 10% formalin solution and sent for histological processing. Part of the large intestine was also removed and stored in 70% ethanol until the quantification of aberrant crypts (AC) and Aberrant Crypt Focus (ACF).

- Weight development assessment.

All animals were weighed on the first day of the experiment, and later on each day for 20 weeks.

- Histopathological Analysis.

Fragments of breast tissue, lungs, liver and kidneys were dehydrated in alcoholic solutions with increasing degrees, cleared in xylene and embedded in paraffin. The paraffin blocks were sectioned in a semi-automatic microtome, obtaining histological sections of 4 - 5 μ , which were used to make permanent slides stained with Hematoxylin-Eosin (HE). The reading of the slides was performed using an optical microscope with a camera (Opticam Microscopy Technology – Lopt 14003) with magnification of 400X. Histopathological changes were identified and noted for the presence or absence of animals belonging to each group.

- Quantification of Aberrant Crypts (ACs) and Aberrant Crypt Focus (ACF).

The colonic mucosa was stained with 1% methylene blue as described by Sousa *et al.* (2010). The ACs and FCAs were identified and quantified according to the criteria established by Bird (1987). After this procedure, the intestinal tissue was also submitted to histopathological analysis, where ACF were classified as hyperplasia or dysplasia according to Yoshimi *et al.* (2004).

- Statistical analysis.

Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). And the statistical analysis was evaluated by the Fischer and Kruskal Wallis tests. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

- Ethical aspects.

All experiments involving animals were done in conformity with the worldwide accepted ethical guidelines for animal experimentation and approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Maringá State University (Protocol n° 4816181115).

Results

- Chemical composition.

Approximately 1 kg of AMRLE was obtained, corresponding to approximately 3% of total weight of the leaves. The number of total phenols was determined to be 274.4 ± 1.62 mg/g of AMRLE.

- Effect of DMBA and/or AMRLE on weight development.

Apparently, administration of 65 mg/kg of DMBA and/or 50, 100 and 200 mg/kg of

AMRLE did not influence the development of the treated animals, since weight gain showed a progressive increase in the animals' body mass, and there was no statistically significant change between the analyzed groups (*Table 1*).

Table 1. Demonstration of the weight evolution of Wistar rats belonging to experimental groups G1 to G6 during a period of 20 weeks.

Weight evolution	Experimental groups					
	G 1 (n=10)	G 2 (n=10)	G 3 (n=10)	G 4 (n=10)	G 5 (n=10)	G 6 (n=10)
Initial body mass (week 1)	149.50 ± 25.18	142.95 ± 24.93	140.36 ± 28.13	142.33 ± 24.03	143.11 ± 23.54	140.30 ± 26.59
Final body mass (week 20)	296.16 ± 22.34	291.50 ± 21.16	287.16 ± 23.47	261.33 ± 23.93	277.55 ± 21.17	318.20 ± 22.60
Weight gain within twenty weeks	146.66 ± 33.45	148.55 ± 29.57	146.80 ± 30.69	119.00 ± 36.79	134.44 ± 33.88	177.90 ± 25.32

⁽¹⁾Values expressed in grams, corresponding to the mean and standard deviation of the initial and final body mass, as well as the weight gain. Comparative analysis between analysed groups using Fisher Test. p value > 0.05

- Histopathological analysis to assess the toxic effects of DMBA and/or AMRLE.

The histopathological analysis identified some pathological alterations, such as: hepatic steatosis; inflammatory foci in the liver, kidney and lung; pulmonary lymphoid hyperplasia, ectasia and hyperplasia mammary glandular epithelium (*Figure 1*).

Table 2 shows that many animals in G1, G2, G3 and G5 groups showed histopathological changes in liver, kidney, lung and breast tissue. These histopathological changes may be related to the isolated toxic action of DMBA and/or associated with AMRLE, since these changes were not seen in animals belonging to group 6 (negative control - without DMBA/AMRLE).

- Quantification of Aberrant Crypts (CA) and Aberrant Crypt Focus (ACF) and histopathological analysis.

In *Figure 2A*, ACF present in the large intestine and stained with methylene blue can be identified. The quantification results are shown in *Table 3*, and in the animals in group G6 (negative control without DMBA and/or AMRLE) there was no development of AC or ACF. However, the mean values of the number of AC and ACF present both in the proximal and distal regions of the colon of animals in G1, G2, G4 and G5 groups

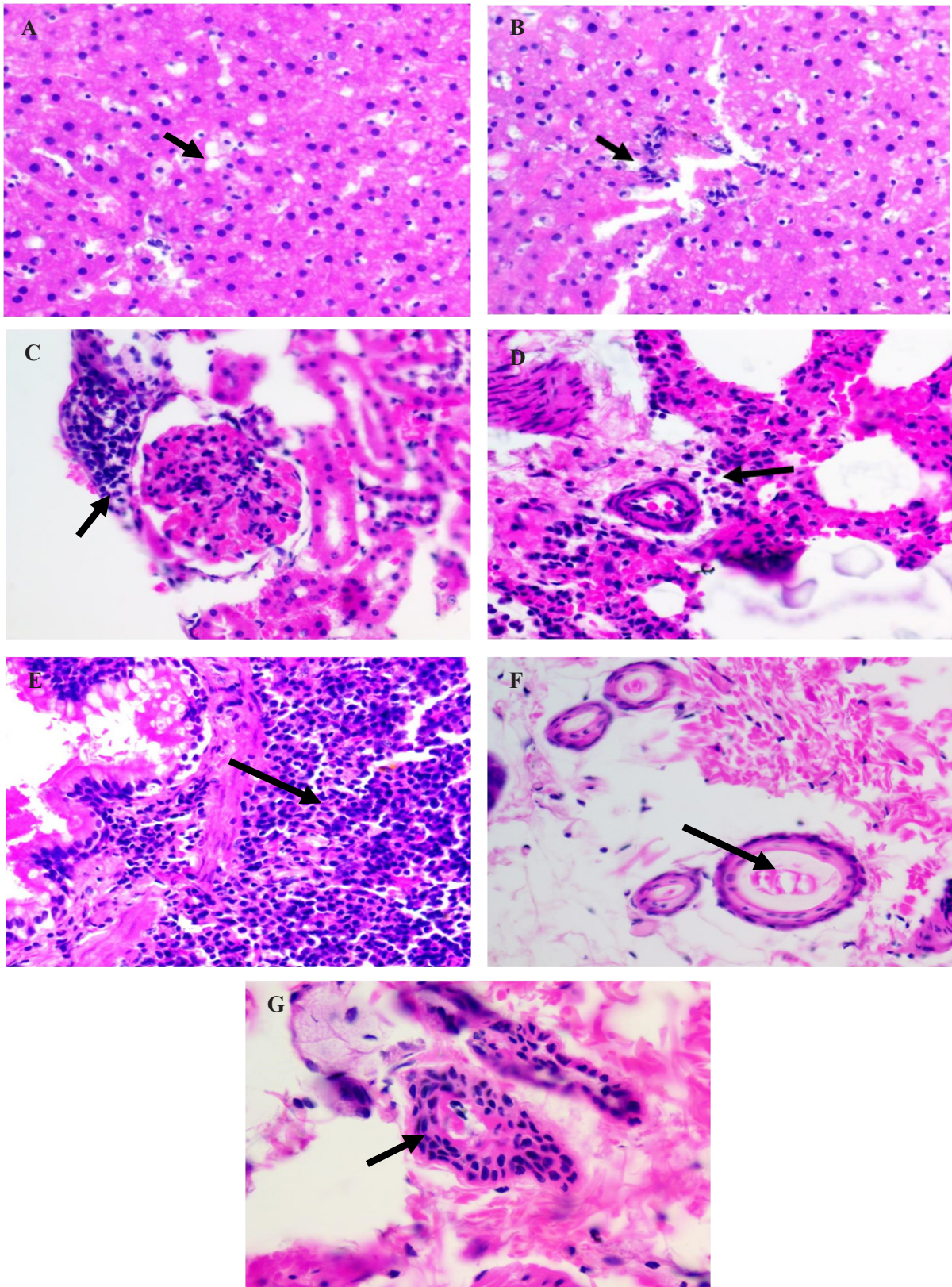


Figure 1: Histopathological alterations in organs or tissues of Wistar rats resulting from the performance of DBMA and/or AMRLE 400X magnification. A) hepatic steatosis; B - D) inflammatory foci in the hepatic, renal and pulmonary parenchyma; E) bronchial lymphoid hyperplasia; F) ectasia ductal; G) mammary cell hyperplasia.

Table 2. Demonstration of the weight evolution of Wistar rats belonging to experimental groups G1 to G6 during a period of 20 weeks.

Experimental Groups						
Alterations	G 1 (n=10)	G 2 (n=10)	G 3 (n=10)	G 4 (n=10)	G 5 (n=10)	G 6 (n=10)
Hepatic steatosis (P > 0.05)						
Absent	80%(8)	60%(6)	40%(4)	100%(10)	80%(8)	100%(10)
Presence	20%(2)	40%(4)	60%(6)	0%(0)	20%(2)	0%(0)
Hepatic inflammatory focus (P > 0.05)						
Absent	0%(0)	0%(0)	0%(0)	0%(0)	20%(2)	100%(10)
< 1 focus/field	100%(10)	100%(10)	100%(10)	100%(10)	80%(8)	0%(0)
Renal inflammatory focus (P > 0.05)						
Absent	20%(2)	30%(3)	50%(5)	70%(7)	60%(6)	100%(10)
< 1 focus/field	80%(8)	70%(7)	50%(5)	30%(3)	40%(4)	0%(0)
Pulmonary inflammatory focus (P > 0.05)						
Absent	40%(4)	70%(7)	30%(3)	100%(10)	80%(8)	100%(10)
< 1 focus/field	60%(6)	30%(3)	70%(7)	0%(0)	20%(2)	0%(0)
Pulmonary lymphoid hyperplasia (P > 0.05)						
Absent	60%(6)	40%(4)	30%(3)	100%(10)	50%(5)	100%(10)
Presence	40%(4)	60%(6)	70%(7)	0%(0)	50%(5)	0%(0)
Breast ectasia (P > 0.05)						
Absent	0%(0)	20%(2)	40%(4)	100%(10)	60%(6)	100%(10)
Presence	100%(10)	80%(8)	60%(6)	0%(0)	40%(4)	0%(0)
Breast hyperplasia (P > 0.05)						
Absent	70%(7)	60%(6)	70%(7)	100%(10)	80%(8)	100%(10)
Presence	30%(3)	40%(4)	30%(3)	0%(0)	20%(2)	0%(0)

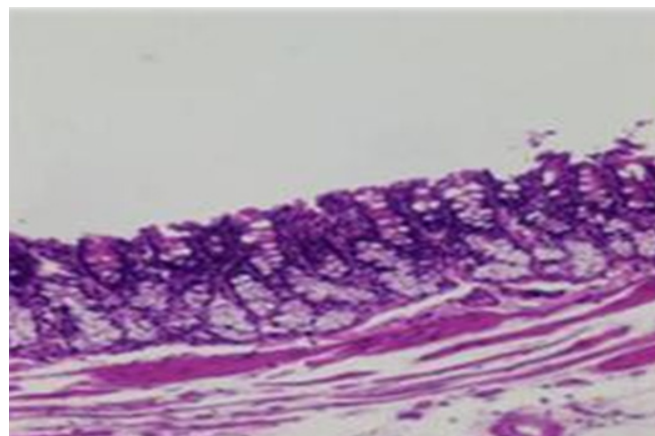


Figure 2B: Hyperplastic crypts characterized by abundant glandular formation arranged in several layers.

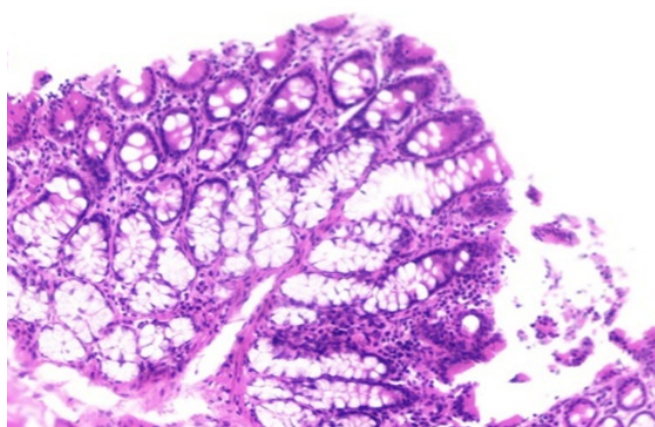


Figure 2C: Dysplasia crypt represented by cells with cytoplasmic basophilia, alteration in the nucleus-cytoplasm relationship and reduction in mucin production.

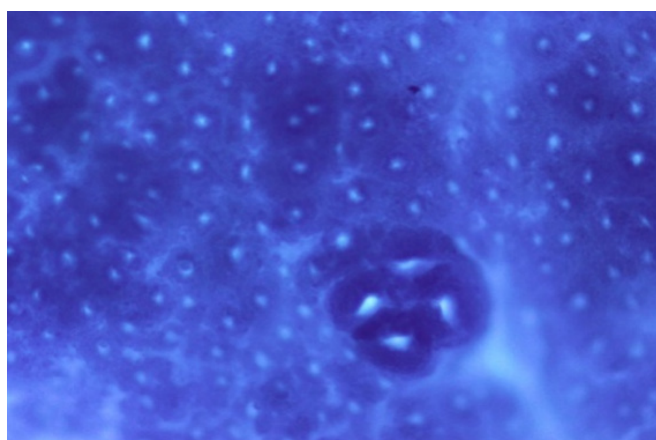


Figure 2A: Colonic mucosa stained with methylene blue representing an FCA composed of four CAs with irregular luminal opening and thicker epithelial lining compared to normal adjacent crypts.

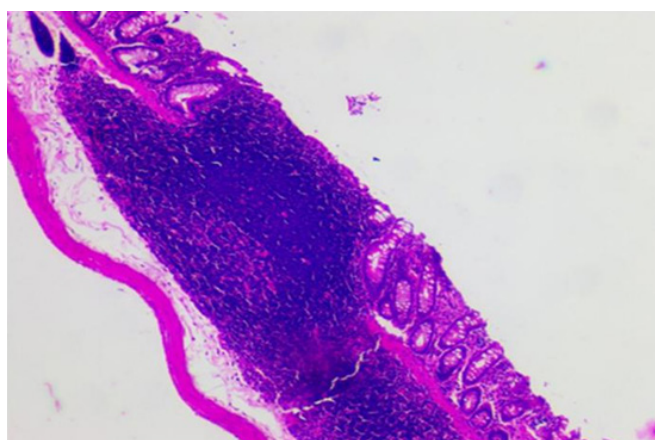


Figure 2D: Hyperplastic and diffuse lymphoid nodules occupying a large extension of the colonic mucosa.

Table 3. Mean values in the number of aberrant crypts (ACs) and aberrant crypt foci (ACF) present in the proximal and distal regions of the colon of animals belonging to the experimental groups submitted to treatment with DMBA and/or AMRLE.

	Colon proximal				Colon distal			
	AC 1 crypt	2-3 crypts	ACF 4-9 crypts	≥10	AC 1 crypt	2-3 crypts	ACF 4-9 crypts	≥10
G1	0.40±0.52	0.70±0.48	0.60±0.52	0.00±0.00	0.10±0.32	0.70±0.48	0.60±0.52	0.20±0.42
G2	0.10±0.32	0.70±0.52	0.70±0.48	0.00±0.00	0.30±0.48	1.30±0.48	1.60±0.52	0.10±0.32
G3	1.50±0.53	5.00±1.49	2.30±0.67	0.00±0.00	0.80±0.42	4.60±0.84	2.10±0.87	0.00±0.00
G4	1.20±0.42	3.00±1.33	1.80±0.92	0.30±0.48	0.30±0.48	1.50±0.53	1.80±0.79	0.30±0.48
G5	1.00±0.67	2.00±0.82	2.00±0.94	0.10±0.32	0.20±0.42	2.40±0.70	1.60±0.52	0.00±0.00
G6	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

©Comparative analysis between analyzed groups using the Kruskal Wallis Test. p value > 0.05

were very similar to each other. Kruskal Wallis test was used for statistical analysis, obtaining a $P = 0.4895$. The portion of the intestinal colon used for the quantification of ACs and ACF was also submitted to histopathological analysis, showing that in *Figures 2B* and *2C* hyperplasia and dysplasia were observed in all groups, except in groups G1 and G6. While lymphoid nodules (*Figure 2D*) were observed in animals from groups G2 and G3.

Discussion

The Brazilian population and also from different regions of the world consume soursop and also parts in the form of teas or infusions due to its antioxidant, anti-inflammatory, analgesic and also cytotoxic properties against different forms of cancer (Baskar *et al.* 2007; Roslida *et al.* 2010; Abdullah *et al.* 2017; Ekaprasasti 2012). The number of total phenol spresent in AMRLE was like that described in other studies (Rady *et al.* 2018). The phenolic components are responsible for the antioxidant activity present in *A. muricata* extracts (George *et al.* 2015; Moghadamtousi *et al.* 2015; Coria-Télliz *et al.* 2018; Rady *et al.* 2018).

Ethanol extract of *A. muricata* leaves has low toxicity. It's requiring exaggerated daily consumption (Sousa *et al.* 2010; Abdullah *et al.* 2017). This low toxicity was also observed during the treatment of animals with AMRLE that showed a progressive increase in body mass, but there was no statistically significant difference in weight development between the negative control group (G6) and the groups treated with DMBA and/or with AMRLE, even when administered simultaneously with the environmen-

tal pollutant DMBA, which after hepatic metabolism gives rise to 7-hydroxymethyl – 12 - methylbenzanthracene (7-HMBA); 12 – hydroxymethyl – 7 – methylbenzanthracene (12-HMBA) and 7,12 - dihydroxymethylbenzanthracene (7,12-HMBA) which are active metabolites and responsible for oxidative damage (Ravi *et al.* 2005).

The study of histopathological changes in organs or tissues of *Wistar* rats was also useful in the assessment of toxicity resulting from the use of AMRLE alone or in conjunction with DMBA. Hepatic steatosis (*Figure 1A* and *Table 2*) is a reversible cell lesion caused by the action of exogenous chemical substances or xenobiotics (da Silva and Escanhoela 2009). Inflammatory foci in the hepatic, renal and pulmonary parenchyma (*Figure 1B-1D* and *Table 2*) may be due to toxic action of the active metabolites of DMBA (7-HMBA, 12-HMBA and 7,12-HMBA) and/ or AMRLE, but it should be noted that in the composition of AMRLE there are phenolic components with potent antioxidant properties, capable to neutralize the active metabolites (George *et al.* 2015; Rady *et al.* 2018).

The harmful effects of 7-HMBA, 12-HMBA and 7, 12-HMBA may have been partially neutralized by the phenolic components of AMRLE, reducing formation of cell and tissue lesions, and consequently formation of moderate or intense inflammatory processes. The anti-inflammatory activity of *A. muricata* extracts has already been described (Roslida *et al.* 2010; Sousa *et al.* 2010).

In *Figures 1E-1G*, bronchial lymphoid hyperplasia and breast ductal cell ectasia and hyperplasia were observed. These histopathological changes were observed in all animals, except those in groups G4 and G6 without contact with DMBA, which is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), found in tobacco combustion, having a strong association with lung diseases and breast carcinogenesis (Macejová and Brtko 2001).

Ductal cell hyperplasia is not considered a pre-neoplastic lesion, but it presents a very low risk for the development of invasive breast carcinoma. Furthermore, there is also a relationship between smoking and the formation of ductal ectasia (Guray *et al.* 2006). As DMBA is one of the combustion products of tobacco, there is a possibility that this chemical compound may participate in the formation of these pathological changes in the breast tissue. Bronchial lymphoid hyperplasia and intestinal mucosa can be considered as a defense mechanism of the body against the harmful

action of DMBA and/orAMRLE, since the lymphoid system has a large area of interface between the internal and external environment, being prepared to inactivate or neutralize aggressive agents of chemical, physical and biological origin through a structure organized in follicles composed of B lymphocytes and interfollicular zone with T lymphocytes, in addition to dendritic follicular cells that present antigens to B lymphocytes, providing co-stimulatory signals which increase the activation and proliferation of germinal centers, resulting in lymphoid hyperplasia (Halle *et al.* 2009).

The number of isolated AC and ACF in the distal and proximal portions of the colon was similar and there was no statistical difference between the analysed groups. However, in Table 3, it is observed that groups G1 and G2 (distal and proximal region) presented a decrease in the number of ACF with 02-03 and 04-09 crypts/focus compared to group G3. Although this decrease has not been confirmed by statistical analysis, the prospect still opens up that the experimental treatment with 50 and 100 mg/kg of AMRLE may have contributed to the inhibition of ACF development, controlling the multiplicity of crypts/focus probably due to the chemoprotective action of the phenolic components present in AMRLE, whose action may be related to the administered dose.

During the investigation of the antioxidant activity of essential oils, the quantification of ACF was considered useful for studies that assess the antioxidant activity that acts in all stages of the carcinogenesis process, thus promoting a reduction in the potential risk of cancer. Since antioxidant substances can inactivate reactive oxygen and nitrogen species that play an important role in carcinogenesis (Lima *et al.* 2020). In the histopathological analysis using HE stains, hyperplastic and dysplastic ACF were visualized in all groups, except in groups G1 and G6, suggesting that AMRLE, was effective in controlling the clonal expansion of AC and ACF, although it was not demonstrated statistical significance. Furthermore, it should be noted that no tumour was observed in the experimental groups, which is relevant information, since the development of tumours is related to the large number of ACF (Ansil *et al.* 2013; Kilari *et al.* 2016).

Conclusions

Histopathological alterations and the formation of ACs and ACF did not show a statistically significant difference between the groups analysed. However, although AMRLE has antioxidant effects due to the presence of

phenolic components, there was still the formation of some pathological processes that may be related to the isolated toxic action of DMBA and/ or associated with other components of AMRLE, since these changes were not seen in the negative control group.

Acknowledgement

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – (graduate scholarship).

References

- Abdullah M, Syam AF, Meilany S, Laksono B, Prabu OG, Bektı H S, Bektı HS, Indrawati L, Makmun D. 2017. The value of caspase-3 after the application of *Annona muricata* leaf extract in COLO-205 colorectal cancer cell line. *Gastroenterology Research and Practice*. 2017:4357165. doi: 10.1155/2017/4357165.
- Ansil PN, Prabha SP, Nitha A, Latha MS. 2013. Chemopreventive effect of *Amorphophallus campanulatus* (Roxb.) blume tuber against aberrant crypt foci and cell proliferation in 1, 2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 14(9):5331-5339.
- Arthur FNK, Woode E, Terlabı EO, Larbie C. 2011. Evaluation of acute and subchronic toxicity of *Annona muricata* (Linn.) aqueous extract in animals. *Journal of Natural Pharmaceuticals*. 4(1):115-124.
- Barbosa GDAF, Mello JCP. 2004. Avaliação clínica do extrato de guaraná no controle da placa bacteriana dentária. *Rev Paul Odont*. 4: 28-30.
- Baskar R, Rajeswari V, Kumar TS. 2007. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian J Exp Biol*. 45(5):480-485.
- Bird RP. 1987. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer letters*. 37(2):147-151.
- BRASIL, Anvisa. 2010. Farmacopeia Brasileira. 5ª edição. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Choi EJ. 2008 Antioxidative effects of hesperetin against 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced oxidative stress in mice. *Life sciences*. 82(21-22):1059-1064.
- Coria-Téllez AV, Montalvo-González E, Yahia EM,

- Obledo-Vázquez EN. 2018. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of chemistry*. 11(5):662-691.
- da SILVA GH, Escanhoela CAF. 2009. Doença hepática gordurosa não alcoólica: patogênese e achados histológicos com ênfase nas alterações mitocondriais. *Revista de Ciências Médicas*. 18(5/6):269-279.
- Ekprasasti NR, Tuti SS, Retno WA. 2012. The breast of anticancer from leaf extract of *Annona muricata* against cell line in T47D. *International Journal of Applied Science and Technology*. 2(1):157-164.
- George VC, Kumar DRN, Suresh PK, Kumar RA. 2015. Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. *Journal of food science and technology*. 52(4):2328-2335.
- Guray M, Sahin AA. 2006. Benign Breast Diseases: Classification, Diagnosis, and Management. *The Oncologist*. 11:435-449
- Halle S, Dujardin HC, Bakocevic N, Fleige H, Danzer H, Willenzon S, Suezer Y, Hämmerling G, Garbi N, Sutter G, Worbs T, Förster R. 2009. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. 206 (12):2593-2601.
- Heinrich M, Kuhnt M, Wright CW, Rimpler H, Phillipson JD, Schandelmaier A, Warhurst DC. 1992. Parasitological and microbiological evaluation of Mexican Indian medicinal plants (Mexico). *Journal of Ethnopharmacology*. 36(1):81-85.
- Kilari BP, Kotakadi VS, Penchalaneni J. 2016. Anti-proliferative and apoptotic effects of *Bassella rubra* (L.) Against 1, 2-Dimethyl Hydrazine-induced colon carcinogenesis in rats. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 17(1):73-80.
- Lima DAN, Pelegrini BB, Uechi FAA, Varago RC, Pimenta BB, de Souza-Kaneshima AM, Kaneshima EM, Souza PC, Pedroso RB, Silveira TGV, Becker TCA. 2020. Evaluation of Antineoplastic Activity of Zingiber Officinale Essential Oil in the Colorectal Region of Wistar Rats. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 21(7):2141-2147.
- Macejova D, Brtko J. 2001. Chemically induced carcinogenesis: a comparison of 1-methyl-1-nitrosourea, 7, 12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (minireview). *Endocrine regulations*. 35(1):53-60.
- Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali HM, Kadir HA. 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(7):15625-15658.
- Rady I, Bloch MB, Chamcheu RCN, Banang-Mbeumi S, Anwar MR, Mohamed H, Babatunde AS, Kuate JR, Noubissi FK, Sayed KAE, Whitfield Gk, Camcheu JC. 2018. Anticancer properties of graviola (*Annona muricata*): a comprehensive mechanistic review. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018:1826170. doi: 10.1155/2018/1826170.
- Ramos S. 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signaling pathways. *Molecular nutrition & food research*. 52(5):507-526.
- Ravi KMN, Vadhanam MV, Horn J, Flesher JW, Gupta RC. 2005. Formation of benzylic-DNA adducts resulting from 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene *in vivo*. *Chemical Research in Toxicology*. 18(4):686-691.
- Roslida AH, Tay CE, Zuraini A, Chan PF. 2010. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. *Journal of Natural Remedies*. 10(2):97-104.
- Sousa OV, Vieira GDV, de Pinho JJRG, Yamamoto CH, Alves MS. 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. *International Journal of Molecular Sciences*. 11(5):2067-2078.
- Vieira GHF, Mourão JA, Ângelo ÂM, Costa RA, Vieira RHSF. 2010. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 52:129-132.
- Yoshimi I, Sobue T. 2004. Cancer Statistics Digest. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 34(6):360-362.

ARTÍCULO ESPECIAL

Horacio Quiroga y su relación con los venenos Horacio Quiroga and his relationship with poisons

Zopatti, Damian¹; Bourbotte, Juan¹; Tejerina, Sergio¹; Cáceres, Cecilia¹; Werner, Antonio²;
Arcidiacono, G.², Scarlato, Eduardo², *.

¹Dirección de Estadística, Internaciones y Archivo médico del Hospital de Clínicas “José de San Martín”. ²Servicio de Toxicología del Hospital de Clínicas “José de San Martín”.

*eduardoscarlato@gmail.com

Recibido: 15 de marzo de 2022.

Aceptado: 29 de abril de 2022.

EDITOR: LAURA CECILIA LANARI

Resumen. La vida y obra del literato Horacio Quiroga ha estado signada por venenos en varias oportunidades. Profundo conocedor de la selva misionera, plasmó en sus personajes el conocimiento de ponzoñas y venenos que poseía su flora y su fauna. En cuanto a su vida personal y la de sus familiares, el veneno estuvo presente hasta sus últimos días. Se describen en este trabajo tanto los venenos detallados en su obra como también el desenlace de su suicidio con cianuro de potasio.

Palabras clave: Horacio Quiroga; Venenos; Cianuro de potasio.

Abstract. The life and the work of the writer Horacio Quiroga has been marked by poisons and venoms on several occasions. Connoisseur of the flora and fauna of the Misiones jungle, he reflected in his characters the knowledge of poisons and venoms that he possessed. As for his personal life and that of his family, the poison was present until his last days. Both the poisons and venoms detailed in his work as well as the outcome of his suicide with potassium cyanide are detailed in this work.

Key words: Horacio Quiroga; Poisons; Potassium cyanide.

Introducción

“¿No es lo suficientemente impresionante en sí el hecho de quitarse la vida para que se anden buscando motivos?”
Emil Cioran. “En las cimas de la desesperación”

Horacio Silvestre Quiroga Forteza (1878-1937) es apreciado como uno de los primeros y principales escritores que inició el espacio del relato en Latinoamérica, por lo que sus contemporáneos ya lo consideraron “el primer cuentista en lengua castellana”. Su obra se ubica entre el fin del modernismo y el comienzo de las vanguardias, en lo que se dio en llamar “la generación del novecientos”.

Nacido en Salto, Uruguay, trabajó en tareas tan variadas como ser docente en gramática castellana, fotógrafo de Leopoldo Lugones, Juez de Paz en San Ignacio, Misiones, y al final de sus días, diplomático. Sus obras publicadas incluyen poesías, prosas líricas y novelas breves (Figura 1).

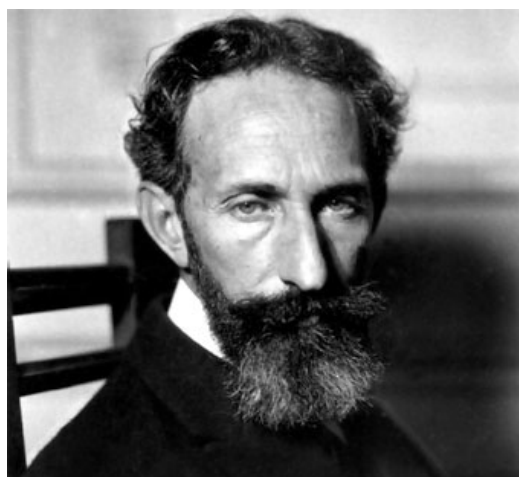


Figura 1. Horacio Quiroga. Fuente: Wikipedia. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Horacio_Quiroga.jpg).

Pero su genio se evidenció en los casi 240 cuentos que escribió, donde la estructura, la tensión narrativa, la consumación de la historia y el impacto del final estuvieron inspirados en sus autores preferidos: Edgar Allan Poe, Rudyard Kipling, Guy de Maupassant y Antón Chéjov. Muchos de sus cuentos describen animales ponzoñosos y ciertos venenos que hacen a la trama de la obra. En los trágicos cuentos inspirados en la selva misionera hizo alarde de envenenamientos por víboras, arañas, enjambre de abejas asesinas, rayas y otros animales ponzoñosos, como también realizó descripciones pormenorizadas acerca de los efectos de drogas psicoactivas.

En la antología “*Suicidas*” (2003), Quiroga aparece junto a otros tres autores (Ernest Hemingway, Silvia Plath y Cesare Pavese) en una selección prologada por el poeta español Benjamín Prado, quien subraya que el suicidio de un autor convierte el acto de lectura en una actividad policial que fuerza al crítico a buscar las huellas de un crimen (Mendoza 2018).

Veamos la presencia y variedad de venenos que se encuentran en su obra.

A la deriva

Uno de los mejores relatos de “*Cuentos de amor de locura y de muerte*”, de 1917, es el titulado “*A la deriva*” (Quiroga 2003). El comienzo nos introduce súbitamente en la problemática toxicológica de la siguiente manera: “*El hombre pisó algo blanduzco, y enseguida sintió la mordedura en el pie. Saltó adelante, y al volverse con un juramento vio una yararacusú que arrollada sobre sí misma, esperaba otro ataque...*”. En este cuento, Quiroga establece una magistral descripción del proceso de envenenamiento que sufre un canoero por la mordedura de una yarará (*Bothrops jararacus*), sin omitir detalles clínicos desde el accidente hasta la muerte, poniendo en evidencia su experiencia en algún caso real.

Los cazadores de ratas

En 1904, Quiroga, recién llegado de un frustrante viaje a París, se radica en el Chaco, en una chacra que compra en el paraje El Saladito, a 7 kilómetros de Resistencia. Fue su primera experiencia con la dura vida en el monte, incluyendo el riesgo de la exposición a la fauna venenosa, que luego profundizaría en Misiones. En el cuento “*Los cazadores de ratas*”, narra las vicisitudes que padece una familia de colo-

nos presuntamente alemanes radicados en el Chaco, que se apropian de un terreno que las “cascabeles” consideraban como propio. De a poco las serpientes se animan a ingresar en la vivienda, atraídas por la proliferación de ratas. Cuando el hombre las descubre, mata a un macho, provocando que la hembra, en venganza, muerda a Otto, el pequeño hijo que juega solo, bajo el sol de la siesta.

Un peón

Este cuento de 1924 relata un episodio en el cual Cirila, una joven empleada del relator, es mordida por una “yararacusú”. Quiroga hace una descripción de la patología inicial de esta afección y luego del tratamiento que se aplicó al no contar con el suero antiofídico: “*En casa le habían ligado el tobillo, tratando en seguida de inyectarle permanganato. Pero no es fácil darse cuenta de la resistencia que a la entrada de la aguja ofrece un talón convertido en piedra por el edema. Examiné la mordedura, en la base del tendón de Aquiles. Yo esperaba ver muy juntos los dos clásicos puntitos de los colmillos. Los dos agujeros aquellos, de que aún fluían babeando dos hilos de sangre, estaban a cuatro centímetros uno de otro; dos dedos de separación. La víbora, pues, debía ser enorme. Cirila se llevaba las manos del pie a la cabeza, y decía sentirse muy mal. Hice cuanto podía hacer; ensanche de la herida, presión, gran lavaje con permanganato, y alcohol a fuertes dosis. Entonces no tenía suero; pero había intervenido en dos casos de mordedura de víbora con derroche de caña, y confiaba mucho en su eficacia. Acostamos a la muchacha, y Olivera se encargó del alcohol. A la media hora la pierna era ya una cosa deforme, y Cirila —quiere creer que no estaba descontenta del tratamiento— no cabía en sí de dolor y de borrachera... al día siguiente, a las cinco de la mañana, Cirila estaba fuera de peligro inmediato, aunque la hinchazón proseguía.*”.

La serpiente de cascabel

En 1906, Quiroga publicó en la revista “*Caras y Caretas*” el relato “*La serpiente de cascabel*”, que no tiene la estructura literaria de un cuento sino el de la narración de sus primeras experiencias con estos ofidios en el monte chaqueño. El autor hace una amplia descripción de la serpiente, de sus hábitos y de los mitos populares sobre la misma, para finalizar con el relato de su propia experiencia.

La cacería de la víbora de cascabel

Entre enero y abril de 1924, Quiroga publicó cuentos dirigidos al público infantil en la popular revista "Billiken", a los que llamó "Cartas de un cazador", que luego serían recopilados en un volumen, constituyendo una de las obras menos conocidas del prolífico cuentista. El autor consideraba que estaban dirigidos especialmente para niños de 6 a 10 años, aconsejando que un adulto acompañara al niño en su lectura, dado el carácter tenebroso habitual de sus relatos. En cada carta, el cazador, en primera persona, narra su última cacería a quienes llama siempre "Mis chiquitos". En uno de los cuentos, que se llama "La cacería de la serpiente de cascabel", Quiroga vuelve a demostrar sus amplios conocimientos sobre la anatomía y fisiología de estos reptiles, así como sus experiencias en los efectos locales y sistémicos de la mordedura y del veneno: "Tienen dos glándulas de veneno que comunican con sus dos colmillos. Estos dientes son huecos, o, mejor dicho, poseen un fino canal por dentro, exactamente como las agujas para dar inyecciones. Y como esas mismas agujas, los dientes de la víbora de cascabel están cortados en chanfle o bisel, como los pitos de vigilante y los escoplos de carpintero.

Cuando las víboras hincan los dientes, aprietan al mismo tiempo las glándulas, y el veneno corre entonces por los canales y penetra en la carne. En dos palabras: dan una inyección de veneno".

La miel silvestre

Así como el canoero de "A la deriva" conocía de sobra el riesgo al que se exponía al caminar por la selva, en otro cuento del mismo libro, "La miel silvestre", el protagonista es Gabriel Benincasa, un joven contador urbano de visita en el obraje de su padrino, de quien desoye las advertencias sobre los peligros de la selva. Es así que ingiere miel de las celdas de un panal que encuentra en el monte, y apenas comienza a percibir sintomatología neurológica, toma conciencia que quedará paralizado y presa de hormigas carnívoras que lo devorarán.

"-Qué curioso mareo... -pensó el contador-. Y lo peor es...

Al levantarse e intentar dar un paso, se había visto obligado a caer de nuevo sobre el tronco. Sentía su cuerpo de plomo, sobre todo las

piernas, como si estuvieran inmensamente hinchadas. Y los pies y las manos le hormigueaban. -¡Es muy raro, muy raro, muy raro! -se repitió estúpidamente Benincasa, sin escudriñar sin embargo el motivo de esa rareza-

Como si tuviera hormigas... La corrección -concluyó.

Y de pronto la respiración se le cortó en seco, de espanto.

-¡Debe de ser la miel...! ¡Es venenosa...! ¡Estoy envenenado!

Y a un segundo esfuerzo para incorporarse, se le erizó el cabello de terror: no había podido ni aun moverse. Ahora la sensación de plomo y el hormiguelo subían hasta la cintura. Durante un rato el horror de morir allí, miserablemente solo, lejos de su madre y sus amigos, le cohibió todo medio de defensa.

-¡Voy a morir ahora...! ¡De aquí a un rato voy a morir...! ¡Ya no puedo mover la mano...!

En su pánico constató sin embargo que no tenía fiebre ni ardor de garganta, y el corazón y pulmones conservaban su ritmo normal. Su angustia cambió de forma.

-¡Estoy parálítico, es la parálisis! ¡Y no me van a encontrar...!

Pero una invencible somnolencia comenzaba a apoderarse de él, dejándole íntegras sus facultades, a la par que el mareo se aceleraba..."

En este caso el autor se toma una licencia literaria habida cuenta que no se encuentran registros toxicológicos acerca de un veneno neurotóxico proveniente de hormigas, abejas o avispas que pudiesen justificar el cuadro clínico descrito en un ser humano.

Anaconda

Un año después de la publicación de los cuentos de la selva para adultos, Quiroga emprendió la edición de una serie similar pero esta vez dirigido al público infantil. En 1917, luego de la muerte de su mujer, Ana María, el escritor se muda a Buenos Aires con sus hijos Eglé y Darío. Como los pequeños extrañan la vida en el monte misionero, el padre crea para ambos un conjunto de cuentos animados por los animales que tan bien conocían y recordaban, compilados bajo el título de "Cuentos de la selva", publicado en Buenos Aires en 1918. Pronto la obra trascendió el círculo familiar y progresivamente fue convirtiéndose en un clásico de la literatura rioplatense para niños.

El cuento más famoso del libro es "Anaconda", que incluye un diálogo entre serpientes vene-

nosas y no venenosas, en el que comentan la instalación de un instituto para la creación de suero antiofídico, como también la sistemática para la producción de sueros heterólogos.

“La Casa, motivo de preocupación de la selva, habíase convertido en establecimiento científico de la más grande importancia. Conocida ya desde tiempo atrás la particular riqueza en víboras de aquel rincón del territorio, el Gobierno de la Nación había decidido la creación de un Instituto de Seroterapia Ofídica, donde se prepararían sueros contra el veneno de las víboras. La abundancia de éstas es un punto capital, pues nadie ignora que la carencia de víboras de que extraer el veneno es el principal inconveniente para una vasta y segura preparación del suero. El nuevo establecimiento podía comenzar casi en seguida, porque contaba con dos animales -un caballo y una mula- ya en vías de completa inmunización. Habíase logrado organizar el laboratorio y el serpentario. Este último prometía enriquecerse de un modo asombroso, por más que el Instituto hubiera llevado consigo no pocas serpientes venenosas, las mismas que servían para inmunizar a los animales citados. Pero si se tiene en cuenta que un caballo, en su último grado de inmunización, necesita seis gramos de veneno en cada inyección (cantidad suficiente para matar doscientos cincuenta caballos), se comprenderá que deba ser muy grande el número de víboras en disponibilidad que requiere un Instituto del género.”

Aquí el autor evidencia conocimiento del tema, aunque con algunas inexactitudes ya que la cantidad de veneno utilizado por aquella época para inmunizar, rondaba el gramo por caballo, siendo actualmente la cantidad que se usa por equino muchísimo menor, de entre veinte a cincuenta miligramos, por lo que con un gramo de veneno de *Bothrops* se puede inmunizar hasta cincuenta caballos. Asimismo, si bien es muy difícil decir con exactitud cuántos caballos podrían morir con seis gramos de veneno de *Bothrops*, teóricamente, dependiendo del tipo de veneno botrópico y la talla de los equinos, podría suponerse entre treinta y sesenta.

Las medias de los flamencos

Cuento que recoge leyendas populares que explicaban el color y el comportamiento de los flamencos a partir del contacto con las serpientes de coral (*Micrurus sp*) y las falsas corales.

“Además, las víboras de coral estaban seguras de que los flamencos iban a morir, porque la mitad, por lo menos, de las víboras de coral

que los habían mordido, eran venenosas.

Pero los flamencos no murieron, corrieron a echarse al agua, sintiendo un grandísimo dolor. Gritaban de dolor, y sus patas, que eran blancas, estaban entonces coloradas por el veneno de las víboras. Pasaron días y días, y siempre sentían terrible ardor en las patas, y las tenían siempre de color de sangre, porque estaban envenenadas”.

La tortuga gigante

Este relato describe la conservación y el traslado de las peligrosas serpientes venenosas.

“Había también agarrado, vivas, muchas víboras venenosas, y las llevaba dentro de un gran mate, porque allá hay mates tan grandes como una lata de querosene”.

En la noche

También la picadura del aguijón caudal venenoso de la raya de agua dulce, muy común en el río Paraná, tiene su presencia en la obra de Horacio Quiroga. En el cuento *“En la noche”* (1921) el protagonista, que junto a su mujer viene navegando por el Paraná luchando contra las corrientes, al hacer un alto para descansar en la ribera pisa un ejemplar de raya. El dolor es lacerante, pero finalmente no pone en peligro la vida del accidentado. El tema principal es entonces el sobreesfuerzo de la mujer para llegar remando sola al destino en el cual espera encontrar el tratamiento que considera salvador: la aplicación del ají macho quemado.

Más allá

En 1935, Quiroga publica uno de sus últimos libros de cuentos, *“Mas allá”*, que mereció el Premio del Ministerio de Instrucción Pública del Uruguay de 1936. La obra recopiló once cuentos que ya habían sido publicados, con el común denominador de referirse a experiencias extremas de naturaleza psíquica, con su séquito de locura y muerte. El cuento *“Más allá”* (1925) relata la historia de amor de una pareja, prohibida por la oposición de la familia de la mujer. Sin poder superar esta situación, la pareja decide suicidarse ingiriendo un veneno mortal.

“A un tiempo tomamos el veneno. En el brevísimo espacio de tiempo que media entre recibir de su mano el vaso y llevarlo a la boca, aquellas mismas fuerzas de los abuelos que me precipitaban a morir se asomaron de golpe al borde de mi destino a contenerme... ¡tarde ya! Bruscamamente, todos los ruidos de la calle, de la ciudad misma, cesaron. Retrocedieron vertiginoso-

samente ante mí, dejando en su hueco un sitio enorme, como si hasta ese instante el ámbito hubiera estado lleno de mil gritos conocidos.

Permanecí dos segundos más inmóviles, con los ojos abiertos. Y de pronto me estreché convulsivamente a él, libre por fin de mi espantosa soledad.

¡Sí, estaba con él; e íbamos a morir dentro de un instante!

El veneno era atroz, y Luis inició primero el paso que nos llevaba juntos abrazados a la tumba.

—Perdóname— me dijo oprimiéndome todavía la cabeza contra su cuello. Te amo tanto que te llevo conmigo”.

—Y yo te amo—le respondí—, y muero contigo”.

Pasado amor

Entre las pocas novelas escritas por Horacio Quiroga se encuentra “Pasado amor” (1929) que narra la historia conflictiva de un triángulo amoroso. En un momento de la relación, el autor mostró también conocimiento acerca de la resistencia de ciertos animales a determinadas ponzoñas.

“De las jaulas del zoo surgió Ekdal con un coati bajo un brazo, y una víbora colgada por la cola, del otro.

—Cuando usted tenga tiempo para mí —dijo a Morán—, vamos a estudiar la resistencia del coati al veneno de las víboras. He hecho morder a éste por la yarará que usted ve, hace una hora. Y está, yo creo, tan sano como usted y como yo”.

Historia de un amor turbio

Se trata de una de las primeras obras de Quiroga, publicada en 1908 y con un evidente carácter autobiográfico, ya que por entonces se había enamorado de una de sus alumnas del colegio normal, Ana María Cires, a quien llevaba diez años de diferencia. En el libro, el autor utiliza también al veneno como un recurso literario, incorporándolo como metáfora de dichos y situaciones mal intencionadas.

“¿Por qué Eglé no le había dicho entonces que había tenido novio?

El veneno había entrado ya. Evocó en un segundo todas sus certidumbres de la honradez de su novia compradas tras días de martirio, y ni una siquiera resistió a esta pregunta....

—¡No, por favor!... —gimió Eglé, volviéndose al otro lado. Pero Rohán tenía tras él tres días de emponzoñada amargura, y cada noble evasiva de Eglé era una nueva inyección de veneno en la herida emponzoñada”.

El haschich

“El crimen del otro” es el segundo libro de Quiroga, publicado en 1904, integrado por doce cuentos, incluyendo el titulado “El haschich”, en el cual hace la descripción pormenorizada y en primera persona de los distintos estadios y las sensaciones percibidas tras el consumo de una importante dosis de drogas, que por aquella época eran de fácil adquisición. “En cierta ocasión de mi vida tomé una fuerte dosis de haschich que me puso a la muerte. Voy a contar lo que sentí: 1° para instrucción de los que no conocen prácticamente la droga; 2° para los apologistas de oídas del célebre narcótico.

La cuestión pasó en 1900. Diré de paso que para esa época yo había experimentado el opio en forma de una pipa de tabaco que, a pesar de la brutal cantidad de opio (1 gramo), no me hizo efecto alguno; habíame saturado -toda una tarde- de éter, con náuseas, cefalgia, etc.; sabía de memoria el cloroformo que durante un año me hizo dormir cuando no tenía sueño, cogiéndome éste a veces tan de improviso que no tenía tiempo de tapar el frasco; así es que más de una noche dormí ocho horas boca abajo, con 100 gramos de cloroformo volcado sobre la almohada. Al principio lo respiraba para alucinarme gratamente, lo que conseguí por un tiempo; después me idiotizaba, concluyendo por no usarlo sino en insomnios; lo dejé. Y un buen día llegué al haschich, que fue lo grave”.

A continuación, Quiroga acude a la colaboración de Alberto Brignole, un amigo estudiante de medicina y compañero de cuarto, para que, cuaderno en mano, anotara detalladamente los efectos del tóxico durante las trece horas que duró el experimento. En las notas que cierran el cuento, Brignole discrimina los periodos de la intoxicación en horas y hasta en minutos. Quiroga transcurre por síntomas como la sudoración, las alteraciones del pulso, las visiones monstruosas, la fijación en los objetos y la estimulación de la lucidez.

De los veintitrés cuentos con temática suicida, solamente doce de ellos serían recopilados en colecciones publicadas en vida y dos de ellos — “Los ojos sombríos” (1911) y “El infierno artificial” (1913) fueron suprimidos a partir de la tercera edición de “Cuentos de amor de locura y de muerte”.

Los ojos sombríos

El tema del cuento es el amor ya que todos los personajes del mismo se encuentran enamorados de otro personaje, pero también es la

muerte porque Vecerra se termina suicidando cuando se da cuenta que su novia María y su mejor amigo Zapiola se encuentran enamorados uno del otro y por su enfermedad (tisis).

El infierno artificial

Desde el inicio Quiroga deja en claro que su cuento tendrá como tema recurrente las adicciones, convirtiéndolo en *leitmotiv* y usándolo como medio para crear a los personajes. Un sepulturero adicto al cloroformo sufre la alucinación de estar conversando con un hombrecillo amarillo, situado en la base del cráneo de un cadáver. Este hombrecillo le relata cómo varios años de adicción primero a la morfina y luego a la cocaína terminaron llevándolo al suicidio. Sin embargo, su adicción lo acompañaría incluso más allá de su muerte.

Este cuento es, junto con “*El haschich*”, uno de los cuentos que más se centran en el consumo de drogas en su obra.

Seguramente sus peligrosas experiencias juveniles con el *haschich* y el cloroformo, puedan confirmar las palabras de Emir Rodríguez Monegal, cuando sobre el tema decía que “*un suicida no se hace en un día: es un lento trabajo de años*” (Rodríguez Monegal 1967).

Su trágica vida

Desde el nacimiento, su vida estuvo rodeada de un inverosímil número de muertes violentas. Suicidios, asesinatos y accidentes fatales fueron tragedias que estuvieron entre sus familiares y seres queridos, lo que impactó en la lectura de su vida y obra, motivando la indagación sobre los verdaderos motivos de su suicidio. La acumulación de macabros eventos en la vida de Horacio Quiroga lo han convertido en el paradigma del autor trágico dentro las letras latinoamericanas.

En el primero de estos eventos trágicos, su padre, Prudencio Quiroga, vicecónsul argentino afincado en Salto, se disparó accidentalmente un escopetazo durante un viaje de caza, por lo que quedó huérfano a los dos meses de vida. Su madre, Pastora Forteza se volvió a casar en 1891 con Mario Barcos, pero la imagen paterna volvería a desdibujarse cuando en 1896 quedó paralizado a raíz de un derrame cerebral. La tragedia en la familia volvió a ocurrir en 1899 en Salto, cuando Horacio, de 16 años de edad en ese momento, fue testigo del momento en que su padrastro quién, habiendo quedado paralítico, fue capaz de accionar el gatillo de la escopeta con el dedo del pie.

La escritura no fue su única pasión. Cultivó también el ciclismo, la fotografía y hasta la química, datos no menores que nos permitirán conjeturar más adelante. En 1901 vio el lanzamiento de su primera colección literaria “*Los arrecifes de coral*”, que se la dedicó a Leopoldo Lugones, a quien admiraba desde que leyó “*Oda a la desnudez*” del poeta cordobés. Pero el logro editorial fue eclipsado por la muerte de sus dos hermanos, Prudencio y Pastora, quienes sucumbieron a la fiebre tifoidea ese mismo año.

No había pasado un año de estas pérdidas cuando Quiroga disparó y mató accidentalmente a su amigo Federico Ferrando mientras auspiciaba de “padrino” y limpiaba la pistola con que éste se batiría a duelo con el periodista Germán Papini Zas. Luego de cuatro días de detención, Quiroga fue finalmente absuelto y liberado por parte de la policía por considerar el episodio como un accidente fatal. Sin embargo, el sentimiento de culpa que sentía fue tan grande que decidió abandonar Uruguay para radicarse en la Argentina, donde pasaría el resto de su vida.

Cuando Leopoldo Lugones proyectó un viaje de estudio a las misiones jesuíticas de San Ignacio, le propuso llevarlo como fotógrafo. Fue en este viaje que Quiroga se deslumbró con una tierra de la que quedaría prendado para siempre. En 1908 compró una chacra de 185 hectáreas sobre el Alto Paraná en San Ignacio, provincia de Misiones, y una vez instalado en plena selva misionera, comenzó a publicar historias que permitieron adentrar al lector a la jungla junto con él.

Desempeñándose como maestro, en 1909, y a pesar de la oposición de los padres franceses, se casó con una de sus alumnas, Ana María Cires. Aunque tendrían dos hijos en los próximos años, la vida remota y peligrosa que llevó la familia, resultó demasiado para Ana, lo que la llevó a suicidarse a la edad de 25 años ingiriendo uno de los preparados que su marido usaba para el revelado fotográfico, falleciendo en diciembre de 1915 tras ocho días de tortuosa agonía.

La fotografía, que lo había anclado a Misiones, luego de esta tragedia, ahora lo alejaba de ese lugar. Quiroga regresó con sus hijos a Buenos Aires y trabajó en el consulado uruguayo mientras continuaba con su producción literaria.

Entre 1919 y 1922 mantuvo una estrecha relación con la poetisa Alfonsina Storni, a quien le propuso irse juntos a Misiones. La poetisa,

indecisa, le consultó a su amigo, el pintor Quinquela Martín, quien le respondió “¿Con ese loco? ¡No!”.

Sin embargo, su espíritu enamorado hizo que tras esta negativa comenzara a prestar atención a una de sus alumnas, Ana María Palacio, de 17 años. En este caso, sus padres no sólo se opusieron a la relación, sino que la llevaron lejos del alcance del escritor. Finalmente, en 1927 se casó con María Elena Bravo, compañera de su hija Eglé. La joven y flamante esposa tenía solo 19 años y Quiroga le llevaba casi 30 años más. En 1928 tuvieron una hija, María Elena, “Pitoca”.

En 1932 la familia regresó a su chacra en Misiones, pero las dificultades que habían signado a Quiroga durante toda su vida, no lo abandonaron. En medio de una enfermedad persistente y que cada vez complicaba más su estado de salud, publicó su último trabajo en 1935, época en que su esposa lo dejó y regresó a Buenos Aires. Después de un par de años en solitario, Quiroga vuelve también a Buenos Aires por problemas de salud, supuestamente por lo que creía una infección urinaria. Horacio Quiroga fue asistido y diagnosticado en el Hospital de Clínicas “José de San Martín” con el diagnóstico de cáncer de próstata terminal, tras una internación que duró cinco meses. En su transcurso, los cirujanos le practicaron una talla vesical para aliviar su padecimiento. Según Rodríguez Monegal, para justificar la demora en encarar la operación que tanto esperaba el paciente, le comentaban que había que esperar el regreso del prestigioso cirujano José Arce. Aunque separado de hecho, fue cuidado diligentemente por su esposa durante ese tiempo.

Muchas historias se han escrito y se han repetido acerca de su trágica historia de vida. Uno de estos relatos refiere que, durante su prolongada internación en el hospital, Quiroga conoció a Vicente Batistessa, paciente afectado de una elefantiasis que por darle un aspecto de monstruo era mantenido oculto en el sótano, lejos de la vista del público. El escritor se indignó y exigió que fuera su compañero de cuarto. Parece ser que fue el propio Batistessa quien escuchó una conversación de los médicos tratantes de Quiroga en la que comentaban la situación ominosa de su compañero de cuarto. Batistessa se lo contó a su nuevo amigo, el cual exigió a los médicos que le dijeran la verdad. Ya en conocimiento de su pronóstico inexorable, Horacio Quiroga pidió dar un pa-

seo. Regresó a la noche, con una cantidad de cianuro de potasio que nadie supo donde lo había comprado. Lo ingirió esa misma noche y murió al día siguiente. Era el 18 de febrero de 1937 (Yasmin Ali 2022).

Esta historia contiene mucha similitud con Joseph Carey Merrick, el llamado hombre elefante, que vivió sus últimos años en el Royal London Hospital. Sin embargo, no hay en la actualidad documentación en el Hospital de Clínicas que avale dicha internación y menos que existiesen pacientes internados en sótanos.

Consultado el registro obrante en la Dirección de Estadística y Archivos Médicos del Hospital de Clínicas, a través de la búsqueda en los libros de guardia de todo el año 1936, no se encontró que el autor haya ingresado por guardia, aunque sí se pudieron constatar en ese período consultas por parte de cuatro pacientes con el apellido Quiroga (Dolores de 25 años de edad y domiciliada en Maipú 723, Antonio de 17 años domiciliado en Bermúdez 771, Dolores de 60 años domiciliada en Rodríguez Peña 1568 y Carlos de 3 años domiciliado en Talcahuano 451). No se encontró en estos pacientes relación filial ni de domicilio con el escritor.

Dirigidos entonces al Departamento de Archivos del Registro Civil de la Ciudad de Bs As, se pudo acceder al certificado de defunción en donde consta que el cuerpo fue hallado en su casa de la calle Moreno 786. Este documento certifica que el escritor no se suicidó en el Hospital, sino en su domicilio (Figura 2).

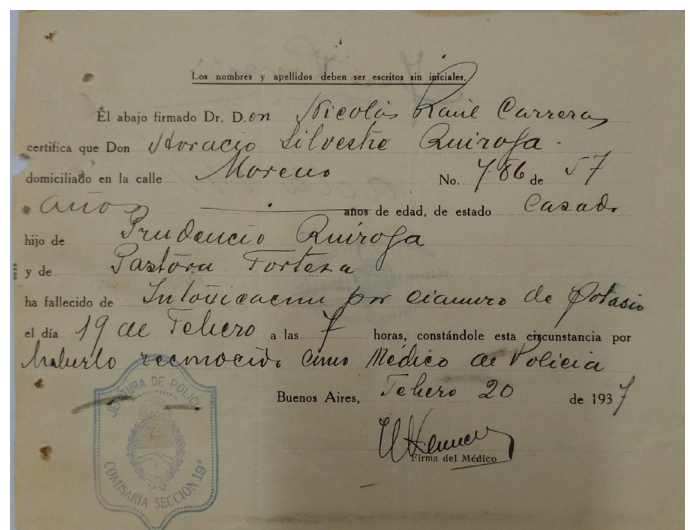


Figura 2. Certificado del médico de policía donde consta la dirección donde fue hallado el occiso. (Archivo del Registro Civil).

Natalio Botana, director del diario “Crítica” fue quien pagó los gastos del sepelio, ya que Quiroga murió en la pobreza. Fue velado en la Sociedad Argentina de Escritores, entidad que había fundado junto a Lugones. Su amiga

Alfonsina Storni se ocupó de despedirlo a la manera que mejor sabía hacerlo: “Morir como tú, Horacio, en tus cabales, y así como en tus cuentos, no está mal; un rayo a tiempo y se acabó la feria... allá dirán” (Figura 3).

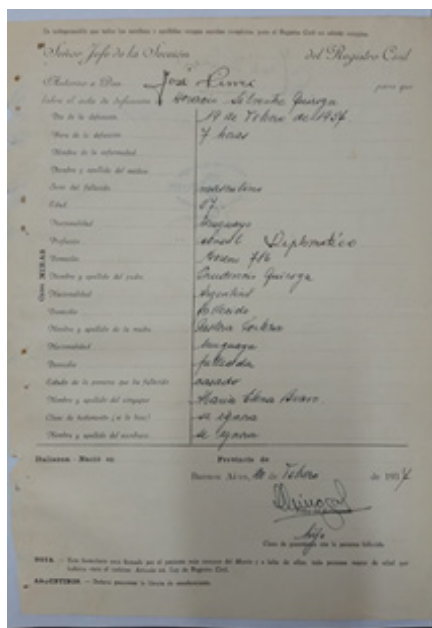
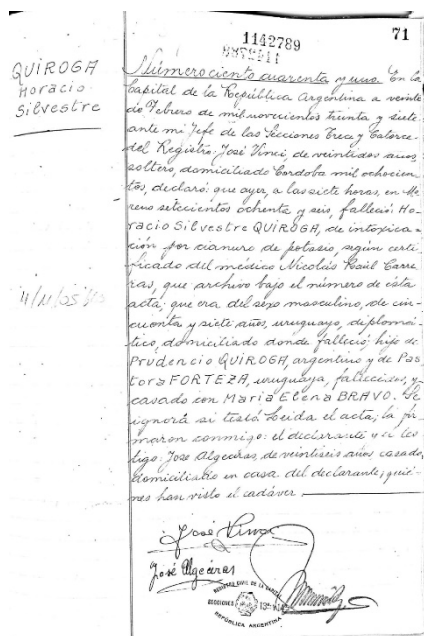


Figura 3. Acta y registro de defunción de Horacio Quiroga. (Archivo del Registro Civil).

Su gran amigo, el médico y escritor Baldomero Fernández Moreno, quien se encargó de llevar las cenizas de Quiroga al cementerio de su Salto natal en una urna tallada de quebracho, escribió como homenaje y epitafio: “He aquí las cenizas, oh Salto, de tu hijo. De ti salió y es justo y es natural que vuelva. El corazón de un árbol ya es su eterno cobijo: el silencio, la sombra y el pavor de la selva” (Fernández Moreno 1957).

Leopoldo Lugones diría luego que su amigo Quiroga tuvo finalmente un “suicidio de muca-ma”. Tal vez como una cruel burla del destino, un año después se suicidaría él también con cianuro, en este caso rebajado con whisky, en una habitación del recreo del Delta del Paraná “El tropezón”, en el Tigre, el 19 de febrero de 1938. Quiroga y Lugones no solo compartieron la elección del veneno para poner fin a sus vidas, ambos debieron enfrentar seria oposición familiar al enamorarse de mujeres jóvenes. El cianuro era por entonces un veneno economí-

co, que se conseguía en las farmacias y que llegó a ser el predilecto de los suicidas pobres pero decididos.

Otros escritores, como Emir Rodríguez Monegal, dirán que Quiroga se envenena con cianuro tras haber cumplido “su destino en la tierra”, o que prefirió el suicidio “para eludir para siempre la insistencia de una vida compleja y admirable” como sentenciara Juan Carlos Onetti. El 25 de octubre de 1938 se sumaría su amor imposible, Alfonsina Storni, en este caso, internándose en el mar en la ciudad de Mar del Plata.

La impronta autodestructiva que rodeó su vida no cesó con su muerte. Su hija Eglé se suicidó un año después de su padre en San Ignacio y su hijo Darío haría lo propio en 1952 en Buenos Aires luego de dar una conferencia sobre su padre. Su otra hija, María Elena, recorrería el mismo camino en enero de 1988 lanzándose desde un noveno piso de un hotel de Buenos Aires.

Conclusiones

Podemos repetir las palabras de Castillo en "Liminar", cuando dice que "No hay casi cuento de Quiroga donde el protagonista no sea la muerte" (Castillo 2012), o que "las muertes, el miedo, el horror... que lo rodearon siempre... se erigen como el hilo conductor de gran parte de sus cuentos" (Costa Toscano). Nada se puede agregar a lo que tantos literatos e historiadores ya han escrito acerca de esta trágica vida. Solo queda agregar el análisis de la elección del veneno, la última decisión de todo suicida.

El cianuro de potasio (KCN) es una sal inorgánica, soluble en agua, cuya ingestión es sumamente peligrosa y que posee un característico olor a almendras amargas (aunque el 10% de la población posee una determinante genética que le impide percibir este olor). Se lo utiliza en actividades tan variadas como la joyería para dar brillo al oro, en minería para extraer metales de los minerales, la galvanoplastia o las cámaras de gas, método de ajusticiamiento legal utilizado en los Estados Unidos para la pena de muerte desde 1920 hasta 1990 (DPIC 2006). Pero el cianuro es utilizado también en fotografía en los baños fijadores de acción rápida a fin de eliminar el haluro de plata que no ha sido revelado. Quiroga, como fotógrafo, tenía estos productos en su cuarto oscuro para revelar sus fotografías. Su esposa se suicidó bebiendo estos, lo mismo que él hiciera en su domicilio. Y si bien la muerte de ambos no fue un pacto de amor, como lo plasmó en su obra "Más allá", el cianuro de potasio terminaría igualando la muerte de la pareja.

Bibliografía

Castillo A. 2012. Cuentos completos. Argentina: Alfaguara.

DPIC. Death Penalty Information Center. Web Archive. <http://www.deathpenaltyinfo.org/methods-execution>. Última vista 30 de marzo de 2020.

Quiroga H. 2003. Obras completas. Buenos Aires (ARG): Editorial Losada.

Mendoza CA. 2018. Más allá de la necrografía: una relectura del suicidio en la vida y obra de Horacio Quiroga. *Revista Canadiense de Estudios Hispánicos* 42(2): 267-290. <http://www.jstor.org/stable/44987061>. Última vista 30 de marzo de 2020.

Rodríguez Monegal E. 1967. Genio y Figura de Horacio Quiroga. Buenos Aires (ARG): Eudeba.

Fernández Moreno B. 1957. Poemas del Uruguay. Colección Nuevo Mundo. Buenos Aires (ARG): Perrot.

Yasmin A. 2022. Soledad, cianuro y una historia de suicidios: la tragedia de Horacio Quiroga y sus hijos. <https://www.diario26.com/315850-soledad-cianuro-y-una-historia-de-suicidios-la-tragedia-de-horacio-qui-roga-y-sus-hijos>. Última vista 24 de febrero de 2020.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Sr. Sergio García. Director del Registro Civil.

RECENSIÓN

Toxicología Clínica

Fundamentos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de las intoxicaciones

Libro de Editorial Panamericana. Damín y colab. 2022. 712 páginas. Edición impresa y en versión digital

Después de un largo paréntesis, con la consecuente evolución del conocimiento en el área de la toxicología, sale a la luz en abril de 2022 una nueva obra, que ha logrado amalgamar el conocimiento y la experticia de 80 profesionales, distinguidos en el campo de la toxicología de Argentina, Brasil, Chile, Guatemala, México, Nicaragua, Paraguay, Uruguay, junto a sus colaboradores.

Libro que sin duda será un documento de consulta y estudio tanto para la formación de grado, como de posgrado en el área de la toxicología clínica, que si bien en un comienzo fue pensado como texto para los estudiantes de la Primera Cátedra de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, creada en el año 1892. Durante su edición, dejó en evidencia la necesidad existente en la región de contar con una obra, actualizada, en idioma español, que no solo fuera de consulta y estudio para la formación de grado de estudiantes de medicina, sino también para estudiantes de farmacia, enfermería, y de las carreras de posgrado en toxicología, medicina laboral, medicina legal y salud ambiental, sumado al requerimiento que existía por parte de los Centros de Información y Asesoramiento Toxicológicos de la región. En este sentido es que, al primer grupo de autores, en su mayoría médicos docentes de la Primera Cátedra de Toxicología de Facultad de Medicinas de la Universidad de Buenos Aires, se sumaron Directores de Centros de Toxicología y Profesores del área de la toxicología de distinguidas Universidades de América, los que aportaron vastos conocimientos y enriquecieron la obra con valiosos aportes y distintas miradas sobre las problemáticas toxicológicas de la región, que permite introducir a los ávidos lectores en los más importantes avances en las distintas facetas que contiene esta ciencia.

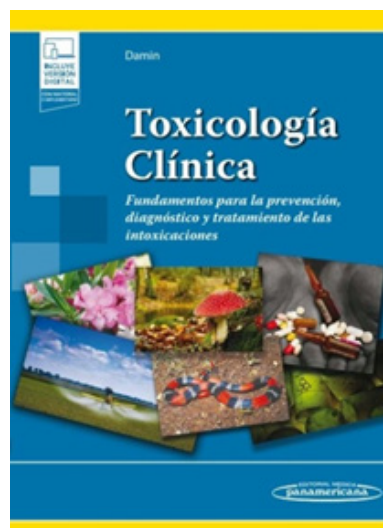
La obra mantiene una estructura clásica, con el desarrollo de 24 capítulos, agrupados en 3 partes, una de toxicología general, otra de temas específicos, donde se detallan las intoxicaciones más frecuentes por gases, hidrocarburos, alcoholes, plaguicidas, cáusticos, me-

tales y metaloides, medicamentos, consumo de sustancias psicoactivas, plantas, hongos y una gran variedad de animales, finalizado con una parte especial de integración, donde trata sobre intoxicaciones por productos de uso doméstico, alimentos y sobre los efectos carcinógenos, mutágenos y disruptores endocrinos y toxicología reproductiva. Cerrando ésta última parte con el desarrollo de aspectos que tienen que ver con la toxicología laboral, las emergencias toxicológicas masivas, radiaciones ionizantes y no ionizantes, toxicología ambiental y vigilancia epidemiológica de las intoxicaciones. Contenido que permite a los estudiosos, cualquiera que sea su conocimiento previo, introducirse directamente en cada uno de los temas de la toxicología y de las intoxicaciones más frecuentes; con especial atención en los nuevos conocimientos y mecanismos de toxicidad, así como en sus abordajes terapéuticos e interpretación de los resultados analíticos.

En su desarrollo, los autores han agregado numerosas ilustraciones clínicas y otras de utilidad para el reconocimiento de los animales y las plantas que son de interés toxicológico. Sin dejar de lado, que como herramientas pedagógicas, se presentan distintos casos clínicos, que además de ilustrar los cuadros descritos en cada tema, ayudan a integrar los conceptos teóricos con la atención

clínica, y permiten sintetizar los contenidos en un resumen al final de cada capítulo.

En definitiva, se trata de una obra que ha logrado el equilibrio entre los nuevos conocimientos, sin dejar de lado las dimensiones básicas de la toxicología, que en su conjunto da como resultado un texto que atrae al estudioso y se transforma en una herramienta válida para la docencia universitaria. Dando por sentado el éxito que tendrá este libro, donde las opiniones de los profesores y alumnos que la utilicen, lo resaltarán a medida que avancen en su fácil lectura.



PROF. MGTR. ALDO SERGIO SARACCO
Presidente Asociación Toxicológica Argentina

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 de la sección de Acta Toxicológica Argentina en la página web de la Asociación Toxicológica Argentina (<https://toxicologia.org.ar/formulario->

acta/).

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 procesador de texto (Microsoft Word versión 2003 o superior), a doble espacio (incluso los resúmenes, referencias y tablas) con un tamaño

mínimo de letra Arial en 12 puntos. Las páginas deberán numerarse desde la portada. Las letras en negrita o itálica se usarán sólo cuando corresponda.

En la primera página se indicará: título del trabajo, apellido, nombre de autor 1; apellido, nombre de autor 2; apellido, nombre de autor 3; etc.; 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). En los manuscritos en español los números decimales deben indicarse con coma, y los miles con punto. En los manuscritos en inglés, los decimales deben indicarse con punto y los miles, con coma.

Las temperaturas se facilitarán en grados Cel-

sus 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
Número
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 *Acta Toxicológica Argentina* section in the website of the Argentine Toxicological Association (<https://toxicologia.org.ar/formulario-acta/>).

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 Toxicológica 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 an 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, surname, name author 1; surname, name author 2; surname, name author 3; etc. and affiliations of all authors, workplace (name of institution and postal address; if it differs between authors, numerical superscripts, not in parentheses, next to each author should be used to identify it); fax and/or e-mail address of the corresponding author (signaled by a subscript asterisk next to the name).

Second page must include an English title and the abstract, both in the language of submission and in English, each followed by 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. Decimals should be indicated by a point and thousands by a comma.

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...

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

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.

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

Wolf 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 Acta Toxicológica Argentina en la página web de la Asociación Toxicológica Argentina (<https://toxicologia.org.ar/formulario-acta/>).

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. Negri-

to ou itálico ou itálico deve ser usado somente quando apropriado.

Na primeira página deve ser indicado: título do artigo, nomes e sobrenome (sobrenome Autor 1, nome; sobrenome Autor 2, nome; sobrenome Autor 3, nome; etc. etc.) 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 fo-

lha 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 Celsius e as pressões arteriais em milímetros de mercúrio. Todos os valores de parâmetros hematológicos e bioquímicos deverão ser apre-

sentados 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 organiza-

ção, 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

Número

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 editoriais, 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.

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

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>