

Acta Toxicológica Argentina



Vol. 33, Nº1
Año 2025



Asociación
Toxicológica
Argentina

Publicación de la
Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires, Argentina

FOTO DE LA PORTADA:

Amanita muscaria

Lugar: Península San Pedro, Bariloche Río Negro

Autor: Susana Edith Goñi

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, Google Académico, Periódica y Redalyc.



Asociación Toxicológica Argentina

Comisión directiva

Presidente

María Cecilia Travella

Vicepresidente

Patricia A. Lucero

Secretario

María Fernanda Simoniello

Tesorero

Jorge Zavatti

Vocales

Débora J. Perez

Sergio A. Saracco

Silvia C. Cortese

Vocales suplentes

Pedro A. Zeinsterger

Guillermo A. Grau

Horacio J. Trapassi

Órgano de fiscalización

Augusto Piazza

Marcelo Wolansky

Victoria Di Nardo

Comité científico

Ricardo A. Fernandez

Valentina Olmos

Susana I. García

Adriana S. Ridolfi

Flavia A. Vidal

Laura C. Lanari

Tribunal de honor

Edda C. Villaamil Lepori

Marta Carballo

Elda Cargnel

Acta Toxicológica Argentina

Director

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

Comité de redacción

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.*

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.*

Comité de apoyo

Eduardo A. Scarlato, *Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires.*

Gabriela Rovedatti, *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA*

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

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

Natalia Guiñazú, *CITAAC-CONICET, Universidad Nacional del Comahue.*

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

Comité editorial

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Heraldo Nelson Donnenwald, *Universidad Favaloro, Argentina.*

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

Jean-Philippe Chippaux, *Institut de Recherche pour le Développement; Institut Pasteur de París, Francia.*

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

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

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

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

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

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

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

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

Veniero Gambaro, *Università di Milano, Italia.*

ÍNDICE

(CONTENTS)

Comisión directiva	1
Índice	2
Obituario	3
Trabajo Original	
Hepatotoxic effects of low-concentration exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in adult male zebrafish (<i>Danio rerio</i>) <i>Oliveira, Breno Raul Freitas; Soares Neto, José Ribamar; Davico, Carla Eliana; Moreira, Daniele Hummel; Pinheiro, Lucas Cezar; Pereira, Aline Guimarães; Izídio, Geison Souza</i>	4
Imágenes en toxicología	
“Dangerous confusions”: Poisoning by bastard saffron or autumn crocus (<i>Colchicum autumnale</i>) <i>Morón Goñi, Fernando; Goñi, Susana Edith; Damín, Carlos Fabian</i>	17
El poder de lo simple: <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo experimental <i>Ferreira, Melisa Rut; Moran, Yanina Soledad; Gonzales-Moreno, Candelaria; Martínez, Samanta Andrea; Fernandez-Hubeid, Lucia; Virgolini, Miriam Beatriz</i>	19
Instrucciones para los autores	21

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



José Alberto Castro (1933-2024)

Hijo de inmigrantes gallegos llegados a Argentina a principios del siglo pasado, su vida puede resumirse en la de una voluntad (heredada de sus padres) ineludible por concretar sus sueños y comprometerse con los sueños (y problemas) de sus afectos. Joven inquieto, con no poco esfuerzo pudo graduarse en la Licenciatura en Química (FCEN-UBA) a fines de los cincuenta y unos años después doctorarse allí también.

Una beca de CONICET le permitió realizar una estadía de algo más de un año en el Laboratorio de Farmacología Química, en el National Heart and Lung Institute, dependiente del National Institutes of Health (NIH) en EE.UU. Esta formación definió su perfil como toxicólogo y fue así que a su regreso (nuestro regreso) al país pudo conformar un laboratorio de investigación en la entonces CITEFA. Así empezó la historia del CEITOX. El apoyo sostenido por casi treinta años del National Institutes of Health mediante subsidios para la línea principal de investigación del laboratorio (y en última instancia, madre de todas las demás), “Mecanismo de la hepatotoxicidad del tetracloruro de carbono”, fue un reconocimiento a la originalidad de su investigación, en tiempos donde la comprensión de los mecanismos básicos de la toxicidad de las sustancias químicas estaba definiéndose en el mundo.

En muchas de esas ocasiones me tocó ver algo muy particular y notorio para un hijo respecto de su padre; fue darme cuenta del respeto y consideración que su persona tenía en sus pares, que sólo lo conocían por su trayectoria científica a través de su trabajo o por su cruzada permanente por llevar los temas de nuestra especialidad que preocupan a los países subdesarrollados, a los foros científicos del primer mundo. En cierto modo, esta voluntad lo llevó a interesar a sus colegas a fundar la Sociedad Argentina de Toxicología, precursora de nuestra asociación.

Reconocimientos a nivel nacional, como el premio de la Fundación Konex en 1993, el de CEDIFIQUA en 1996 o internacionales como el Merit Award de la Unión Internacional de Toxicología en 2001 o las invitaciones para escribir reviews o capítulos en libros constituyen pruebas de una valoración por su persona y trayectoria que no fue conseguida precisamente mediante las relaciones públicas. Para alguien de carácter tan frontal y poco polite como el suyo, no era algo que se diera con fluidez.

De una lectura rápida de la reseña de su vida profesional podrá interpretarse que la suya no es una biografía estándar en el ámbito de la ciencia, que no fue una persona de hacer concesiones por conveniencia y que tuvo una voluntad inquebrantable para conseguir aquello que soñaba (Castro 2014). Esto siempre le trajo varios problemas con otros pero también fue el factor aglutinante de muchas amistades sinceras que lo acompañaron en la vida.

Este obituario me movió a recordar historias y anécdotas de mi padre. Muchas me tuvieron como testigo o como partícipe, fueron tantos años juntos... Como él nos dijera alguna vez en una sobremesa en casa a mamá y a mí, “somos socios en la vida” ¡Es que hemos compartido todo! La vida familiar y la profesional, en las buenas y en las malas. Para colmo, al no haber formado yo una familia propia, en los últimos años de ambos me volví un poco en padre de mis padres, acompañándolos y cuidándolos en la vejez y sus achaques.

Los tiempos más felices fueron aquellos cuando los tres trabajábamos en el CEITOX, no solamente por el placer de investigar junto con mis viejos, pensar experimentos, discutir resultados (en el laboratorio y en casa) sino también por todas aquellas oportunidades compartidas conociendo lugares hermosos en los viajes por congresos. Pero la vida es un viaje con un final...y ese final llegó. Lo disfrutamos mucho juntos y ahora me quedan los buenos recuerdos. Descansa en paz padre.

Dr. Gerardo Daniel Castro

Castro, J.A. (2014). “Según pasan los años” en *la Toxicología. Ciencia e Investigación – Reseñas*, 2(1): 6-24.

TRABAJO ORIGINAL

Hepatotoxic effects of low-concentration exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in adult male zebrafish (*Danio rerio*)

Efectos hepatotóxicos de la exposición a bajas concentraciones del herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en peces cebra machos adultos (*Danio rerio*)

Oliveira, Breno Raul Freitas¹; Soares Neto, José Ribamar¹; Davico, Carla Eliana¹; Moreira, Daniele Hummel²; Pinheiro, Lucas Cezar²; Pereira, Aline Guimarães¹; Izídio, Geison Souza^{1,2*}

¹Graduate Program of Developmental and Cellular Biology, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil. ²Graduate Program of Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil. 88.040-900, Florianópolis, SC, Brazil. Phone: (55) 48 3721 2816.

* geisonizidio@gmail.com; g.izidio@ufsc.br

Recibido: 26 de enero de 2025

Aceptado: 27 de abril de 2025

Editor: Gabriela Rovedatti

Abstract. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is an herbicide widely used around the world. It has been detected in water samples, with a half-life ranging from 15 to 300 days depending on environmental conditions. This study aimed to investigate the effects of a commercial formulation containing 2,4-D on oxidative stress markers, as well as on liver histopathological and histochemical parameters, in adult male *Danio rerio* for 7 days. The results revealed structural and vascular lesions in the livers of zebrafish across all groups exposed to 2,4-D (at concentrations of 0.03, 0.3 and 3.0 mg/L). Analysis of the Histopathological Alteration Index suggests severe (3.0 mg/L) or moderate (0.03 and 0.3 mg/L) liver impairment in zebrafish exposed to 2,4-D. Exposure to the herbicide also led to a reduction in acid polysaccharides (0.03 and 3.0 mg/L) and glutathione (GSH) levels (at concentrations of 0.03 and 3.0 mg/L), and increased levels of the oxidized glutathione (GSSG) (at concentrations of 0.03 and 0.3 mg/L). No significant changes in lipid peroxidation levels were observed. These findings suggest that as little as 7 days of exposure to permissible concentrations of 2,4-D (0.03 mg/L) or higher (0.3 and 3.0 mg/L) can negatively affect biochemical, histochemical, and histopathological parameters, as well as the integrated biomarker response index in the liver of adult zebrafish. This study provides the first evidence of the hepatotoxic effects of the herbicide 2,4-D in adult male *Danio rerio*.

Keywords: Ecotoxicology; Pollution; Pesticide; Liver; Histopathological; Aquatic environment.

Resumen. Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) es un herbicida ampliamente utilizado en todo el mundo. Se ha detectado en muestras de agua, con una vida media que varía entre 15 y 300 días dependiendo de las condiciones ambientales. Este estudio tuvo como objetivo investigar los efectos de una formulación comercial que contiene 2,4-D sobre los marcadores de estrés oxidativo, así como sobre los parámetros histopatológicos e histoquímicos del hígado en machos adultos de *Danio rerio* durante 7 días. Los resultados revelaron lesiones estructurales y vasculares en los hígados de los peces cebra en todos los grupos expuestos al 2,4-D (a concentraciones de 0,03, 0,3 y 3,0 mg/L). El análisis del Índice de Alteración Histopatológica sugiere un deterioro hepático severo (3,0 mg/L) o moderado (0,03 y 0,3 mg/L) en los peces expuestos al 2,4-D. La exposición al herbicida también condujo a una reducción en los polisacáridos ácidos (0,03 y 3,0 mg/L) y en los niveles de glutatión reducido (GSH) (a concentraciones de 0,03 y 3,0 mg/L), así como a un aumento en los niveles de glutatión oxidado (GSSG) (a concentraciones de 0,03 y 0,3 mg/L). No se observaron cambios significativos en los niveles de peroxidación lipídica. Estos hallazgos sugieren que tan solo 7 días de exposición a concentraciones permitidas de 2,4-D (0,03 mg/L) o superiores (0,3 y 3,0 mg/L) pueden afectar negativamente los parámetros bioquímicos, histoquímicos e histopatológicos, así como el índice de respuesta de biomarcadores integrados en el hígado de peces cebra adultos. Este estudio proporciona la primera evidencia de los efectos hepatotóxicos del herbicida 2,4-D en machos adultos de *Danio rerio*.

Palabras clave: Ecotoxicología; Contaminación; Pesticida; Hígado; Histopatología; Medio acuático.

INTRODUCTION

Large-scale agricultural production has historically relied on pesticide application to address the challenges associated with pest control and soil degradation, both of which threaten crop productivity (Moraes 2019). In recent decades, pesticide sales have significantly increased, with global consumption reaching 3.7 million tons of active ingredients annually (FAO 2022). Only in Brazil, over 800 thousand tons of pesticides were sold in 2022 (IBAMA 2023). Due to their intensive use, pesticides can negatively impact health and the environment through soil and water contamination, harming non-target plants and animals. This reduces biodiversity and affects living organisms, including humans (FAO 2022). Among the classes of pesticides, herbicides are the most widely used and are intended to control weeds (Gupta 2019).

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is a widely used herbicide globally and ranks as the second most sold pesticide in Brazil (IBAMA 2023). This compound belongs to the class of phenoxyacetic acids and serves as the primary active ingredient in over 1,500 chemical formulations (Islam *et al.* 2018). Known for its high selectivity in targeting dicotyledonous plants, 2,4-D is applied as a pre- and post-emergent systemic herbicide across various crops. Acting as a growth regulator, it mimics the plant hormone auxin, disrupting normal growth processes and ultimately leading to plant death (Martins *et al.* 2024). Despite being one of the earliest herbicides developed and a former component of Agent Orange, a defoliant widely used during the Vietnam War and subsequently banned due to its toxic effects, its high efficacy and low cost continue to render it a commercially viable option (Islam *et al.* 2018).

Due to its extensive and widespread use, 2,4-D concentrations have been detected in both surface and drinking water in several countries (Hernández *et al.* 2011; Rodil *et al.* 2012; Ensminger *et al.* 2013; Yamini and Saleh 2013; Tsaboula *et al.* 2016; Martins *et al.* 2024). In aquatic environments, the half-life of 2,4-D can range from 15 to 300 days, depending on environmental conditions (Islam *et al.* 2018), raising increasing concerns about the contamination of water bodies and the exposure of non-target organisms to this environmental pollutant. Brazilian regulatory agencies have been detecting the occurrence of 2,4-D in water samples from surface and groundwater sources, as well as in drinking water (CETESB 2018; PEVASPEA 2023), raising concerns about its presence and potential toxic effects on non-target organisms.

Research on the toxicity of 2,4-D has historically concentrated on several key areas, including herbicide resistance or tolerance, occupational risk, neurotoxicity,

and the effects on non-target species (Zuanazzi *et al.* 2020). Among non-target organisms, fish are excellent bioindicators of environmental contamination, as they are sensitive to different types of pollutants and are frequently used in xenobiotic-induced toxicity studies. Some studies have shown that different fish species are susceptible to 2,4-D toxicity, whose documented effects include alterations in biochemical, morphophysiological and behavioral parameters (DeQuattro and Karasov 2016; Ruiz de Arcaute *et al.* 2016; Dehnert *et al.* 2019). Among fish, the zebrafish *Danio rerio* stands out as a widely used model in areas such as toxicology, pharmacology and neuroscience. Studies using early stages of embryonic and larval development of zebrafish, in short periods of exposure, showed toxic effects induced by 2,4-D during development, which include decreases survival of zebrafish embryos and larvae, changes in hatching rates, different types of malformations, such as pericardial and yolk sac edema, as well as neurological and behavioral changes (Dehnert *et al.* 2019; Gaaiet *et al.* 2020; Martins *et al.* 2021).

In addition to its impact on normal development, the liver is recognized as one of the organs affected by the herbicide 2,4-D. However, most studies investigating the hepatotoxic effects of this herbicide have focused on rodent models or on different fish species exposed to high concentrations of 2,4-D, and in many cases, the sex of the fish used was not specified (Neskovic *et al.* 1994; Cattaneo *et al.* 2008; Matviishyn *et al.* 2014). Because liver detoxification systems in fish are largely driven by hormonal regulation, liver metabolism may differ between males and females, making it important to discriminate the hepatotoxic effects of 2,4-D by considering the sex of the animal. For example, estrogen in females can up- or down-regulate certain enzymes in the liver, leading to differences in how toxins are metabolized (Nebert and Dalton 2006). Moreover, studies on 2,4-D-induced hepatotoxicity in zebrafish are scarce, limited to one study conducted at early stages of development in this model (Martins *et al.* 2021). During these early periods, protective systems are not fully developed, making embryos and larvae particularly susceptible to toxic effects that may be specific to a particular developmental stage (Phelps *et al.* 2020). This increased sensitivity complicates the extrapolation of findings to later developmental stages or other species. Therefore, there is a gap in knowledge regarding the hepatotoxic potential of 2,4-D in adult fish, especially in the zebrafish model.

Given the high commercialization volumes of 2,4-D in Brazil and worldwide, its persistence in the environment, and its detection in rivers and lakes, it is evident that concerns persist regarding the contamination of non-target organisms through water bodies, particularly the potential for liver damage (Martins *et al.* 2024),

which may lead to the development of various diseases, including hepatitis, fibrosis, steatosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (Elufioye and Habtemariam 2019). The aim of the study was to investigate the effects of a commercial formulation containing 2,4-D on liver histopathological and histochemical parameters, oxidative stress markers, and the integrated biomarker response (IBR) index in adult male *D. rerio*.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Adult male fish of the species *Danio rerio* were obtained from aquarium stores in Santa Catarina. They were acclimated for two weeks in the vivarium of the Federal University of Santa Catarina (UFSC). The fish were housed at a stocking density of 1 gram (g) of fish per liter (L) under standardized laboratory conditions. These conditions included dechlorinated and filtered water, a controlled temperature (27 ± 1 °C), a light-dark cycle of 14-10 h. They were fed twice a day with commercial fish food (composition: 46% protein, 6% fat, 1.8% fiber and 9.5% inorganic matter - Ca, F and Mg). Water parameters were monitored daily and maintained within the following ranges: pH 7.0 (± 0.5), 0 ~ 0.25 ppm of toxic ammonia (NH₃), and 0.001 ~ 0.01 ppm of nitrite (NO₂). The conditions for housing the animals, as described above, were in accordance with the Ethics Committee on Animal Use – UFSC (protocol approved by CEUA / UFSC No. 6778251119).

Herbicide

The commercial formulation U46 BR (Nufarm Chemical and Pharmaceutical Industry S/A), containing 806.0 g/L of 2,4-D, was utilized in the experiments. The dilution was prepared using dechlorinated and filtered water, taking into account the concentration of 2,4-D in the formulation.

Experimental Procedures

After the acclimatization period, the animals were randomly divided into 4 groups (n = 35/group): a control group (0.0) and groups exposed to 2,4-D at concentrations of 0.03, 0.3, and 3.0 mg/L. The designated exposure duration was 7 days, due to a lack of literature on the effects of 2,4-D after this duration of exposure. On the 4th day of exposure, the water was completely replaced by a new solution containing the same concentrations of 2,4-D corresponding to each experimental group, ensuring continued exposure to the herbicide. At the end of the 7th day of exposure, the male specimens were euthanized for liver collection. Euthanasia was conducted by immersing the specimens in eugenol at a concentration of 75 mg/L of water. All procedures were

executed in accordance with Normative Resolution No. 37 of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Biochemical Analysis

Liver samples (consisting of 5 livers/sample) were thawed (n=6/group), homogenized in phosphate buffer (0.3 M, pH 7.4), and subsequently centrifuged (10 min, 10,000 rpm, 4 °C). The resulting supernatant was used to determine protein concentration, reduced glutathione (GSH) levels, oxidized glutathione (GSSG) levels, lipid peroxidation (LPO) levels, and NADPH oxidase activity. Protein concentration (mg/mL) was determined by the Bradford method (Kruger 1994), with bovine serum albumin as standard, in an Infinite M200 TECAN microplate reader, measuring absorbance at 595 nm. GSH and GSSG levels were measured as previously described (Rahman *et al.* 2007). Briefly, GSH reacts with dithionitrobenzoic acid (DTNB) to form a conjugate (GSH-TNB), which was measured by spectrophotometry at 412 nm, using a GSH concentration curve as the standard. The GSSG measurement was based on its reduction to GSH by glutathione reductase, which reduces all GSSG to GSH. Subsequently, free GSH levels were measured using a reaction with DTNB. To calculate GSSG, the GSH measurement was subtracted by GSH measurement after glutathione reductase, this difference was the GSSG concentration (Huber *et al.* 2008). The end product of lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA), was measured in tissue homogenates through its reaction with thiobarbituric acid (TBA), forming a pink-colored fluorescent complex. The MDA produced was determined by the fluorescence of the MDA-TBA complex, with excitation at 515 nm and emission at 553 nm, using MDA as the standard (Ohkawa *et al.* 1979). To evaluate NADPH oxidase enzyme activity, 1.25 µL of 10 mM lucigenin were inserted per well, together with NADPH buffer (50 mM PBS, 0.01 mM EDTA, pH 7.40). An initial reading was taken to determine the background signal. Then, 25 µL of 10 mM NADPH were added per well, and continuous readings were taken for 15 min at 37 °C to evaluate luminescence (Janiszewski *et al.* 2002).

Histological Analysis

For using light microscopy analyzes, liver samples were dissected, fixed in alcoholic Bouin solution for 24 h and subsequently preserved in 70% ethanol (n = 3/group). Following this, the samples were dehydrated in an ascending ethanolic series 70% - 100%, clearing in xylene and embedding in paraffin. Tissue sections of 6 µm thickness were obtained using a Leica RM2255 rotary microtome at the “Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia” (LAMEB). The resulting slides were then subjected for staining techniques with Hematoxy-

lin and Eosin (HE), and Toluidine Blue (TBO).

For morphological analyses of the liver samples, 10 photomicrographs were analyzed per animal, totaling 30 photos per group. Evaluations were performed by calculating the Histological Alteration Index (HAI), which considers the frequency and severity of each histological change (lesion). Lesions were categorized into progressive stages based on tissue function impairment, following the criteria outlined by Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994), using the formula:

$$\text{HAI} = 10^0 \cdot \Sigma^I + 10^1 \cdot \Sigma^{II} + 10^2 \cdot \Sigma^{III}$$

Σ^I , Σ^{II} , and Σ^{III} represent the total number of changes according to their respective stage, while 10^0 , 10^1 , and 10^2 are the factors used to calculate the HAI, based on the severity of the injury. HAI values ranging from 0 to 10 indicate normal organ function; 11 to 20 suggest slight damage; 21 to 50 indicate moderate damage; 50 to 100 indicate severe damage, and values exceeding 100 indicate irreversible tissue damage, as adapted from Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994). The stained sections were photographed using an Olympus BX41 upright microscope, and images were captured with the Q-imaging 3.3-megapixel color digital camera and the Q-imaging Q-capture Pro 5.1 image capture software. Slides stained with TBO were used to examine the histochemical profile of acidic polysaccharides, employing integrated density analysis with ImageJ software (Schneider *et al.* 2012; Hartig 2013). In this analysis, the photomicrograph is converted to an 8-bit grayscale, and squares of defined area were employed for all measurements. These squares were randomly positioned within the image, and six areas of 4588.23 μm^2 each were measured in each section. The data were then extracted and plotted using GraphPad Prism statistical software for further analysis.

Integrated Biomarkers Response (IBR)

The Integrated Biomarker Response (IBR) is a technique used in ecotoxicological studies to analyze and integrate the responses of different biomarkers in organisms exposed to environmental stressors, and it was determined according to Beliaeff and Burgeot 2002. Based on the data collected for the different biomarkers analyzed in this study [Reduced glutathione levels (GSH), Oxidized glutathione levels (GSSG), NADPH oxidase activity (NADPH), Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), Integrated density of acidic polysaccharides by toluidine blue-stained sections, and Histopathological Alteration Index (HAI)], the values of each biomarker in liver of fish exposed to 2,4-D (0.03, 0.3, and 3.0 mg/L) were compared to the mean of the control group. Subsequently, the logarithm of each ratio [$\text{Log}(Y_i+1)$] was calculated, followed by the determination of the mean (μ) and standard deviation (σ). The logarithmized values (Y_i) were standardized to com-

pare the responses of the different biomarkers using the formula [$Z_i = (Y_i - \mu)/\sigma$]. Then, the difference between the standardized values of the exposed groups (Z_i) and the control group (Z_o) was calculated for each biomarker ($A = Z_i - Z_o$). The resulting difference value (A) was used to represent the deviation of each biomarker in the different experimental groups subjected to 2,4-D relative to the control group, using a radar graph. The IBR index was then obtained by summing all the absolute values of A for the different biomarkers for each experimental group ($\text{IBR} = \sum |A_i|$).

Statistical Analysis

Results are presented as mean $\pm$ standard error. The data were subjected to the Kolmogorov-Smirnov normality test, and outliers were identified using the ROUT method. Identified outliers resulted in the removal of the respective animal from the analysis. Statistical analyses were performed using one-way Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey's post-test, in GraphPad Prism version 8.0.2 software. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Study images were captured using Adobe Photoshop CS6 software.

RESULTS

Effects induced by 2,4-D on markers of oxidative stress in the liver

Exposure to the herbicide 2,4-D induced changes in the levels of the GSH in the liver of zebrafish [$F(3,19) = 8.247$, $p < 0.001$], resulting in decreased GSH levels in the 0.03 and 3.0 mg/L groups of 2,4-D ($p < 0.01$). The levels of the GSSG were also affected by 2,4-D [$F(3,18) = 4.404$, $p < 0.05$], with significant increases observed in the groups exposed to 0.03 and 0.3 mg/L of 2,4-D ($p < 0.05$). While evaluating the activity of the NADPH oxidase enzyme in the liver, no significant differences were found compared to the control group, but rather between the groups exposed to 2,4-D [$F(3,20) = 3.124$, $p < 0.05$], where the 0.3 mg/L group exhibited higher activity compared to the 0.03 mg/L group of 2,4-D ($p < 0.05$). Regarding lipid peroxidation levels (expressed as MDA), no changes were observed in the liver of zebrafish after exposure to the 2,4-D herbicide (Figure 1).

Histopathological and histochemical changes in the liver after exposure to 2,4-D

The histopathological analysis of the liver of adult male zebrafish *D. rerio* is shown in Figure 2. The normal liver structure primarily comprises hepatocytes, blood vessels, and blood cells traversing these vessels (Figure 2A). In zebrafish exposed to concentrations of 0.03, 0.3 and 3.0 mg/L of 2,4-D, structural and vascular le-

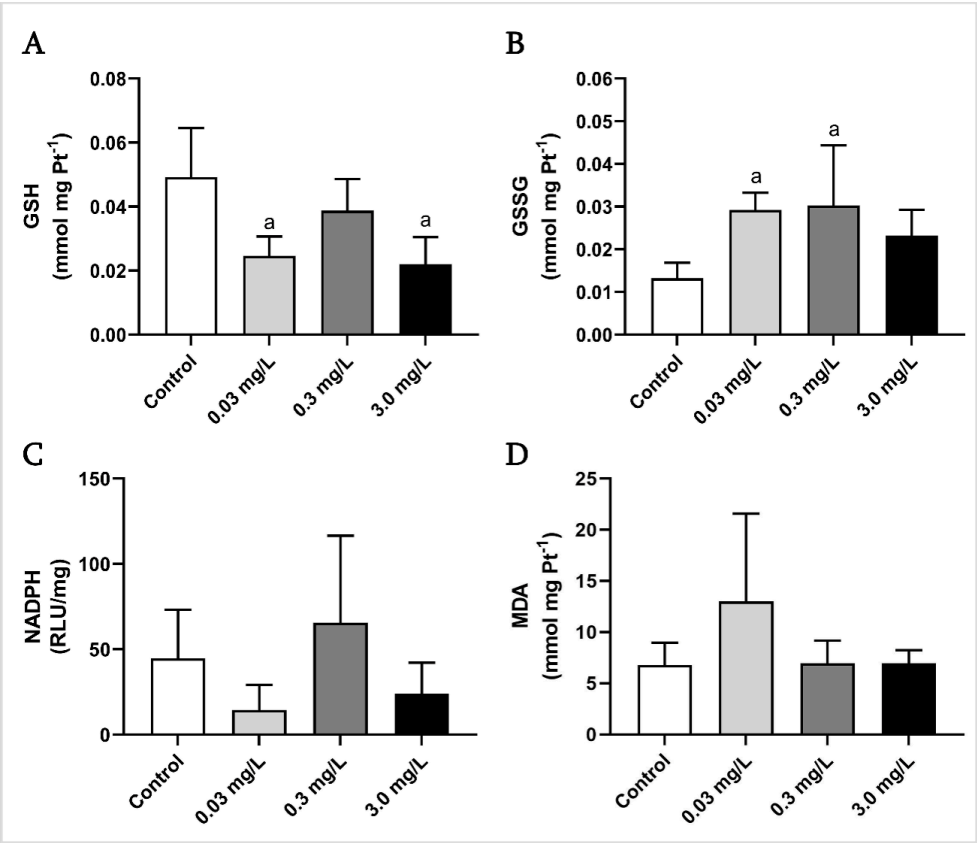


Figure 1. Oxidative stress markers in the liver of adult male zebrafish (*Danio rerio*), control and exposed to 2,4-D (0.03; 0.3; 3.0 mg/L) for 7 days. A) GSH (reduced glutathione) (mmol mg Pt⁻¹); B) GSSG (oxidized glutathione) (mmol mg Pt⁻¹); C) NADPH oxidase (RLU/mg); D) MDA (malondialdehyde) (mmol mg Pt⁻¹). (a)Significantly different ($p < 0.05$) from control evaluated by ANOVA followed by Tukey post-test.

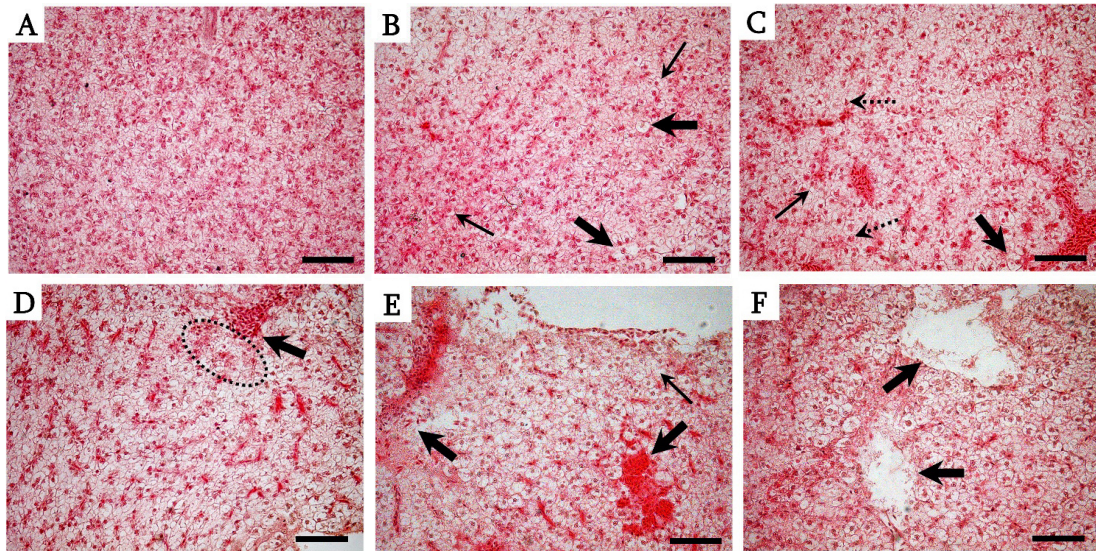


Figure 2. Histopathological changes in liver tissue of adult male zebrafish (*Danio rerio*), control and exposed to 2,4-D (0.03; 0.3; 3.0 mg/L) for 7 days. (A) Control; (B) Exposed to concentrations of 0.03 mg/L of 2,4-D with the presence of cytoplasmic vacuoles (thin arrow) and cellular hypertrophy (thick arrow); (C and D) Fish exposed to a concentration of 0.3 mg/L of 2,4-D. In (C) there is the presence of vacuoles (thin arrow), deformation in the morphology of the nucleus (dashed arrow) and cellular hypertrophy (thick arrow) and in (D) we observe hyperemia (thick arrow) and tissue disarray (dashed circle); (E and F) Fish exposed to 3.0 mg/L 2,4-D. In (E) hemorrhage (thick arrow) and loss of cell boundaries (thin arrow) are observed, and in (F) points of necrosis are observed in the tissue (thick arrows). Color: HE. Bar scale: 50 μ m.

Table 1. Frequency table of histopathological lesions according to their stage in the liver of adult male zebrafish (*C. d. rerio*), control and after exposure to the herbicide 2,4-D (0.03; 0.3; 3.0 mg/L) for 7 days.
 - = Absent or rarely frequent; + = Infrequent; ++ = Moderately frequent; +++ = Very frequent.

Histological changes	Stage	Groups (mg/L)			
		Control	0.03	0.3	3.0
Vacuolation	I	+	++	+++	+++
Tissue disarray	I	+	++	++	+++
Cytoplasmic hypertrophy	I	+	+	++	+++
Nuclear hypertrophy	I	-	+	+	+
Nuclear deformation	I	-	++	++	++
Cell membrane rupture	II	-	+	+	++
Sinusoidal expansion	I	+	++	+	+
Hyperemia (vascular congestion)	I	+	+	++	++
Bleeding	II	-	+	++	++
Necrosis	III	-	-	-	++

sions were observed in the liver tissue. The predominant lesions included vacuolization, cellular and nuclear hypertrophy, nucleus deformation, tissue disarray, sinusoid dilation, hyperemia and in some instances, hemorrhages and necrosis (*Figures 2B-F*). No deaths of zebrafish were found in any of the groups evaluated in the study.

Histopathological analyses of zebrafish livers exposed to 2,4-D demonstrated an increase incidence of tissue lesions compared to the control group (*Table 1*). Calculation of the Histopathological Alteration Index (HAI) revealed a significant difference [$F(3,8) = 7.60$; $p < 0.01$] of the 3.0 mg/L 2,4-D group compared to the control group ($p < 0.01$) and also compared to the other exposed groups ($p < 0.5$). The HAI of the control group indicates healthy liver function (range of 0 to 10), the 0.03 and 0.3 mg/L groups exhibited higher values within the range of 20 to 50, indicating moderate liver tissue damage. Notably, the group exposed to 3.0 mg/L demon-

strated an HAI value exceeding 100, indicating that the organ presents irreparable tissue damage and suggesting a serious impairment of the organ (*Figure 3*).

The analysis of acidic polysaccharides through TBO labeling demonstrated that exposure to 2,4-D can affect the levels of these molecules in the liver of zebrafish [$F(3,716) = 47.27$, $p < 0.001$]. It was observed that the groups exposed to 0.03 and 3.0 mg/L of 2,4-D showed a decrease in relation to the control group ($p < 0.001$). Additionally, the 3.0 mg/L of 2,4-D group exhibited lower levels of acidic polysaccharides compared to the other groups exposed to 2,4-D ($p < 0.001$, for both groups) (*Figure 4*).

Integrated Biomarker Response (IBR) analysis

The IBR results shown in the radar graph indicate that all exposed groups (0.03, 0.3, and 3.0 mg/L of 2,4-D) exhibited changes in the biomarkers analyzed in the liver of adult male zebrafish after 7 days. The deviations in

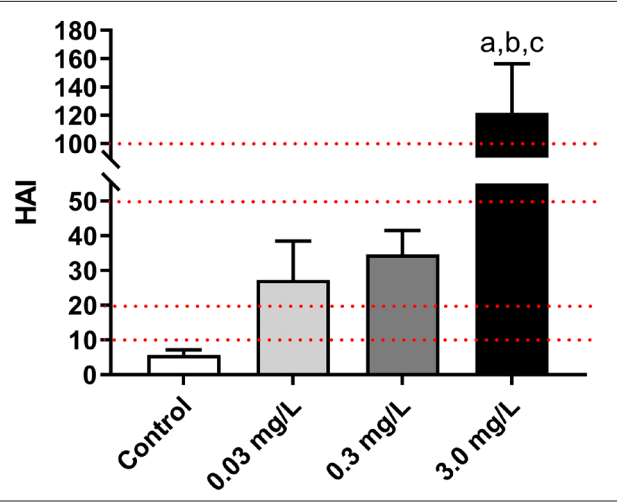


Figure 3. Histopathological Alteration Index (HAI) of the liver of adult male zebrafish (*Danio rerio*), control and exposed to the herbicide 2,4-D (0.03; 0.3; 3.0 mg/L) for 7 days. The red dotted lines delimit each range (0 to 10 - healthy; 11 to 20 - mild damage; 21 to 50 - moderate damage; 50 to 100 - severe damage and above 100 - irreparable damage). Data are presented as means $\pm$ SEM. Significantly different ($p < 0.05$) from control (a), (b) 0.03 mg/L 2,4-D, and (c) 0.3 mg/L 2,4-D evaluated by ANOVA followed by Tukey's post-test.

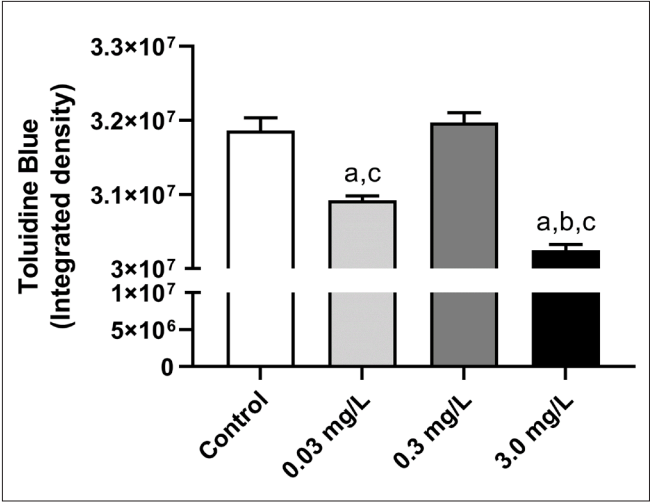


Figure 4. Integrated density graph of acidic polysaccharides labeled with toluidine blue in hepatocytes of adult male zebrafish (*Danio rerio*), control and exposed to the herbicide 2,4-D (control, 0.03, 0.3, and 3.0 mg/L) for 7 days. Data are presented as means $\pm$ SEM. Significant differences ($p < 0.05$) from the control are indicated by (a), from 0.03 mg/L 2,4-D by (b), and from 0.3 mg/L 2,4-D by (c), as determined by ANOVA followed by Tukey's post-test.

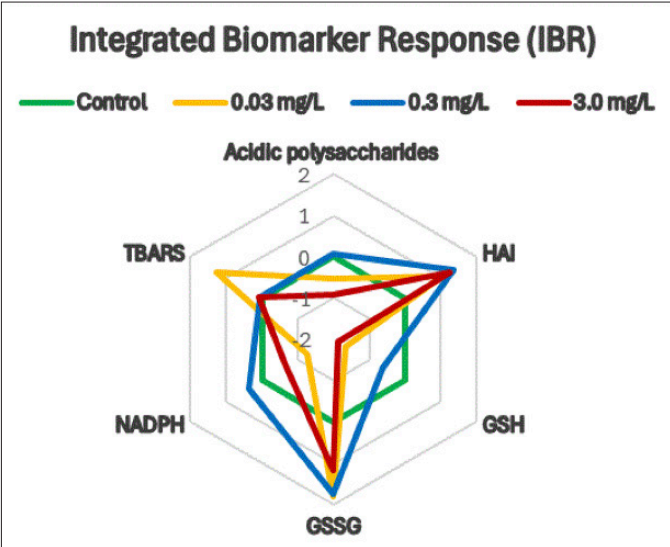


Figure 5. Integrated Biomarker Response (IBR) values for each biomarker evaluated in the liver of adult male zebrafish (*Danio rerio*), in control and groups exposed to the herbicide 2,4-D (0.03, 0.3, and 3.0 mg/L) for 7 days. Biomarkers: Reduced glutathione levels (GSH), Oxidized glutathione levels (GSSG), NADPH oxidase activity (NADPH), Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), Integrated density of acidic polysaccharides in toluidine blue-stained sections, and Histopathological Alteration Index (HAI). For the control group, the IBR value = 0.

biomarker levels, both positive and negative, were more pronounced for the oxidative stress biomarkers GSH and GSSG, suggesting that they are the most sensitive to 2,4-D exposure and indicative of increased oxidative stress. The IBR index values were 7.54, 4.23, and 5.96 for the groups exposed to 0.03, 0.3, and 3.0 mg/L of 2,4-D, respectively. These findings suggest that the highest IBR index, reflecting the greatest modulation of biomarkers, was observed in the group exposed to the lowest concentration tested (0.03 mg/L), followed by the highest concentration (3.0 mg/L) of 2,4-D (Figure 5).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated for the first time that the herbicide 2,4-D significantly impacts the liver of adult male *D. rerio*, affecting its biochemical, histochemical, and histopathological parameters. In the present study, oxidative stress markers, histochemical and histochemical parameters, as well as IBR index were used to assess the impact of short-term exposure to low concentrations of a commercial 2,4-D formulation on the liver of adult male *D. rerio*. Hepatotoxic compounds can disrupt cellular processes by causing reducing antioxidant levels, and oxidative stress, promoting cell and liver tissue damage, which can lead to the development of liver disease (Elufioye and Habte-

mariam 2019). The safety of 2,4-D is a topic of ongoing research and debate. Regulatory agencies like the Environmental Protection Agency (EPA) and World Health Organization (WHO) have determined that, when used according to approved guidelines, 2,4-D poses minimal risk to human health. However, its safety can depend on various factors, including exposure levels and individual susceptibility. Studies suggest that long-term or high-level exposure to 2,4-D may lead to health risks, including histopathological damage to different organs and disruption of the endocrine system (Wisconsin Department of Health Services 2023).

In the liver tissue of adult male zebrafish, our results showed that 2,4-D exposure led to a decrease in GSH levels in the groups exposed to 0.03 and 3.0 mg/L of 2,4-D, along with an increase in GSSG levels in the groups exposed to 0.03 and 0.3 mg/L of 2,4-D. These findings suggest that 2,4-D induces the generation of oxidative molecules, causing the liver to utilize GSH to neutralize and mitigate oxidative damage. Simultaneously, the increase in GSSG reflects the oxidation of GSH during this protective process. The GSH molecule, vital for xenobiotics metabolism and cellular defense against oxidative stress (Huber *et al.* 2008), executes its protective function by promoting the reduction of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide and superoxide anion. GSH undergoes oxidation and is converted into GSSG. Subsequently, GSSG is regenerated back into GSH through the catalytic cycle (Huber *et al.* 2008). These findings are consistent with other studies on various fish species that examined the effects of commercial formulations of the herbicide 2,4-D. These studies linked 2,4-D exposure to increased oxidation or the production of oxidative by-products, leading to elevated ROS levels and alterations in antioxidant enzymes and molecules across different fish organs (Oruç and Üner 2000; Oruc *et al.* 2004).

Another important aspect is that, in addition to acting against oxidative stress, GSH also plays a key role in the metabolism of xenobiotics. This occurs through its conjugation with xenobiotics via the enzyme glutathione-S-transferase (GST), which renders these compounds less toxic and more water-soluble, thereby facilitating their elimination (Huber *et al.* 2008; Chowdhury and Saikia 2020). Exposure to 3.0 mg/L of 2,4-D caused a decrease in GSH but did not change the levels of GSSG and NADPH, suggesting that this decrease may be due to the formation of GSH/xenobiotic conjugates and their elimination.

Liver tissue serves several vital metabolic functions, including carbohydrate metabolism, lipid storage, synthesis and oxidation of fatty acids, glycogen storage, plasma protein synthesis, hormone metabolism and clearance, and detoxification (Hinton *et al.* 2001; Ferguson 2006;

Yao *et al.* 2012; Heath 2018). Those roles render liver cells particularly susceptible to oxidative stress induced by toxic agents (Elufioye and Habtemariam 2019). Decreased antioxidant response and induction of oxidative stress led to cellular and tissue damage, as evidenced by increased MDA levels (Martins *et al.* 2024). MDA, a product of lipid peroxidation, especially of polyunsaturated fatty acids, serves as a common marker of oxidative stress and damage to lipids and cell membranes. Although the evaluation of MDA levels in the liver of zebrafish did not show significant changes at any concentration tested in this study, the modifications in antioxidant defenses induced by 2,4-D appear to have been regulated in a way that prevents increases in lipid peroxidation, likely due to resistance to oxidative stress through antioxidant mechanisms. A similar result was observed in the fish *Oreochromis niloticus* when exposed to a high concentration of the commercial formulation of 2,4-D (27 ppm) for a shorter period of time (96 h) (Oruç and Üner 2000).

While lipid peroxidation was not detected in the liver, histopathological analysis indicated liver toxicity induced by exposure to a commercial formulation of 2,4-D. Therefore, it is reasonable to postulate that other mechanisms contribute to this toxicity, such as protein and enzyme oxidation or the covalent binding of 2,4-D and its metabolite (2,4-dichlorophenoxyacetyl-S-acyl-CoA) to liver proteins, potentially compromising their function and inducing degradation, as observed in previous studies (Di Paolo *et al.* 2001; Li *et al.* 2003; Matviishyn *et al.* 2014; Tichati *et al.* 2020). This study did not assess whether protein oxidation or the formation of protein/2,4-D conjugates are involved in the mechanisms underlying liver toxicity in zebrafish, leaving this question open for future investigation. It is important to note that, despite 2,4-D being a very old pesticide with a long history of use, its full impact on non-target organisms, such as fish, remains incompletely understood (Mahmood *et al.* 2016; Marcato *et al.* 2017).

In our study, just one week of exposure to the commercial formulation of the herbicide 2,4-D induced several histopathological changes in the liver of zebrafish, including increased vacuolization, tissue disarray, cellular and nuclear hypertrophy, nuclear deformation, cell membrane rupture, and necrosis—the latter occurring at the highest concentration tested (3.0 mg/L of 2,4-D). Additionally, vascular alterations such as sinusoidal dilation, hyperemia characterized by vascular congestion, and hemorrhages were observed. Similar histopathological changes have been reported in previous studies following exposure to 2,4-D. Cattaneo *et al.* (2008) observed that *Rhamdia quelen* fish presented abnormal arrangement of hepatic cords, cell membrane rupture, and vacuolation of hepatocytes after exposure

to 700 mg/L of 2,4-D (commercial formulation) for 96 h. In guppies (*Viviparous Poecilia*), acute exposure (96 h) to 20 µL/L of the commercial formulation of 2,4-D resulted in an increase in vacuolation and cytoplasmic damage, while a concentration of 40 µL/L also caused vascular damage such as sinusoid vasodilation and vascular congestion (Vigário and Sabóia-Morais 2014).

The most frequent lesions identified in our study were vacuolization, cytoplasmic hypertrophy, and tissue disarray. Vacuolization, characterized by the formation of vacuoles in the cell cytoplasm, may indicate stored energy in the form of glycogen or lipids, or it may represent a pathological change involving the disruption of organelles such as the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, and/or the accumulation of fluid in the cytoplasm (Braunbeck 1998). Although the exact mechanisms behind vacuolization in our study are not fully understood, the alterations in organelles and cytoplasmic fluid accumulation observed in fish exposed to 2,4-D suggest disruptions in energy metabolism-related processes (Cattaneo *et al.* 2008). Therefore, it is reasonable to consider that this increase in vacuolization is due to changes in organelle structure and/or fluid accumulation in the cytoplasm, induced by exposure to 2,4-D. Further studies are needed to clearly understand the cellular events triggered by 2,4-D that contribute to this phenomenon.

In our study, cytoplasmic hypertrophy was moderately frequent at 0.3 mg/L and very frequent at 3.0 mg/L of 2,4-D, consistent with its progressive nature, which indicates that higher concentrations may lead to greater accumulation of changes in hepatocytes (Bernet *et al.* 1999). Tissue disruption and the consequent alteration of liver tissue architecture may be associated with 2,4-D-induced cytoskeletal changes. Structural reorganization and redistribution of microtubules and microfilaments, which disrupt organelle distribution, increase intracellular space, and impair hepatocyte interactions, have been previously described as effects induced by 2,4-D (Zhao *et al.* 1987). Similar changes in cytoarchitecture were observed in previous studies in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to a high concentration of commercial 2,4-D formulation (700 mg/L) (Cattaneo *et al.* 2008).

Vascular changes observed in zebrafish exposed to 2,4-D included sinusoidal dilation, hyperemia, and hemorrhage in liver tissue. These alterations may reflect an adaptive response aimed at increasing blood flow to facilitate the transport of defense cells and enhance tissue oxygenation (Santos *et al.* 2018). Given the liver's key role in the metabolism and circulation of xenobiotics, it is recognized as a primary target organ for chemical-induced tissue damage. In fish exposed to toxic agents, elevated hepatic blood flow can trigger vascular dilation and hyperemia, supporting hepato-

cyte catabolism and detoxification while promoting tissue oxygenation (Hinton *et al.* 2001). These processes may lead to increased hepatic vascular pressure, potentially resulting in vascular endothelial rupture. Moreover, pure 2,4-D has been shown to reduce the expression and levels of tight junction proteins in endothelial cell membranes, which can further contribute to endothelial rupture and subsequent bleeding (Pasandi *et al.* 2017).

Histopathological biomarkers are widely used to assess the toxic effects of xenobiotics in fish, serving as sensitive tools to diagnose both direct and indirect toxic effects on organisms. In this study, we used TBO, a dye with clinical utility (Sridharan and Shankar 2012), to label acidic polysaccharides in the zebrafish liver following 2,4-D exposure. Acidic polysaccharides containing uronic acid, such as glycosaminoglycans (GAGs), are commonly found in animal tissues, primarily in the extracellular matrix and mucous secretions (Cao *et al.* 2015). Among the GAGs are chondroitin sulfate, hyaluronic acid, and heparin, with heparin being particularly abundant in the liver of fish (Song *et al.* 2017). Studies have shown that GAGs like heparin and hyaluronic acid can undergo degradation as a result of oxidative stress (Sies 1987; Duan and Kasper 2011; Chowdhury and Saikia 2020). Given the ability of 2,4-D to induce ROS, the observed reduction in acidic polysaccharides might be linked to ROS-mediated degradation, specifically impacting heparin and other GAGs present in the liver (Tayeb *et al.* 2012; Pasandi *et al.* 2017).

The impact of 2,4-D on the liver of male zebrafish was assessed by considering both the severity and frequency of each lesion using the Histopathological Alteration Index (HAI) (Poleksic and Mitrovic-Tutundzic 1994). The significantly elevated HAI value in the 3.0 mg/L group was primarily driven by tissue necrosis, a severe form of damage that carries substantial weight due to its critical implications. In contrast, the 0.03 and 0.3 mg/L groups exhibited HAI values indicative of moderate tissue damage. This finding is particularly alarming from a biological and environmental perspective, as 0.03 mg/L of 2,4-D is the maximum concentration permitted for human consumption and for aquatic environments in Brazil (Brazil, Ordinance GM/MS No. 88, of May 4, 2021; Brazil, resolution No. 357, of March 17, 2005). Even more concerning is the fact that concentrations higher than 0.3 mg/L have been detected in aquatic ecosystems near plantations in Brazil (CETESB 2018).

The integrated biomarker response index (IBR) is a tool that synthesizes the responses of biological parameters to contaminants, aiding in the interpretation of biomarker results. Initially proposed by Beliaeff and Burgeot (2002), the IBR has been adopted in biomonitoring

and ecotoxicological bioassays. More recently, it has been used to assess the effects of contaminants on oxidative status and to simplify the interpretation of relationships between multiple biomarker responses and contamination levels (Caliani *et al.* 2021; Boudjema *et al.* 2023). A higher IBR value indicates a more intense response to exposure, suggesting a greater impact of the environmental stressor on the organism. In our study, the highest IBR index was observed in the group exposed to a concentration of 0.03 mg/L of 2,4-D, a level considered environmentally safe. According to the World Health Organization (WHO 2017), the maximum recommended concentration of 2,4-D in drinking water is 0.03 mg/L (or 30 µg/L). This limit is theoretically established based on prolonged exposure, with the assumption that it would not cause adverse health effects over a person's lifetime.

Finally, we acknowledge as a limitation of this study the absence of control groups using the vehicles present in the commercial formulation. This prevents a precise distinction between the toxic effects of the active ingredient (2,4-D) and those potentially caused by the solvents or emulsifiers included in the formulation. Additionally, the product label and package insert did not clearly disclose the identity or concentration of these other components. Notably, it is well recognized that so-called "inert" ingredients can sometimes be more harmful than the active compound itself (Roddam *et al.* 2025). Therefore, the results of this study should be interpreted with caution in light of this methodological limitation.

CONCLUSION

The data obtained in this study indicate that the herbicide 2,4-D significantly impacts the liver of adult male *D. rerio*, affecting its biochemical, histochemical, and histopathological parameters. Notably, even at the permitted concentration of 0.03 mg/L, 2,4-D was sufficient to trigger oxidative stress and cause moderate liver damage after only 7 days of exposure. At higher concentrations (3.0 mg/L), severe necrotic damage was evident. While antioxidant defenses in the zebrafish liver seemed to mitigate lipid peroxidation, the overall tissue damage suggests that 2,4-D poses a clear hepatotoxic threat. Importantly, this is the first study to demonstrate 2,4-D-induced hepatotoxicity in adult male zebrafish. These findings raise serious concerns about the intensive use of 2,4-D and its increasing presence in aquatic ecosystems, underscoring the urgent need for further research to fully understand its toxic effects on non-target organisms, as well as the need to review the maximum permitted concentrations for human consumption and aquatic environments.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Federal University of Santa Catarina (Brazil) for the facilities, the "Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia" (LAMEB) for the facilities and analyses, and "Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo" for assistance in obtaining samples. B. R. F. Oliveira and D. H. Moreira are supported by a scholarship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). C. E. Davico was supported by a scholarship from CAPES. G.S.I. was supported by a postdoctoral fellowship from CAPES/PRINT.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

REFERENCES

- Beliaeff B, Burgeot T. 2002. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 6:1316-22.
- Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T. 1999. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. 22:25-34. doi:10.3354/dao061137.
- Boudjema K, Moulai-Mostefa N, Badis A. 2023. Modeling integrated biomarker response (IBR) index for the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) exposed to heavy metal mixture using the ccf design. *Ecotoxicology* 32(4): 487-501. doi:10.1007/s10646-023-02654-7.
- Braunbeck T. 1998. Cytological alterations in fish hepatocytes following *in vivo* and *in vitro* sublethal exposure to xenobiotics - structural biomarkers of environmental contamination. In: Braunbeck T, Hinton DE, Streit B, editors. *Fish ecotoxicology*. Boston; Berlin: Springer Basel AG. p. 61-140.
- Caliani I, Campani T, Conti B, Cosci F, Bedini S, D'Agostino A, Ammendola A, Di Noi A, Gori A, Casini S. 2021. Multi-biomarker approach and IBR index to evaluate the effects of different contaminants on the ecotoxicological status of *Apis mellifera*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 208:111486. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111486.
- Cao J, Wen C, Lu J, Teng N, Song S, Zhu B. 2015. Characterization of acidic polysaccharides from the mollusks through acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*. 130:268-74. doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.006.

- Cattaneo R, Loro VL, Spanevello R, Silveira FA, Luz L, Miron DS, Fonseca MB, Moraes BS, Clasen B. 2008. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 92(3):133–37. doi:10.1016/j.pestbp.2008.07.004.
- [CETESB]. 2018. Companhia Ambiental Do Estado de São Paulo. Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo. São Paulo.
- Chowdhury S, Saikia SK. 2020. Oxidative stress in fish: A review. *Journal of Scientific Research* 12(1):145–60. doi:10.3329/jsr.v12i1.41716.
- Dehnert GK, Karasov WH, Wolman MA. 2019. 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Containing Herbicide Impairs Essential Visually Guided Behaviors of Larval Fish. *Aquatic Toxicology*. 2091–12. doi:10.1016/j.aquatox.2019.01.015.
- DeQuattro ZA, Karasov WH. 2016. Impacts of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid aquatic herbicide formulations on reproduction and development of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 35(6):1478–88. doi:10.1002/etc.3293.
- Di Paolo O, Duffard AME, Duffard R. 2001. *In vivo* and *in vitro* binding of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to a rat liver mitochondrial protein. *Chemico-Biological Interactions*. 137(3):229–41. doi:10.1016/S0009-2797(01)00255-1.
- Duan J, Kasper DL. 2011. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology*. 21(4):401–9. doi:10.1093/glycob/cwq171.
- Elufioye TO, Habtemariam S. 2019. Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: insight into its mechanisms of action. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 112:108600.
- Ensminger MP, Budd R, Kelley KC, Goh KS. 2013. Pesticide occurrence and aquatic benchmark exceedances in urban surface waters and sediments in three urban areas of California, USA, 2008–2011. *Environmental Monitoring and Assessment*. 185(5):3697–710. doi:10.1007/s10661-012-2821-8.
- [FAO]. Food and Agriculture Organization. 2022. Pesticides use. <https://www.fao.org/faostat/en/?#data/RP/visualize>.
- Ferguson HW. 2006. Systemic pathology of fish. Second Edition. London: Scotian Press.
- Gaaied S, Oliveira M, Domingues I, Banni M. 2020. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide effects on zebrafish larvae: development, neurotransmission and behavior as sensitive endpoints. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(4):3686–3696. doi:10.1007/s11356-019-04488-5.
- Gupta PK. 2019. Herbicides and fungicides. pp. 1–1170. In Gupta C, editor. *Biomarkers in Toxicology*. Elsevier.
- Hartig SM. 2013. Basic image analysis and manipulation in ImageJ. *Current Protocols in Molecular Biology*. (SUPPL.102):1–12. doi:10.1002/0471142727.mb1415s102.
- Heath AG. 2018. Water pollution and fish physiology. 2nd ed. Virginia: Lewis Publishers.
- Hernández AA, Silva MR, Moya CA. 2011. Compuestos organo-persistentes y daño genético en núcleos hepáticos de *Goodea atripinnis* del lago de chapala. *Scientia-CUCBA*. 13(1–2):1–8. <https://www.researchgate.net/publication/283516888>.
- Hinton DE, Segner H, Braunbeck T. 2001. Toxic Responses of the liver. In: Schlenk D, Benson WH, editors. *Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts*. p. 248–99. London; New York: Taylor & Francis.
- Huber PC, Almeida WP, Fatima A. 2008. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. *Quimica Nova*. 31(5):1170–1179.
- [IBAMA]. 2023. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.. Painéis de informações de agrotóxicos - painel de informações sobre a comercialização de agrotóxicos e afins no brasil - Série Histórica 2009 - 2022. <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos>.
- Islam F, Wang J, Farooq MA, Khan MSS, Xu L, Zhu J, Zhao M, Muñoz S, Li QX, Zhou W. 2018. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environment International*. 111():332–51. doi:10.1016/j.envint.2017.10.020.
- Janiszewski M, Souza HP, Liu X, Pedro MA, Zweier JL,

- Laurindo FRM. 2002. Overstimulation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. *Free Radical Biology and Medicine*. 32(5):446-53. doi:10.1016/S0891-5849(01)00828-0.
- Kruger NJ. 1994. The Bradford method for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology*. 32:9-15.
- Li C, Grillo MP, Benet LZ. 2003. *In vitro* studies on the chemical reactivity of 2,4-dichlorophenoxyacetyl-s-acyl-coa thioester. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 187(2):101-9. doi:10.1016/S0041-008X(02)00043-1.
- Mahmood I, Imadi SR, Shazadi K, Gul A, Hakeem KR. 2016. Effects of pesticides on environment. pp. 253-69 in *Plant, Soil and Microbes: Volume 1: Implications in Crop Science*.
- Marcato ACC, Souza CP, Fontanetti CS. 2017. Herbicide 2,4-D: A review of toxicity on non-target organisms. *Water, Air, and Soil Pollution*. 228(120):1-12. doi:10.1007/s11270-017-3301-0.
- Martins RX, Carvalho M, Maia ME, Flor B, Souza T, Rocha TL, Félix LM, Farias D. 2024. 2,4-D herbicide-induced hepatotoxicity: unveiling disrupted liver functions and associated biomarkers. *Toxics*. 12(1):35. doi:10.3390/toxics12010035.
- Martins RX, Vieira L, Souza JACR, Silva MGF, Muniz MS, Souza T, Queiroga FR, Machado MRF, Silva PM, Farias D. 2021. Exposure to 2,4-D herbicide induces hepatotoxicity in zebrafish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*. 248:109110. doi:10.1016/j.cbpc.2021.109110.
- Matviishyn TM, Kubrak OI, Husak VV, Storey KB, Lushchak VI. 2014. Tissue-specific induction of oxidative stress in goldfish by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: mild in brain and moderate in liver and kidney. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 37(2):861-69. doi:10.1016/j.etap.2014.02.007.
- Moraes RF. 2019. Agrotóxicos no Brasil: Padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. *Texto para Discussão*. Edited by Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - IPEA. Brasília.
- Nebert DW, Dalton TP. 2006. The role of cytochrome p450 enzymes in endogenous signaling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* 6(12):947-60.
- Neskovic NK, Karan V, Elezovic I, Poleksic V, Budimir M. 1994. Toxic Effects of 2,4-D herbicide on fish. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*. 29(2):265-79. doi:10.1080/03601239409372879.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95(2):351-8. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.
- Oruç EÖ, Üner N. 2000. Combined effects of 2,4-d and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of oreochromis niloticus. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*. 127(3):291-96. doi:10.1016/S0742-8413(00)00159-6.
- Oruç EÖ, Sevgiler Y, Uner N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-d and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. 137(1):43-51. doi:10.1016/j.cca.2003.11.006.
- Pasandi MS, Shirazi FH, Gholami MR, Salehi H, Najafzadeh N, Mazani M, Hamidabadi HG, Niapour A. 2017. Epi/perineural and schwann cells as well as perineural sheath integrity are affected following 2,4-D exposure. *Neurotoxicity Research*. 32(4):624-38. doi:10.1007/s12640-017-9777-y
- [PEVASPEA]. 2023. Plano de vigilância e atenção à saúde de populações expostas aos agrotóxicos do estado do Paraná. *Vigilância Ambiental de resíduos de agrotóxicos em água para consumo humano no Paraná 2017 - 2019*. Secretaria de saúde do Estado do Paraná. Paraná. p1-38.
- Phelps DW, Fletcher AA, Rodriguez-Nunez I, Balik-Meisner MR, Tokarz DA, Reif DM, Germolec DR, Yoder JA. 2020. *In vivo* assessment of respiratory burst inhibition by xenobiotic exposure using larval zebrafish. *Journal of Immunotoxicology*. 17(1):94-104. doi:10.1080/1547691X.2020.1748772.
- Poleksic V, Mitrovic-Tutundzic V. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Muler R, Lloyd R. *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. p. 339-52.
- Rahman I, Kode A, Biswas SK. 2006. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*. 1(6):3159-65. doi:10.1038/nprot.2006.378.

- Roddam N, Winston K, Melchiorre E, Talyn B. 2025. Elucidating which ingredients contribute to glyphosate-based herbicide toxicity in *Drosophila melanogaster*. Next Research. 2(2):100348. doi:10.1016/j.nexres.2025.100348.
- Rodil R, Quintana JB, Concha-Graña E, López-Mahía P, Muniategui-Lorenzo S, Prada-Rodríguez D. 2012. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). Chemosphere. 86(10):1040-1049. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.11.053.
- Ruiz de Arcaute C, Soloneski S, Larramendy ML. 2016. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d)-based herbicide on the neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 128:222-229. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.02.027.
- Santos IVF, Souza GC, Santana GR, Duarte JL, Fernandes CP, Keita H, Velázquez-Moyado JA, Navarrete A, Ferreira IM, Carvalho HO, Carvalho JCT. 2018. Histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) to evaluate the toxicity of medicine: an anti-inflammatory phytomedicine with janaguba milk (*Himatanthus drasticus Plume*). In: Histopathology - An Update. 40–64. doi:10.5772/intechopen.76670.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods. 9(7):671–75. doi:10.1038/nmeth.2089.
- Sies H. 1987. Biochemistry of oxidative stress. European Journal of Cancer and Clinical Oncology. 23(11):1798. doi:10.1016/0277-5379(87)90716-4.
- Song S, Yu Q, Zhang B, Ai C, Sun Y, Fu Y, Zhao M, Wen C. 2017. Quantification and comparison of acidic polysaccharides in edible fish intestines and livers using HPLC-MS/MS. Glycoconjugate Journal. 34(5):625–32. doi:10.1007/s10719-017-9783-6.
- Sridharan G, Shankar AA. 2012. Toluidine blue: a review of its chemistry and clinical utility. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology. 16(2):251–55. doi:10.4103/0973-029X.99081.
- Tayeb W, Nakbi A, Chaieb I, Hammami M. 2012. Oxidative stress induced by the 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide. In: Oxidative Stress - Environmental Induction and Dietary Antioxidants. Intech i(tourism):115–30. doi:http://dx.doi.org/10.5772/57353.
- Tichati L, Trea F, Ouali K. 2020. Potential role of selenium against hepatotoxicity induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in albino Wistar rats. Biological Trace Element Research. 194(1):228-236. doi:10.1007/s12011-019-01773-9.
- Tsaboula A, Papadakis EN, Vryzas Z, Kotopoulou A, Kintzikoglou K, Papadopoulou-Mourkidou E. 2016. Environmental and human risk hierarchy of pesticides: A prioritization method, based on monitoring, hazard assessment and environmental fate. Environment International. 91:78-93. doi:10.1016/j.envint.2016.02.008.
- Vigário AF, Sabóia-Morais SMT. 2014. Effects of the 2,4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*. Pesquisa Veterinária Brasileira. 34(6):523–28. doi:10.1590/S0100-736X2014000600005.
- Wisconsin Department of Health Services. 2023. Environmental Health. <https://www.dhs.wisconsin.gov/chemical/24d.htm>
- [WHO] World Health Organization. 2017. Guidelines for Drinking-Water Quality. 4^o Edition.
- Yamini Y, Saleh A. 2013. Ultrasound-assisted emulsification microextraction combined with injection-port derivatization for the determination of some chlorophenoxyacetic acids in water samples. Journal of Separation Science. 36(14):2330-2338. doi:10.1002/jssc.201300340.
- Yao Y, Lin J, Yang P, Chen Q, Chu X, Gao C, Hu J. 2012. Fine structure, enzyme histochemistry, and immunohistochemistry of liver in zebrafish. Anatomical Record. 295(4):567–76. doi:10.1002/ar.22416.
- Zhao Y, Li W, Chou LN. 1987. Cytoskeletal perturbation induced by herbicides, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) and 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid (2, 4, 5-T). Journal of Toxicology and Environmental Health. 20(1–2):11–26. doi:10.1080/15287398709530958.
- Zuanazzi NR, Ghisi NC, Oliveira EC. 2020. Analysis of global trends and gaps for studies about 2,4-D herbicide toxicity: A scientometric review. Chemosphere. 241:125016. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125016.

IMÁGENES EN TOXICOLOGÍA

“Confusiones peligrosas”: intoxicación por azafrán bastardo o narciso de otoño (*Colchicum autumnale*)

“Dangerous confusions”: Poisoning by bastard saffron or autumn crocus (*Colchicum autumnale*)

Morón Goñi, Fernando*¹; Goñi, Susana Edith²; Damín, Carlos Fabian¹

¹Primera Cátedra de Toxicología, Facultad de Medicina, U.B.A. Domicilio: Paraguay 2155, Piso 8vo. Código Postal: C1121A6B CABA. Teléfono 115950-9500. ²Actividad independiente.

*fernandomoron.mtox@gmail.com

Recibido: 20 de enero de 2025.

Aceptado: 27 de febrero de 2025.

Editor: Adolfo Rafael de Roodt.

Resumen. *Colchicum autumnale*, conocido como azafrán bastardo o narciso de otoño, contiene colchicina un alcaloide con propiedades antimitóticas. Las intoxicaciones, si bien infrecuentes, por ingerir este vegetal al ser confundido con especies comestibles son graves, incluyendo colapso cardiovascular, fallo respiratorio y leucopenia con infecciones. El tratamiento de soporte es de suma importancia, ya que a la fecha, no se cuenta con un antídoto.

Palabras clave: *Colchicum autumnale*; Colchicina; Vegetal tóxico.

Abstract. *Colchicum autumnale*, commonly known as autumn crocus, contains colchicine, an alkaloid with antimitotic properties. Although infrequent, poisonings from ingesting this plant, often due to confusion with edible species, are serious and can include cardiovascular collapse, respiratory failure, and leukopenia with infections. Supportive treatment is of utmost importance, as there is currently no antidote.

Keywords: *Colchicum autumnale*; Colchicine; Toxic plant.

El *Colchicum autumnale* es una planta herbácea perenne de 30 cm de altura que crece a partir de un bulbo subterráneo; sus flores son de color lila, similares a las del azafrán, de ahí su nombre común azafrán bastardo o silvestre (también llamado narciso de otoño, cólquico o mataperros), pero tienen seis estambres, en vez de tres (*Figura*). Esta planta es nativa de Irlanda e Inglaterra, actualmente cultivada por sus flores en muchas regiones del mundo (Akram *et al.* 2012). Su principal principio activo es la colchicina, que alcanza su mayor concentración en el bulbo, aunque todas las partes de la planta son tóxicas.

Este alcaloide, produce disrupción de la formación de los microtúbulos en las células mitóticas (Palmer *et al.* 2011) y es utilizado de manera efectiva en la medicina para el tratamiento de la artritis gotosa (Akram *et al.* 2012). El medicamento, producido por diversos laboratorios, se comercializa en comprimidos de 1 mg y previene la migración de granulocitos a las zonas donde se acumulan los cristales de urato.

La ingesta de este vegetal puede producir gran cantidad de síntomas: náuseas, vómitos, diarrea acuosa, hipotensión, bradicardia, diaforesis, alopecia, depresión de la médula ósea, fallo renal, necrosis hepática, hemorragias

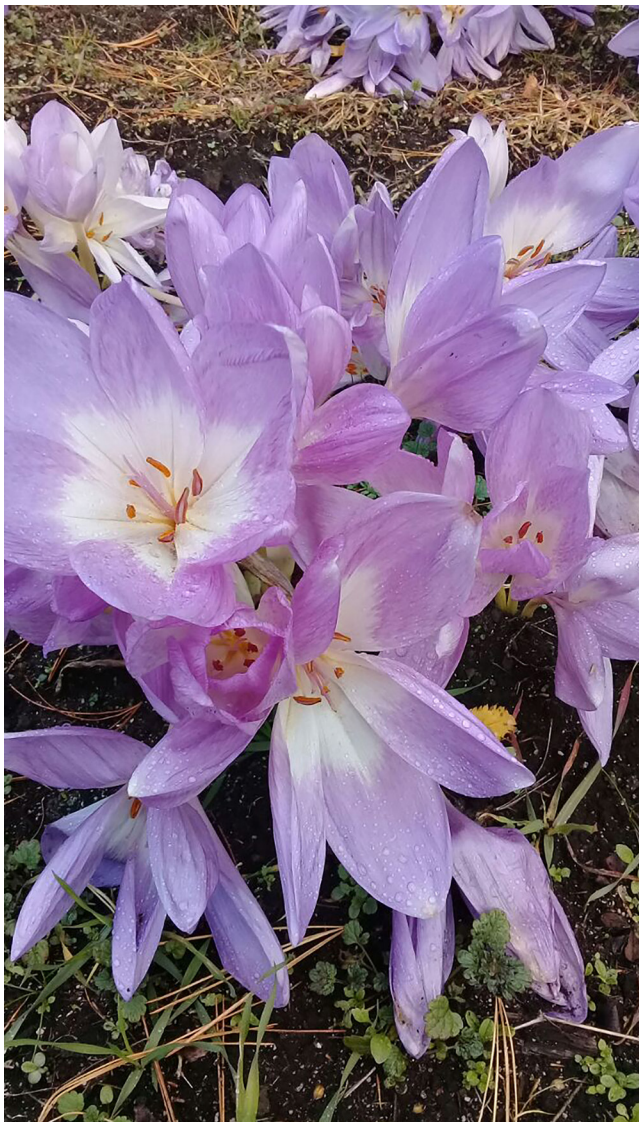


Figura. Flor de *Colchicum autumnale*. Tomada en Península San Pedro Bariloche, Río Negro, Argentina. Foto: Goñi Susana E.

pulmonares, convulsiones y muerte (Palmer *et al.* 2011). Las intoxicaciones con esta planta suelen suceder al ser confundidas con ajo salvaje (*Aliium ursinum*) o cebollas silvestres, como el caso fatal de un hombre de 76 años que evolucionó con fallo multiorgánico (respiratorio, cardíaco, rabdomiólisis y leucopenia asociado a infección) 3 días después de haber ingerido esta planta, a pesar de haber consultado a las 12 h de la exposición (Brvar *et al.* 2004). Se puede citar otro reporte de dos casos de envenenamiento, en el que una pareja de Gorski Kotar, Croacia, consumió una ensalada que contenía *Colchicum*, confundido con ajo; consultaron a

las 36 h de la ingesta, la mujer de 60 años presentó gastroenteritis y hepatitis, recuperándose completamente, mientras que su marido de 64 años, evolucionó con fallo multiorgánico, falleciendo a las 52 h de la ingesta. El hombre habría ingerido más cantidad, ya que la mujer detectó el sabor extraño y dejó de consumir la ensalada (Brncic *et al.* 2001).

La confirmación diagnóstica se realiza determinando los niveles de colchicina en suero y orina, incluso en material de lavado gástrico, por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (Brvar *et al.* 2004). La intoxicación con *Colchicum autumnale* (colchicina) debe ser considerada en todo paciente con gastroenteritis asociada a la ingesta de vegetales obtenidos por recolección. Es importante poder acceder a una muestra del vegetal o una fotografía para una correcta identificación del mismo. Es fundamental la descontaminación gastrointestinal, si la ventana de tiempo lo permite, y el tratamiento temprano de soporte, ya que no se cuenta con un antídoto específico disponible en el mercado. Los anticuerpos anticolchicina, si bien se ha reportado su uso en algunos casos y en investigación en animales, actualmente no se encuentran disponibles (Brvar *et al.* 2004).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses para la publicación del presente trabajo.

REFERENCIAS

- Akram M, Osama A, Khan U, Naveed A, Asif H. 2012. *Colchicum autumnale*: A review. Journal of Medicinal Plants Research. DOI: 10.5897/JMPR 11.323.
- Brncic N, Viskovic I, Peric R, Dirlic A, Vitezic D, Cuculic D. 2001. Accidental plant poisoning with *Cochicum autumnale*: Report of two cases. Croatian Medical Journal. 42(6):673-675.
- Brvar M, Ploj T, Kozelj G, Mozina M, Noc M, Bunc M. 2004. Case report: Fatal poisoning with *Colchicum autumnale*. Critical Care. DOI: 10.1186/cc2427.
- Palmer ME, Betz J. Plants. 2011. En: Goldfrank's Toxicologic Emergencies. Nelson LS, Lewin NA, Howland MA, Hoffman RS, Goldfrank LR, Flomenbawn NE. 2011. Novena edición. Mc Graw Hill, New York. 118:1537-1560.

El poder de lo simple: *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental

The power of simplicity: *Caenorhabditis elegans* as an experimental model

Ferreira, Melisa Rut²⁺; Moran, Yanina Soledad^{1,2+}; Gonzales-Moreno, Candelaria^{1,2}; Martínez, Samanta Andrea²; Fernandez-Hubeid, Lucia²; Virgolini, Miriam Beatriz^{1,2*}

¹Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC)-CONICET. ²Departamento de Farmacología Otto Orsingher, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

⁺Coautoría: ambas autoras contribuyeron en igual medida en la realización del artículo.

*miriam.virgolini@unc.edu.ar

Recibido: 24 de marzo de 2025

Aceptado: 30 de abril de 2025

Editor: Adolfo Rafael de Roodt.

Debido a las múltiples ventajas que presenta como modelo experimental, *Caenorhabditis elegans* es un invertebrado que en la actualidad es utilizado para el estudio e investigación de diversos procesos biológicos como la apoptosis y señalización celular, regulación génica, metabolismo y envejecimiento. Resulta de fácil cultivo en el laboratorio y manejo experimental debido a su pequeño tamaño (aprox. 1 mm), ciclo de vida corto (3-4 días), esperanza de vida (21 días) y elevado número de progenie (mayor a 200 huevos), lo que permite obtener poblaciones experimentales con rapidez y a gran escala (Brenner 1974). Además, su cuerpo transparente y la posibilidad del uso de marcadores de fluorescencia *in vivo* permite el estudio de procesos metabólicos, de embriogénesis o la visualización de estructuras celulares y la aplicación de herramientas como optogenética e imágenes de calcio. Por otra parte, puesto que la mayoría de la población está constituida por individuos hermafroditas se preserva el genotipo y la conservación de 60 al 80% de los genes y vías metabólicas con respecto al ser humano (Leung *et al.* 2008).

Así, al combinar enfoques genéticos cuantitativos y moleculares, este invertebrado ofrece la oportunidad de identificar modificadores genéticos de la susceptibilidad a los tóxicos conformando una alternativa a los modelos de vertebrados con una escalabilidad significativamente mayor y potencial para acelerar la caracterización de los objetivos moleculares de las sustancias químicas (Hartman *et al.* 2021). A este respecto, se han estudiado en *C. elegans* los efectos de muchas sustancias consideradas tóxicas, tales como metales, sustancias de consumo, plaguicidas y más recientemente nanopartículas (Long *et al.* 2003).

AGRADECIMIENTOS

LINCe, IFEC-CONICET. Departamento de Farmacología Otto Orsingher, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses para la publicación del presente trabajo.

REFERENCIAS

Brenner S. 1974. The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 77(1): 71-94

Hartman JH, Widmayer SJ, Bergemann CM, King DE, Morton KS, Romersi RF, Jameson LE, Leung MCK, Andersen EC, Taubert S, Meyer JN. 2021. Xenobiotic metabolism and transport in *Caenorhabditis elegans*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 24(2): 51-94.

Leung MC, Williams PL, Benedetto A, Au C, Helmcke KJ, Aschner M, Meyer JN. 2008. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology. 106(1): 5-28.

Long NP, Kang JS, Kim HM. *Caenorhabditis elegans*: a model organism in the toxicity assessment of environmental pollutants. 2023. Environmental Science and Pollution Research. 30(14): 39273-39287.



Izquierda: imagen de cuerpo entero de la cepa salvaje N2 del nematodo *Caenorhabditis elegans* tomada con un estereomicroscopio a una magnificación de 20x con luz brillante blanca.

Derecha: imagen de la cabeza de un gusano de la cepa BZ555 egIs1 [dat-1p::GFP] tomada en el estereomicroscopio (magnificación 60x, escala 50 μ m) con luz brillante blanca (**arriba**) y filtro fluorescente verde (**abajo**). En la foto pueden observarse los somas de las 4 neuronas dopaminérgicas cefálicas –CEP, dorsales y ventrales (marcadas con flechas rojas) y sus procesos dendríticos (marcados con flechas amarillas).

Nota: las cepas N2 y BZ555 fueron adquiridas en el *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC) (<https://cgc.umn.edu>).

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 ac-

ceso 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 legi-

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

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

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.

Conflictos de intereses. Los autores deberán expresar si alguno de ellos o el grupo poseen algún conflicto de interés respecto al material publicado. De no haberlo, también debe declararse. como por ejemplo: Los autores declaran que no poseen conflictos de intereses o relaciones personales que hayan podido influenciar lo enunciado en este trabajo

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 origi-

nal. 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 or-

den 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. Agregar tras ""autores", tres puntos (...) seguidos por una coma (,) y el nombre del último autor. Ejemplo Autor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ..., Autor 11.

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

General guidelines in the preparation of manuscripts for original articles

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

First page should contain the article title, full name, 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.

Conflicts of Interest. Authors must declare if some conflict of interest regarding the manuscript. If not, this must be declared. In example:

Declaration of competing interest The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this.

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.

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.

*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.

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 three points (...), comma (,) and the name of the last Author. In example. Author 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ..., 11.

Secondary author(s)

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

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

Organizations as authors

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

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

Title

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

Book: Plant cell culture: essential methods

Journal: Canadian Journal of Animal Science

Content designator

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

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

Medium designator

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

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

Place of publication and Publisher

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

Pagination

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

Series

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

Part 3: examples (print) Journal article

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

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

Book

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

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

Chapter in a book

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

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

Edited book

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

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

Chapter or article in an edited book

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

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

Article in a dictionary or encyclopedia

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

Book in a series

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

Tegos G, Mylonakis E, editors. 2012. Antimicrobial drug dis-

covery: emerging strategies. Wallingford, Oxfordshire (GB): CAB. (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 at: URL or DOI

Woolf D, Amonette JE, Street-Perrott FA, Lehmann J, Joseph S. 2010. Sustainable biochar to mitigate global climate change. Nature Communications [Internet]. [cited 2010 Aug 18]; 1(Art. 56). Available at: <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 at: URL

Watson RR, Preedy VR, editors. 2010. Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables [Internet]. Amsterdam: Academic Press; [cited 2010 Apr 22]. Available at: 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 at: 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 at: URL

Electronic Factbook [Internet]. 2007. Montreal (QC): McGill University; [updated 2007 Mar 30; cited 2013 Jan 11]. Available at: <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 at: 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 at: <http://www.swcs.org/documents/filelibrary/BeyondLiteraturereview.pdfw>

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* em 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 publica-

ção 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. do trabalho. Os autores retêm o direito de publicar seu trabalho de acordo com as regras do a licença CC BY-NC, "http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/" Licença Pública Creative Commons que permite que o trabalho seja compartilhado, reconhecendo sua publicação inicial nesta revista, com os autores os autores podem utilizar a obra para qualquer finalidade a única exceção de sua reprodução para fins comerciais de acordo com este tipo de licença CC.

Aspectos gerais na preparação do manuscrito para artigo original

Os manuscritos devem ser escritos usando um processador de texto (Microsoft Word versão 2003 ou superior), espaçamento duplo (incluindo resumos, referências e tabelas) fonte Arial e tamanho mínimo 12. As páginas devem ser numeradas a partir da página de título. Negrito ou itálico ou itálico deve ser usado somente quando apropriado.

Na primeira página deve ser indicado: título do artigo, nomes e 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 defi-

nidos com clareza.

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

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

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

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

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

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

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

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

indicado o aumento (barra o aumento).

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

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

Unidades de medida. As medidas de longitude, tamanho, peso e volume deverão ser expressas em unidades métricas (metro, quilograma, litro) ou seus múltiplos decimais. As temperaturas serão expressas em graus Celsius e as pressões arteriais em milímetros de mercúrio. Todos os valores de parâmetros hematológicos e bioquímicos deverão ser apresentados em unidades do sistema métrico decimal, de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI). Não obstante, os editores poderão solicitar que, antes de publicar o artigo, os autores agreguem unidades alternativas ou diferentes das do SI.

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

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

Conflitos de interesse. Os autores deverão expressar se algum deles ou o grupo possui algum conflito de interesses em relação ao material publicado. Caso contrário, também deverá ser declarado, como por exemplo:

Os autores declaram não ter conflitos de interesse ou relações pessoais que podem ter influenciado o que é afirmado neste trabalho.

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 publica-

ção entre parênteses:

Jones (2008) posteriormente refutou essa afirmação.

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

Em 2008, Jones refutou essa afirmação.

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

"Esses resultados contradizem claramente o publicado

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

Mais de um autor

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

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

... (Andrews e Gray 1995).

... (Gómez et al. 2003).

Múltiplas obras de diferentes autores.

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

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

Vários trabalhos publicados pelo mesmo autor no mesmo ano.

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

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

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

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

Citando uma fonte secundária ou indireta

Se deseja citar uma fonte que já é citada em outro documento, é sempre melhor consultar e fazer a citação da fonte original. No entanto, se não conseguir localizar e verificar o documento original, você deve citar a fonte

secundária e ao mesmo tempo reconhecer o autor da ideia original tanto na citação no texto quanto na referência final:

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

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

Organizações como autores

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

... (FAO 2006).

Parte 2: lista de referências

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

Componentes de referências na lista de referências.

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

Livros e outras monografias.

Autor (es) ou Editor (es)

Ano de publicação

Título

Conteúdo ou designador médio

Edição

Autor (es) Secundário (s)

Local de publicação

Editor

Paginação

Série

Artigos de revistas e periódicos/jornais.

Autor (es)

Ano de publicação

Título do artigo

Conteúdo ou designador médio

Título de revista ou jornal

Volume

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, após ""autores", três pontos (...) seguidos de vírgula (,) e o nome do último autor. Exemplo Autor 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ..., Autor 11.

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, biblio-

grafias 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: Editoria. 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, Jo-

seph 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/views/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>