

ISSN 0327-9286

Acta Toxicológica Argentina

Publicación de la Asociación Toxicológica Argentina
Buenos Aires - Argentina



Asociación Toxicológica Argentina

Volumen 18
N° 1
Julio 2010

Acta Toxicológica Argentina es el órgano oficial de difusión científica de la Asociación Toxicológica Argentina. Integra el Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas y se puede acceder a sus artículos a texto completo a través de SciELO Argentina. Tiene por objetivo la publicación de trabajos relacionados con las diferentes áreas de la Toxicología, en formato de artículos originales, reportes de casos, comunicaciones breves, actualizaciones o revisiones, artículos de divulgación, notas técnicas, resúmenes de tesis, cartas al editor y noticias.



Asociación Toxicológica Argentina

Asociación civil (Personería Jurídica N° 331/90)

Adherida a la IUTOX

*Acta
Toxicológica
Argentina*

Asociación Toxicológica Argentina

Comisión Directiva

Presidente

Gerardo D. Castro

Vicepresidente

Marta A. Carballo

Tesorero

María L. Oneto

Secretaria

Adriana S. Ridolfi

Vocales

Fabiana L. Lo Nostro

Patricia N. Quiroga

María T. Yanicelli

Vocales Suplentes

Marcela M. López Nigro

Mónica C. Napoli

Carlos R. Mastandrea

Comité Científico

Nelson Albiano

José A. Castro

Lucrecia Ferrari

Mirtha Nassetta

Marta M. Salseduc

Organo de Fiscalización

Mirta E. Ryczel

Claudia V. Vassena

Viviana V. Crapanzano

Tribunal de Honor

Susana I. García

Irma Giolito

Augusto Piazza

Acta Toxicológica Argentina

Director

Adolfo R. de Roodt *INPB, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"; Fac. Medicina, UBA*

Comité de Redacción

Ofelia C. Acosta de Pérez, *Fac. Ciencias Vet. UNNE, CONICET*

Fabiana L. Lo Nostro, *Fac. C. Exactas y Naturales, UBA; CONICET*

Valentina Olmos, *Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA*

Adriana S. Ridolfi, *Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA*

Aldo S. Saracco, *Fac. Ciencias de la Salud, UM; MSAL Gob. de Mendoza*

Comité Editorial

Alejandro Alagón, *Universidad Autónoma de México, México*

José A. Castro, *CITEFA, CONICET, Argentina*

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

Heraldo N. Donnerwald, *Universidad Favaloro, Argentina*

Gina D'Suze, *IVIC, Venezuela*

Amalia Laborde, *Universidad de la República, Uruguay*

Bruno Lomonte, *Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica*

Veniero Gambaro, *Università di Pavia, Italia*

Estela Giménez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*

Nelly Mañay, *Universidad de la República, Uruguay*

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

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

Haydée N. Pizarro, *CONICET, Argentina*

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

María M. Salseduc, *Laboratorios Bagó, Argentina*

Carlos Sèvcik, *IVIC, Venezuela*

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

Norma Vallejo, *SEDRONAR, Argentina*

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

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

INDICE

(CONTENTS)

ACUTE TOXICITY OF <i>Euphorbia royleana</i> Boiss (Euphorbiaceae) LATEX ON FRESHWATER CATFISH, <i>Heteropneustes fossilis</i> (Siluriformes, Heteropneustidae) <i>Prasad, ManiRam; Kumar, Abhishek; Mishra, Diwakar; Srivastav, Sunil K.; Srivastav, Ajai K.</i>	5
COMPARACIÓN ENTRE DOS MÉTODOS DE PRODUCCIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE ANTIVENENOS OFÍDICOS <i>de Roodt, Adolfo Rafael; Litwin, Silvana; Estevez, Judith; Gould, Eduardo G.; Dolab, Jorge A.; Gould, Jorge</i> ...	10
TOXICITY OF THE ESSENTIAL OIL OF THE CYTRAL CHEMOTYPE OF <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. BROWN <i>Olivero-Verbel, Jesús; Guerrero-Castilla, Angélica; Stashenko, Elena</i>	21
RESÚMENES DE TESIS	
FITORREMEDIACIÓN DE HERBICIDAS ORGANOCLORADOS: DISEÑO DE ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA SU APLICACIÓN EN LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA <i>Merini, Luciano J.</i>	28
SIMILITUD BIOQUÍMICA E INMUNOQUÍMICA ENTRE VENENOS DE CORALILLOS NORTEAMERICANOS <i>Bénard-Valle, Melisa</i>	30
INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES	32

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

ACUTE TOXICITY OF *Euphorbia royleana* Boiss (Euphorbiaceae) LATEX ON FRESHWATER CATFISH, *Heteropneustes fossilis* (Siluriformes, Heteropneustidae)

Prasad, ManiRam; Kumar, Abhishek; Mishra, Diwakar; Srivastav, Sunil K.; Srivastav, Ajai K. *

Department of Zoology, D.D.U. Gorakhpur University, Gorakhpur 273009, India.

*Corresponding author: ajaisrivastav@hotmail.com

Abstract: ACUTE TOXICITY OF *Euphorbia royleana* Boiss (Euphorbiaceae) LATEX ON FRESHWATER CATFISH, *Heteropneustes fossilis* (Siluriformes, Heteropneustidae). ManiRam Prasad; Abhishek Kumar, Diwakar Mishra, Sunil K. Srivastav and Ajai K. Srivastav. *Acta Toxicol. Argent. (2010) 18 (1): 5-9*. An acute toxicity test was performed by using a four-day static renewal test to determine the LC₅₀ value of aqueous extract of *Euphorbia royleana* latex for the freshwater fish, *Heteropneustes fossilis*. The LC₅₀ values, their upper and lower confidence limits and slope functions were calculated. The LC₅₀ values for aqueous extract of *Euphorbia royleana* latex at various exposure periods were 7.758 mg/L for 24 h, 5.847 mg/L for 48 h, 4.474 mg/L for 72 h and 3.090 mg/L for 96 h. The regression coefficient showed that there was significant negative correlation between exposure time and different LC values. Hence, it is concluded that the concentration to produce toxicity of latex of *Euphorbia royleana* is comparable and close to the concentration to produce toxicity of synthetic organophosphates pesticides for the fish *H. fossilis*. Therefore, adequate precautions must be taken when *Euphorbia royleana* latex is being used near fish- inhabited areas.

Key words: Fish; *Euphorbia royleana*; Toxicity; LC₅₀

Resumen: TOXICIDAD AGUDA DEL LÁTEX DE *Euphorbia royleana* Boiss (Euphorbiaceae) EN EL BAGRE DE AGUA DULCE, *Heteropneustes fossilis* (Siluriformes, Heteropneustidae). ManiRam Prasad; Abhishek Kumar, Diwakar Mishra, Sunil K. Srivastav and Ajai K. Srivastav. *Acta Toxicol. Argent. (2010) 18 (1): 5-9*. La prueba de la toxicidad aguda fue realizada utilizando un test estático con renovación, de cuatro días de duración, para determinar el valor de la CL₅₀ de un extracto acuoso del látex de *Euphorbia royleana*, en el pez de agua dulce *Heteropneustes fossilis*. Se calcularon el valor de la CL₅₀, los límites de confianza máximo y mínimo y la pendiente. Los valores de la CL₅₀ para el extracto acuoso del látex en varios períodos de exposición fueron 7,758 mg/L para 24 h, 5,847 mg/L para 48 h, 4,474 mg/L para 72 h y 3,090 mg/L para 96 h. El coeficiente de regresión mostró una correlación negativa significativa entre el tiempo de exposición y diferentes valores de la CL₅₀. Se concluye que la concentración del látex de *E. royleana* que produce toxicidad es comparable y cercana a la de los plaguicidas sintéticos organofosforados para el pez *H. fossilis*. Por lo tanto, se deben tomar precauciones adecuadas cuando el látex de *E. royleana* es utilizado cerca de áreas donde habita el pez *H. fossilis*.

Palabras clave: Peces; *Euphorbia royleana*; Toxicidad; CL₅₀

INTRODUCTION

Now-a-days, botanical compounds are being used as an alternative to synthetic pesticides. These botanicals have been considered as less toxic, less persistent and safe to non-target organisms. At present there are scores of botanical compounds for which there exists no toxicological data. A compound should not be treated as safe only by considering that it is a natural product.

The chemical constituents of plants of the Euphorbiaceae family include triterpenoids and related compounds (sterols, alcohols and hydrocarbons), phenolic compounds (flavonoids, lignans, coumarins, tannins, phenanthrenes, quinones, phenolic acids, etc.), alkaloids,

cyanogenic glucosides and glucosinolates (Abdel-Fattah 1987). Various parts of *Euphorbia royleana* have insecticidal and molluscicidal properties (Abdel-Hamid 2003; Srivastava et al. 2003; Tiwari et al. 2004). The latex of *Euphorbia royleana* has been reported as an irritant to the skin and eye (Basak et al. 2009). Bani et al. (1998) have shown that *Euphorbia royleana* has analgesic and antipyretic properties in rats and rabbits. There exists a single study which determined the acute toxicity of *Euphorbia royleana* for the fish *Channa punctatus* (Singh and Singh 2002). Keeping in view the wide use (Bani et al. 1998; Abdel-Hamid 2003; Srivastava et al. 2003; Tiwari et al. 2004)

of *Euphorbia royleana* (Family: Euphorbiaceae), the present study was designed to assess the toxicity of latex of *Euphorbia royleana* on a freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. *H. fossilis* was selected because it is hardy, readily available, easy to handle and can be kept alive for longer duration in the aquaria. This is a common edible fish and constitutes an important species in many water resources mainly ponds, ditches, swamps, marshes and sometimes occurs in muddy rivers (Rainboth 1996). This species is found in India, Pakistan, Sri Lanka, Nepal, Bangladesh, Burma, Thailand and Vietnam (Berra 2007).

MATERIAL AND METHODS

Adult freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* (both sexes; body wt 24-36 g) were collected locally (from Ramgarh lake, Gorakhpur) and acclimatized to laboratory conditions for 15 days in plastic tanks. They were fed 2-3 times a day with wheat flour pellets and ground dried shrimps.

The white-milky latex of *Euphorbia royleana* was drained into glass tube by cutting the stem and bark. The latex was lyophilized at -40°C and lyophilized powder was stored for further use. For the determination of LC₅₀ (Median Lethal Concentration i.e. concentration at which 50% mortality occurs) value of lyophilized latex of *Euphorbia royleana* on *H. fossilis* the four-day static renewal acute toxicity test (APHA et al. 1998) was used. Five replicates, each containing 10 fish (kept in glass aquaria in 30L tap water, stocking density was modified for the experiment keeping in view the air breathing nature of this fish species) were exposed to each concentration (2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 mg/L) of lyophilized latex of *Euphorbia royleana*. The dried latex powder of *Euphorbia royleana* was weighed and a stock solution (4 mg/ml) was prepared in ethanol. The required volume of stock solution was mixed in tap water to obtain the above mentioned concentrations. A control group with five replicates each of ten fish kept in 30L tap water containing ethanol was also run. The study was approved by the Animal Research Ethical Committee of DDU Gorakhpur University.

The media (the control and test solutions) in the aquaria were renewed daily. The fish were not fed 24 h before and during the experiment. Dead fish were removed immediately. The physicochemical conditions of the tap water used in the experiment were: temperature 25.4

± 2.3 °C; pH 7.32 ± 0.06; hardness 164.56 ± 5.09 mg/L as CaCO₃; dissolved oxygen 8.15 ± 0.39 mg/L; electrical conductivity 308.18 ± 66.31 mmho/cm and no free chlorine.

At different exposure periods (24, 48, 72 and 96 h), the mortality of the fish was subjected to Probit analysis with the POLO-PC software (LeOra Software) to calculate the LC₁₀, LC₅₀ and LC₉₀ values, their slope functions and confidence limits. Regression analysis was performed between the LC values and exposure periods.

RESULTS

The percent mortality of *Heteropneustes fossilis* after exposure to various concentrations of lyophilized latex of *Euphorbia royleana* for 24, 48, 72 and 96 h has been depicted in Figures 1 to 4. The LC₅₀ values at the different exposure periods were 7.758 mg/L at 24 h, 5.847 mg/L at 48 h, 4.474 mg/L at 72 h, and 3.090 mg/L at 96 h. The LC₁₀, LC₅₀ and LC₉₀ values, their upper and lower confidence limits and slope functions are given in Table 1.

In this study, the toxicity of lyophilized latex of *Euphorbia royleana* was noticed to be time and dose-dependent. The regression coefficient showed that there was a significant negative correlation between exposure time and the different LC values.

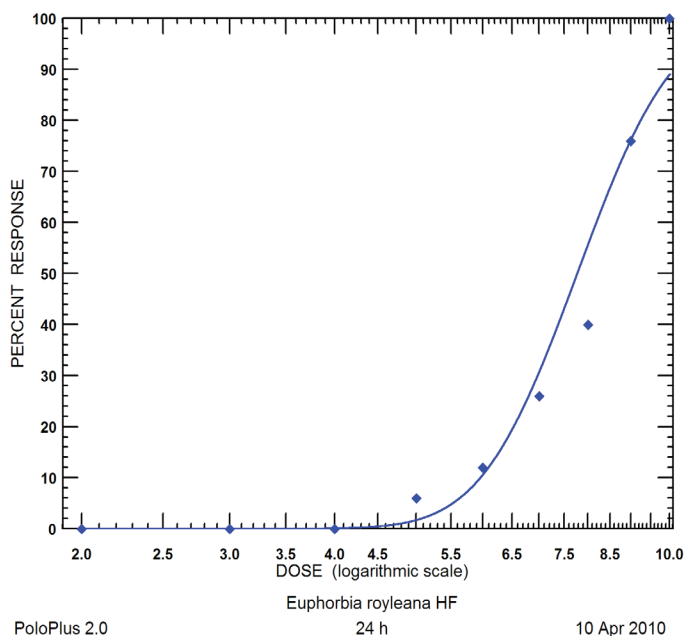


Figure 1. Percent mortality of the fish *Heteropneustes fossilis* after a 24 h exposure to different concentrations of *Euphorbia royleana* latex (mg/L).

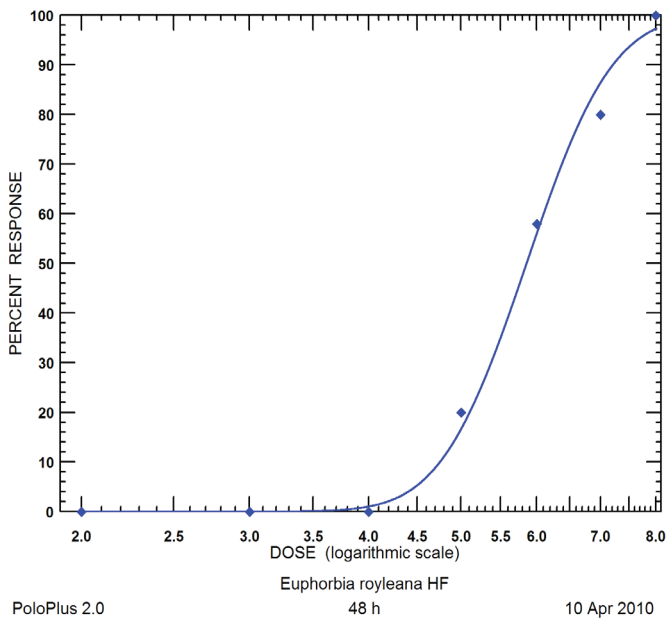


Figure 2. Percent mortality of the fish *Heteropneustes fossilis* after a 48 h exposure to different concentrations of *Euphorbia royleana* latex (mg/L).

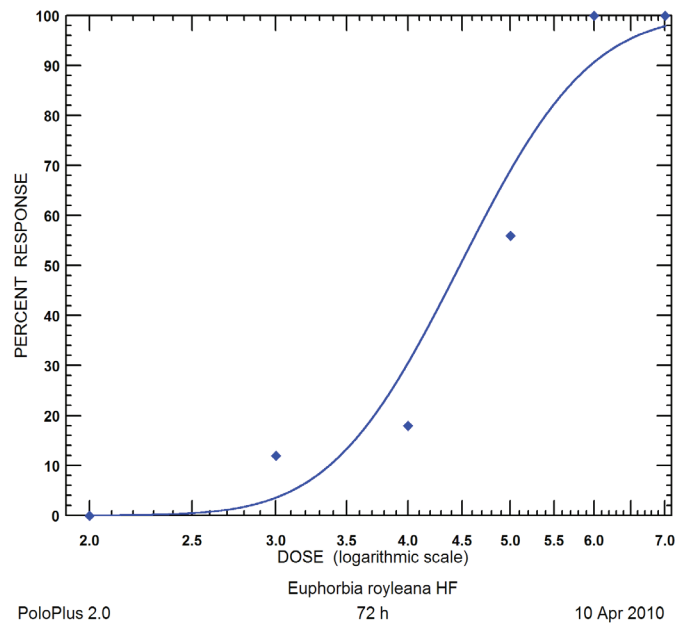


Figure 3. Percent mortality of the fish *Heteropneustes fossilis* after a 72 h exposure to different concentrations of *Euphorbia royleana* latex (mg/L).

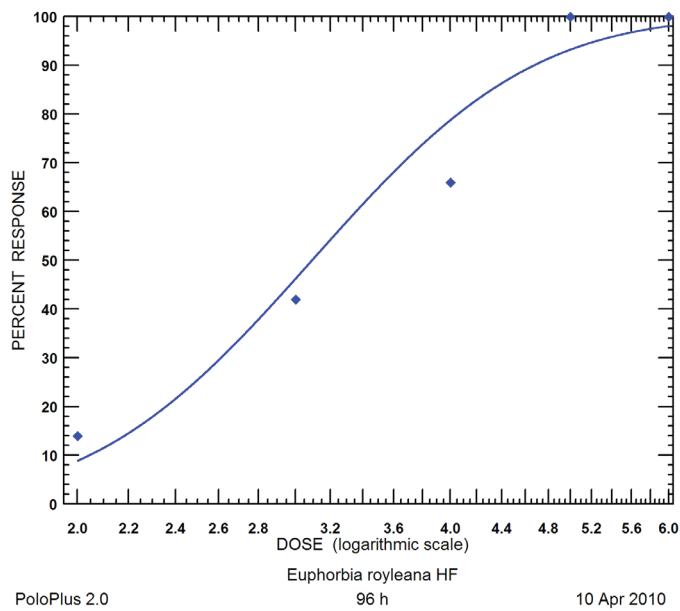


Figure 4. Percent mortality of the fish *Heteropneustes fossilis* after a 96 h exposure to different concentrations of *Euphorbia royleana* latex (mg/L).

Table 1. LC₁₀, LC₅₀ and LC₉₀ values, slope functions and confidence limits for *Euphorbia royleana* latex at different time intervals for the fish *Heteropneustes fossilis*.

Exposure periods	Effective dose (mg/L)	*Limits (mg/L)		Slope Function	't' ratio	Heterogeneity
		LCL	UCL			
24 h	LC10=5.95a3	5.048	6.511	11.145±1.078	10.343	2.5246
	LC50=7.758	7.222	8.376			
	LC90=10.109	9.182	12.125			
48 h	LC10=4.746	4.417	4.994	14.149±1.506	9.394	0.832
	LC50=5.847	5.638	6.052			
	LC90=7.203	6.884	7.666			
72 h	LC10=3.368	1.642	4.039	10.393±1.035	10.038	6.1109
	LC50=4.474	3.515	5.481			
	LC90=5.942	5.002	11.189			
96 h	LC10=2.045	0.750	2.650	7.145±0.748	9.546	3.8656
	LC50=3.090	2.173	3.895			
	LC90=4.671	3.743	9.619			

*The upper and lower confidence limits for LC₅₀ values calculated at 0.05 levels.

DISCUSSION

To our knowledge only few studies exist regarding the LC₅₀ values of *Euphorbia royleana* on a single fish species *Channa punctatus* (Singh and Singh 2002; Tiwari and Singh 2003, 2004). Singh and Singh (2002) have reported the LC₅₀ value at 24 h of aqueous extract of *Euphorbia royleana* for *Channa punctatus* as 0.05 g/L. Tiwari and Singh (2003) reported the 24 h LC₅₀ value of diethyl ether, chloroform, methanol and acetone extracted *Euphorbia royleana* latex on the fish *Channa punctatus* as 16.19 mg/L, 13.34 mg/L, 11.76 mg/L, 12.88 mg/L, respectively. Tiwari and Singh (2004) observed the 96 h LC₅₀ value of diethyl ether, chloroform, methanol and acetone extracted *Euphorbia royleana* stem bark on the fish *Channa punctatus* as 31.76 mg dried weight (DW)/L, 56.26 mg DW/L, 56.80 mg DW/L, 65.77 mg DW/L, respectively. Considering the LC₅₀ values for *Channa punctatus*, it seems that *H. fossilis* is very sensitive to *Euphorbia royleana* latex since the concentration to produce toxicity is lower than that reported for *Channa punctatus* (as

can be compared from the above mentioned toxicities for both fish species, *H. fossilis* and *Channa punctatus*).

The 96 h LC₅₀ value for *Euphorbia royleana* on *Heteropneustes fossilis* has been estimated to be 3.09 mg/L. This is comparable to the reported LC₅₀ values for synthetic pesticides like organophosphates. For *H. fossilis* the 96 h LC₅₀ values for organophosphates are 2.20 mg/L for chlorpyrifos (Srivastav et al. 1997) and 6.60 mg/L for metacid-50 (Mishra et al. 2004). However, the 96 h LC₅₀ value for *E. royleana* on *H. fossilis* is higher as compared to pyrethroids, since the 96 h LC₅₀ for *H. fossilis* are 7.20 µg/L for cypermethrin (Mishra et al. 2005) and 1.86 µg/L for deltamethrin (Srivastav et al. 2002; 2009). Hence, it is concluded that the concentration to produce toxicity of latex of *Euphorbia royleana* is comparable and close to the concentration to produce toxicity of organophosphates for the fish *H. fossilis*. Therefore, adequate precautions must be taken when *Euphorbia royleana* latex is being used near fish-inhabited areas.

REFERENCES

- Abdel-Fattah M.R. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. Botanical J Linnean Society. 1987;94:293-326.
- Abdel-Hamid H.F. Molluscicidal and in-vitro schistosomicidal activities of the latex and some extracts of some plants belonging to Euphorbiaceae. J Egypt Soc Parasitol. 2003;33(3):947-954.
- American Public Health Association/ American Water Works Association/ Water Environment Federation (APHA/AWWA/WEF). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition, American Public Health Association, New York, USA, 1998.
- Bani S., Suri K.A., Suri O.P., Sharma O.P. Analgesic and antipyretic properties of *Euphorbia royleana* latex. Phytotherapy Res. 1998;11(8): 597-599.
- Basak S.K., Bakshi P.K., Basu S., Basak S. Keratouveitis caused by *Euphorbia plant* sap. Indian J Ophthalmol. 2009;57(4):311-313.
- Berra T.M. Freshwater fish distribution. University of Chicago Press, 2007.
- Mishra D., Srivastav S.K., Srivastav A.K. Plasma calcium and inorganic phosphate levels of a teleost *Heteropneustes fossilis* exposed to metacid-50. Malaysian Applied Biol. 2004;33:19-25.
- Mishra D., Srivastav S.K., Srivastav A.K. Effects of the insecticide cypermethrin on plasma calcium and ultimobranchial gland of the teleost *Heteropneustes fossilis*. Ecotoxicol Environmental Safety. 2005;60:193-197.
- Rainboth W.J. Fishes of the Cambodian Mekong. Food and Agriculture Organization (FAO). Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. Rome, FAO; 1996. p. 265.
- Singh D., Singh A. Piscicidal effect of some common plants of India commonly used in freshwater bodies against target animals. Chemosphere. 2002;49(1):45-49.
- Srivastav A.K., Srivastava S.K., Srivastav A.K. Response of serum calcium and inorganic phosphate of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* to chlorpyrifos. Bull Environ Contam Toxicol. 1997;58:915-921.
- Srivastav A.K., Srivastava S.K., Mishra D., Srivastav S., Srivastav S.K. Ultimobranchial gland of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* in response to deltamethrin treatment. Bull Environm Contam Toxicol. 2002;68:584-591.
- Srivastav A.K., Srivastava S.K., Mishra D., Srivastav S.K., Suzuki N. Effects of deltamethrin on serum calcium and corpuscles of Stannius of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. Toxicol Environmental Chem. 2009;91:761-772.
- Srivastava V.K., Singh S.K., Rai M., Singh A. Toxicity of Nerium indicum and *Euphorbia royleana* lattices against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. Nigerian J Natural Products Medicine. 2003;7:61-64.
- Tiwari S., Singh A. Metabolic changes in the snake head fish *Channa punctatus* due to lattices of *Euphorbia royleana*. Asian Fisheries Science. 2003;16(2):147-155.
- Tiwari S., Singh A. Piscicidal and anti-acetylcholinesterase activity of *Euphorbia royleana* stem bark extracts against freshwater common predatory fish *Channa punctatus*. Environ Toxicol Pharmacol. 2004;18(1): 47-53.
- Tiwari S., Singh S.K., Singh A. Toxicological effect and biochemical alterations induced by different fractions of *Euphorbia royleana* latex in freshwater harmful vector Snail *Lymnaea acuminata*. Indian J Exp Biol. 2004;42(12):1220-1225.

COMPARACIÓN ENTRE DOS MÉTODOS DE PRODUCCIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE ANTIVENENOS OFÍDICOS

de Roodt, Adolfo Rafael¹; Litwin, Silvana¹; Estevez, Judith²; Gould, Eduardo G.³; Dolab, Jorge A.¹; Gould, Jorge⁴*

¹I.N.P.B.-A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán". Av. Vélez Sarsfield 563, CP 1281, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

²INDRE, México DF, México. ³Laboratorio Gulcos, Pte. Perón, Provincia de Buenos Aires. ⁴In Memoriam.

*Corresponding author: aderoodt@gmail.com

Resumen: COMPARACIÓN ENTRE DOS MÉTODOS DE PRODUCCIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE ANTIVENENOS OFÍDICOS. Adolfo Rafael de Roodt; Silvana Litwin; Judith Estevez; Eduardo G. Gould; Jorge A. Dolab; Jorge Gould. *Acta Toxicol. Argent. (2010) 18 (1): 10-20*. Las mordeduras producidas por serpientes venenosas son un serio problema médico en varias regiones del mundo y sobre las cuales los sistemas de salud actúan en diferentes grados en lo referente a tratamiento y prevención. Sin embargo, el tratamiento de las mordeduras de serpientes venenosas en animales domésticos puede resultar difícil por diversos motivos, siendo uno de estos la baja oferta o ausencia de antivenenos para uso veterinario. Las presiones comerciales en la industria farmacéutica han llevado a una reducción en la producción de antivenenos en varias partes del mundo, su disponibilidad es, a veces, bastante limitada y en algunos casos, son imposibles de conseguir. En este trabajo, inmunizamos caballos con veneno de serpientes Sudamericanas para obtener el plasma hiperinmune que fue procesado para obtener IgG entera o fragmentos F(ab)₂ usando dos métodos convencionales (fraccionamiento por ácido caprílico o doble precipitación salina y digestión con pepsina). Los antivenenos así obtenidos fueron probados en sus características bioquímicas e inmunoquímicas, así como en su potencia neutralizante. El SDS-PAGE de los antivenenos mostró bandas en el orden de los 150 y 100 kDa en los antivenenos conteniendo IgG entera o fragmentos F(ab)₂, respectivamente. La presencia de albúmina o contaminantes de alto o bajo peso molecular no fue detectada en ninguna de las preparaciones. No se observaron diferencias importantes en la potencia neutralizante de los antivenenos, aunque el costo de producción fue mucho más bajo en la obtención de IgG completa. A partir de esto, se sugiere que los bajos costos de producción en la obtención de antivenenos de IgG entera para uso veterinario, hacen a esta tecnología adecuada y rentable cuando la producción de F(ab)₂ no es posible.

Palabras clave: Serpiente; Antiveneno; Veneno; Acido caprílico.

Abstract: SNAKE ANTIVENIN: COMPARISON BETWEEN TWO PRODUCTION METHODS. Adolfo Rafael de Roodt; Silvana Litwin; Judith Estevez; Eduardo G. Gould; Jorge A. Dolab; Jorge Gould. *Acta Toxicol. Argent. (2010) 18 (1): 10-20*. Bites by venomous snakes are a serious medical problem in several regions of the world, on which the different health systems act with different modalities. Nevertheless, the treatment of venomous snakebites in domestic animals can turn difficult due several problems among which, the conspicuous, is the low availability or lack of antivenoms for veterinary use. As commercial pressures on the pharmaceutical industry have led to a reduction in the production of antivenins in several parts of the world, their availability is sometimes rather limited and sometimes these products are impossible to obtain. In this work, we immunized horses with venom of South American vipers to obtain hyperimmune plasma. The plasma was processed to separate whole IgG of F(ab)₂ fragments using two conventional methods (caprylic acid fractionation or double saline precipitation and pepsin digestion). The obtained antivenins were tested for their biochemical and immunochemical characteristics and neutralizing potency. The SDS-PAGE of the antivenins showed, in the processed antivenin, bands in the order of 150 and 100 kDa in the whole IgG or F(ab)₂ fragments, respectively. The presence of albumin or contaminants of high or low molecular weight was not detected in any of the preparations. No important differences were observed in the neutralizing potency of the antivenins, although production cost was very low with the method used to obtain pure IgG. The low production cost makes the production of antivenins for veterinary use profitable when the production of F(ab)₂ fragments is not possible.

Keywords: Snake; Antivenin; Venom; Caprylic acid.

INTRODUCCIÓN

Las mordeduras de serpientes venenosas son emergencias médicas muy frecuentes en ciertas regiones del mundo, causando miles de

muerdes y discapacidades físicas permanentes cada año (Theakston y col. 2003). Las mordeduras por serpientes venenosas no sólo son

comunes en humanos, sino también en animales domésticos en áreas rurales y salvajes de América (de Roodt y col. 1994; Mendez y Riet-Correa 1995; Hackett y col. 2002; de Roodt y col. 2002, 2006), Asia (Akhatari y Bhoop 1983; Yeruham y Avidar 2002), Australia (Pascoe 1975; Barr 1984; Robertson y col. 1992; Mirtschin y col. 1998), África (Lawal y col. 1992; Vaughan-Scott y Lobetti 1995; Leisewitz y col. 2004; Lobetti y Joubert 2004) e incluso en Europa, aunque la frecuencia es menor, en donde también se registran accidentes por serpientes venenosas en animales (Kangstrom 1989; Arbuckle y Theakston 1993; Kraft y col. 1998). Estos accidentes no se limitan a animales domésticos o humanos en zonas rurales o selváticas sino que pueden incluso ocurrir también en las áreas urbanas (Figura 1).



Figura 1. Siberian husky mordido en la cara cercano al ojo derecho, por un espécimen de *Bothrops alternatus* (Serpentes, Viperidae) en Berisso (en el Sur de la ciudad de Buenos Aires). Fotografía de la Dr. Susana Robelo.

Las mordeduras de serpientes tienen una morbilidad y mortalidad significativa en animales domésticos en regiones como Sudáfrica y Australia (Leisewitz y col. 2004) y en algunas regiones de Sudamérica que presentan fauna y características geográficas y climáticas similares, variando éstas últimas entre los climas templado y subtropical (de Roodt y col. 1994; Bicudo 2003). Sin embargo, aún cuando las mordeduras por serpientes venenosas son comunes en animales domésticos en algunas de estas áreas, el tratamiento específico de estos accidentes es bastante difícil

debido a la baja disponibilidad y el alto costo del antiveneno, el único tratamiento específico aceptado para este tipo de envenenamiento (WHO 1981; Theakston y col. 2003).

Recientemente, debido a presiones comerciales algunos laboratorios productores de antivenenos cesaron o redujeron drásticamente la producción, llevando a un aumento de la escasez ya existente y, por lo tanto, a la falta de disponibilidad de antivenenos para humanos en varias partes del mundo (Theakston y col. 2003; Chippaux y col. 2005; Stock y col. 2007). Obviamente, esto también influyó en la disponibilidad de antivenenos para uso en animales, lo que es importante dado que no es poco común que los animales domésticos sean tratados con antivenenos para uso humano.

El precio de estos productos puede variar desde diez a cientos de dólares estadounidenses por ampolla, y es muy común que no estén incluidos en el stock usual de medicinas en la práctica veterinaria, debido a su alto costo y/o baja disponibilidad. Su precio es alto, entre otras razones, debido al proceso de purificación a que son sometidos los plasmas hiperinmunes para purificar las fracciones con inmunoglobulinas, el cual representa el principal costo de producción.

En los comienzos de la seroterapia, los tratamientos para mordeduras de serpientes o infecciones tóxico-infecciosas como difteria o tétanos consistían en la inyección de suero hiperinmune completo de equino (von Behring y Kitasato 1890; Physalix y Bertrand 1894; Calmette 1984). Luego de éste período inicial, la presentación farmacéutica de los antivenenos y antitoxinas se fue modificando para disminuir el alto número de reacciones adversas producidas por el suero entero. Estas modificaciones consistieron en la eliminación de la albúmina, las globulinas no inmunes y otras proteínas no inmunes del suero.

Los procesos de purificación de plasma hiperinmune o suero tienden a obtener solamente las inmunoglobulinas purificadas, químicamente modificadas o enzimáticamente tratadas a fin de bajar la ocurrencia de reacciones adversas (de Roodt y col. 2004). Estas modificaciones fueron llevadas a cabo para evitar, o al menos disminuir, reacciones de hipersensibilidad y anafilactoides causadas cualitativamente por la inoculación de proteínas extrañas y cuantitativamente por la gran cantidad de proteínas inoculadas en el torrente sanguíneo (Grasset y Christensen 1947; Christensen

1966; Morell 1986), dado que la cantidad de proteínas inyectadas es un importante factor involucrado en el desarrollo de reacciones adversas (Cardoso y col. 1993).

Las reacciones adversas ocurridas por la inyección de proteínas heterólogas como los antivenenos son bastante frecuentes en humanos (Sutherland y Lovering 1979; Reid 1980; Sullivan 1987; Moran y col. 1998). En el caso de los antivenenos ofídicos, en casi todo el mundo son producidos en caballos (Theakston y Warrell 1991) debido a las excelentes características de estos animales para la producción de sueros hiperinmunes (Sjostrom y col. 1994). Las globulinas hiperinmunes en el suero equino son IgG, particularmente del isotipo IgG(T) (Ek 1974; Fernández y col. 1997), un isotipo altamente glicosilado y muy antigénico, debido a las características químicas de las glicoproteínas. En los animales domésticos, sin embargo, las reacciones adversas producidas por el uso de antivenenos o antitoxinas purificadas parecen ser menos frecuentes e intensas que aquellas descritas para los humanos (de Roodt y col. 1997; Leisewitz y col. 2004).

En vista de estos hechos, estudiamos la potencia neutralizante de dos antivenenos producidos en equinos mediante dos metodologías diferentes. Por un lado, la mayormente recomendada para uso humano, los fragmentos F(ab)₂ (Krifi y col. 1999), siendo ésta la presentación que suele utilizarse ampliamente desde hace muchas décadas, y por otro lado, un antiveneno conteniendo la molécula de IgG entera, obtenido por precipitación ácida, que más recientemente se ha comenzado a utilizar también para el tratamiento de humanos (Rojas y col. 1994). A tal efecto, inmunizamos caballos con veneno de tres especies de serpientes del Género *Bothrops* de Argentina con gran importancia médica para hombres y animales (de Roodt y col. 1994; de Roodt y col. 1996) y responsables de más del 98% de los accidentes por serpientes venenosas en humanos en Argentina (Ministerio de Salud 2007). El plasma hiperinmune fue obtenido y procesado por el método de Pope (1939a; 1939b) y Pope y Stevens (1951), para obtener fragmentos F(ab)₂ o a través del fraccionamiento con ácido caprílico (octanoico) para obtener IgG entera (Rojas y col. 1994), logrando así antivenenos con las preparaciones farmacéuticas más comunes (fracción F(ab)₂ o IgG a molécula completa). Se midió entonces

la potencia neutralizante de ambas preparaciones para comparar ambas metodologías de obtención a partir de una misma fuente de plasma hiperinmune.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equinos

Para el plan de inmunización se utilizaron quince equinos mestizos de 300 a 500 kg de peso, en buen estado de salud, negativos para anemia infecciosa equina y piroplasmiasis y desparasitados con albendazol-praziquantel. Los equinos se mantuvieron a campo durante todo el proceso de inmunización, en San Vicente, provincia de Buenos Aires.

Venenos

Se utilizaron venenos de *B. alternatus*, *B. neuwiedii* (sensu lato) y *B. jararacussu* obtenidos a partir de especímenes sanos provistos por el Serpentario del "Centro Zootoxicológico de Misiones", Oberá, Misiones, Argentina. Considerando la alta reactividad cruzada observada entre los venenos de serpientes del género *Bothrops* (de Roodt y col. 1998), esta mezcla inmunogénica se consideró adecuada para obtener un antiveneno que pueda ser usado para neutralizar el veneno de estas serpientes. Los venenos fueron obtenidos por extracción manual, inmediatamente secados *in vacuo* y almacenados a -20°C hasta su uso. La potencia letal fue determinada usando la técnica descrita por Meier y Theakston (1986).

Esquema de inmunización

Los equinos fueron inmunizados usando el método descrito por de Roodt y col. (1996) con leves modificaciones. Brevemente, los caballos fueron inoculados por vía subcutánea (s.c.) los días 1, 15, 30, 45, 55 y 65 con 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 y 4,0 mg de una mezcla de los venenos en partes iguales, en diferentes puntos en el lomo. En las primeras inmunizaciones (días 1 a 30), los venenos fueron inactivados con EDTA 10 mM en concordancia con la técnica sugerida por Higashi y col. (1989). En el protocolo de inmunización, el veneno fue inoculado con Adyuvante de Freund Completo (día 1) o Adyuvante de Freund Incompleto (día 15) o con 10% de gel de Al(OH)₃ (días 30 y 45) o finalmente, sólo con NaCl 0,15 M (en los días restantes). En el esquema de reinmunización, se inocularon 4 mg de veneno con 10% de gel de Al(OH)₃ en el día 1 y se repitió la inoculación de 4 mg de veneno usando sólo

NaCl 0,15 M los días 10 y 20. El antiveneno usado en este trabajo, corresponde al primer ciclo de inmunización.

Purificación de inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas enteras fueron purificadas por fraccionamiento con ácido caprílico usando técnicas convencionales (Rojas y col. 1994). Los fragmentos F(ab)₂ fueron purificados a partir del plasma usando el método de Pope (Christensen 1966). Se agregaron thimerosal 1/10000 y fenol 1/1000 como conservantes en ambos productos finales.

Determinación de proteínas

Las proteínas fueron determinadas mediante el método de Bradford (Bradford 1976) usando el Protein Assay Kit (BioRad) para los venenos, y por el método de Biuret, usando el kit Proti II (Wiener) para los sueros y antivenenos.

Control de la evolución de la respuesta inmune

Con el objeto de evaluar la cinética de la respuesta inmune, se estudiaron semanalmente muestras individuales de los caballos utilizando la técnica de doble inmunodifusión (método de Ouchterlony) en agarosa 1% (Difco) siguiendo técnicas convencionales (Harlow y Lane 1988). Brevemente, se realizaron diluciones seriadas de las muestras de sueros individuales obtenidas a partir de los equinos hiperinmunizados, las cuales fueron enfrentadas a soluciones de venenos disueltos en NaCl 0,15 M de manera de lograr una concentración de 1 mg/ml e incubados durante 48 hs a temperatura ambiente. Los geles fueron, entonces, observados registrándose la presencia de bandas de precipitación. Teniendo en cuenta experiencias previas no publicadas, el título obtenido a partir del test de doble inmunodifusión para seleccionar a los caballos para su sangrado (testando suero completo contra una solución de veneno de 1 mg/ml) fue 1/25 o mayor. Finalmente, todas las muestras individuales y el pool constituido por las muestras individuales fueron testados en ratones CF-1 de 18-20 g enfrentándolos contra 3 dosis letales 50% (DL₅₀) inoculadas por vía intraperitoneal (i.p.) usando la misma técnica que en el experimento de preincubación descrito más adelante. Para el manejo de los animales se siguieron los lineamientos éticos sugeridos por el National Research Council (2002).

Neutralización de la potencia letal de los antivenenos

Ratones CF-1 de 18-20 g fueron desafiados con 5,0 DL₅₀ de veneno preincubado con diferentes dosis de antiveneno diluido en NaCl 0,15 M. Luego de 48 hs se registraron las muertes y se determinó la dosis efectiva 50% (DE₅₀; dosis de antiveneno que protege a la mitad de los ratones inoculados) mediante técnicas convencionales (WHO 1981; Theakston y Reid 1983). Los resultados fueron analizados usando el software combinado Prisma-StatMate (GraphPad, Inc., San Diego, CA).

La DE₅₀ fue expresada en microlitros y en miligramos de proteína ± desvío estándar. La potencia neutralizante del antiveneno fue también expresada como el número de miligramos de veneno neutralizado por un mililitro de antiveneno (Ministerio de Saúde 1996) o por DL₅₀ neutralizada (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 2000).

Estudios de pureza del antiveneno

La purificación de ambos antivenenos fue estudiada por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, en geles al 10% de acrilamida / bis acrilamida siguiendo técnicas convencionales (Laemmli 1970).

Estudios de especificidad

Fueron realizados por doble inmunodifusión en geles de agarosa enfrentando el antiveneno con anti IgG equina o anti suero total equino usando técnicas clásicas (Ministerio de Saúde 1996).

Estadísticas

Todos los resultados fueron analizados usando el software combinado Prisma-StatMate (GraphPad Inc., San Diego, CA).

RESULTADOS

Las potencias letales de los venenos fueron: 3,5 ± 0,3 mg/kg para el veneno de *B. alternatus*, 3,1 ± 0,5 mg/kg para *B. neuwiedii* y 0,9 ± 0,2 mg/kg para *B. jararacussu*.

El contenido de proteínas totales de los antivenenos obtenidos en el proceso de primoinmunización (no consideramos el de reinmunización) fue de 12,3 ± 1,9 mg/ml para el antiveneno obtenido por fraccionamiento con ácido caprílico y de 14,1 ± 1,5 mg/ml para el antiveneno obtenido por precipitación salina y digestión enzimática.

El estudio electroforético de los antivenenos mostró sólo una banda en el orden de los

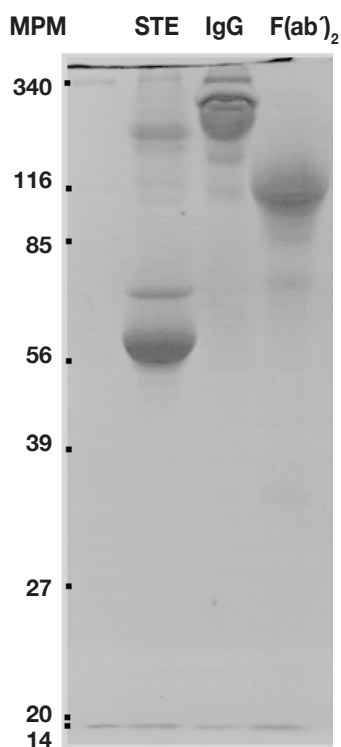


Figura 2. SDS-PAGE al 10% de acrilamida/bisacrilamida en condiciones no reductoras. Calle 1: Suero Total Equino (STE); Calle 2: IgG; Calle 3: fragmentos F(ab)₂. En cada calle se corrieron 22 µg de proteína. A la izquierda está indicada la migración de los marcadores de peso molecular (MPM).

150 kDa en el antiveneno obtenido por ácido caprílico, lo que corresponde a la masa molecular de la IgG(T) y una banda en el orden de los 100 kDa en aquél obtenido por el método de Pope, correspondiendo a la masa molecular del fragmento F(ab)₂ (Figura2).

El estudio de especificidad mostró sólo una banda cuando el veneno fue enfrentado con el suero anti IgG equina completa o el anti suero total equino, mostrando la pureza de los antivenenos obtenidos.

Los resultados de los estudios de neutralización son mostrados en la *Tabla 1* como mg de veneno o DL₅₀ neutralizadas por ml de antiveneno, de acuerdo a las diferentes formas de expresar la potencia neutralizante en diferentes países de América (Farmacopea Argentina 1978; Ministerio de Saúde 1996; Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 2000; United States Pharmacopeia 2004).

El plasma obtenido en el proceso de reinmunización, brindó una capacidad neutralizante superior a 2,5 mg de veneno por ml de IgG purificada para el veneno de *B. alternatus* y sobre los 2,0 mg/ml para el veneno de *B. neuwiedii* (sensu lato), en ambos casos por sobre los valores mínimos de neutralización requeridos por la Farmacopea (Farmacopea Argentina 1978).

Tabla 1. Capacidad neutralizante en los venenos usados como inmunógenos de ambos antivenenos.

Veneno	DE ₅₀ de AV con IgG molécula entera		DE ₅₀ de AV con fragmentos F(ab) ₂		Potencia teórica (mgV/mlAV)		Potencia en mg (*) (mgV/10 ml AV)		Potencia en DL ₅₀ (DL ₅₀ V/10 ml AV)	
	µl AV	mg AV	µl AV	mg AV	IgG	F(ab) ₂	IgG	F(ab) ₂	IgG	F(ab) ₂
<i>B. alternatus</i>	267 (178-394)	3,28 (2,19-4,84)	207 (177-244)	2,92 (2,50-3,44)	1,311	1,691	10,5	13,5	150	193
<i>B. diporus</i>	177 (125-250)	2,18 (1,54-3,08)	250,4 (214-292)	3,53 (3,02-4,12)	1,807	1,280	14,4	10,2	225	159
<i>B. jararacussu</i>	31 (27-35)	0,38 (0,33-0,43)	32 (29-35)	0,45 a	2,903	2,813	23,2	22,5	1289	1250

V: veneno; AV: antiveneno. Los resultados son expresados como Dosis Efectiva Media (DE₅₀) en microlitros (µl AV) o miligramos (mg AV) de antiveneno de IgG entera o fragmentos de F(ab)₂. La potencia teórica, expresada en miligramos de veneno por mililitros de antiveneno (mgV/mlAV), indica los miligramos de veneno neutralizado por un mililitro de antiveneno a partir de datos en crudo de potencias letales y neutralizantes. La potencia de neutralización, expresada como los miligramos de veneno por 10 mililitros de antiveneno (mgV/10 ml AV) (*), fue estimada por el método sugerido por el Ministerio de Salud de Brasil (Ministerio de Saúde 1996) (estimando la potencia del antiveneno considerando n-1 a las dosis de desafío, dado que, de las dosis de desafío excluida del cálculo es la que mata al 50% de los ratones en el desafío). La potencia expresada en DL₅₀ (DL₅₀/10 ml AV) indica la cantidad de Dosis Letal Media (en ratón) neutralizada por 10 mililitros de antiveneno (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 2000). Los intervalos de confianza (95%) están expresados entre paréntesis.

DISCUSIÓN

Ambos antivenenos obtenidos en el proceso de inmunización fueron eficientes en neutralizar los venenos de serpientes estudiados. Si consideramos el contenido de proteínas, los títulos neutralizantes obtenidos por ambos métodos fueron cercanos. Aunque se observaron algunas diferencias en la potencia neutralizante, no fueron estadísticamente significativas ($P > 0,05$).

La cantidad de proteínas obtenida en ambos casos fue similar y en el estudio por SDS-PAGE los antivenenos se mostraron casi totalmente compuestos por IgG o fragmentos $F(ab)_2$. En este punto, debe tenerse en cuenta que, en la misma cantidad de proteína, la presentación $F(ab)_2$ tiene más sitios de unión al antígeno con respecto a la molécula de IgG entera, dado que estos fragmentos tienen 100 kDa y la IgG de caballo tiene alrededor de 150-160 kDa (Sugiura 2000). Esto podría sugerir una potencia mayor de una preparación con respecto a la otra con similar contenido proteico, si bien en este caso no se notaría esa diferencia. En estos procesos de purificación, las diferencias podrían ser atribuidas a las diferentes condiciones en el tratamiento de los sueros para la purificación de las inmunoglobulinas, que influiría en sus capacidades de unión a los diferentes antígenos. El "sufrimiento" de las inmunoglobulinas purificadas con la precipitación con ácido caprílico es menor comparado con la termo-coagulación (50-60°C), doble precipitación salina y digestión enzimática a pH bajo (pH 2-3). Los títulos neutralizantes obtenidos en esta primera instancia no fueron muy altos, posiblemente debido al hecho de que los anticuerpos procesados provenían de animales vírgenes en una primoinmunización. Sin embargo, estas potencias (alrededor de 1,3 a 2,9 mg de veneno por mililitro o alrededor de 150 a 1200 DL_{50} por ampolla de 10 ml) son buenas en este caso. Considerando que, durante los procesos de reinmunización los títulos neutralizantes suben, y que, con los procesos de concentración la potencia se eleva, los títulos alcanzados son adecuados para el proceso de producción de un antiveneno. Además, considerando la baja cantidad de proteínas (123 mg [IgG] o 141 mg [$F(ab)_2$] por 10 ml), éstas podrían concentrarse varias veces con el consiguiente aumento de título, dado que la cantidad de proteínas de los antivenenos comercialmente oscila en general entre 700 y 1400 mg/ 10 ml (OMS 1981).

Respecto al título neutralizante alcanzado es importante destacar que, si se considerase la potencia encontrada, aún sin ningún proceso de concentración, llevando el volumen de un vial a 20 ml, volumen común para los antivenenos en la medicina veterinaria, se superarían los requerimientos de neutralización por vial (25 mg de veneno/vial) requeridos por la Farmacopea Nacional para los antivenenos para uso humano (Farmacopea Argentina 1978).

La conveniencia del uso de las diferentes técnicas para la preparación de antivenenos es tema de constante discusión (Krifi y col. 1999). Dado que los antivenenos están constituidos por proteínas heterólogas, deben tenerse en cuenta todas las consideraciones para evitar que el tratamiento de las mordeduras de serpientes con el antiveneno, complique o empeore el cuadro de envenenamiento por problemas de hipersensibilidad. Hasta el presente, el uso de fragmentos $F(ab)_2$ parece ser la mejor presentación farmacéutica para uso humano debido a su baja incidencia en la producción de efectos adversos y su farmacocinética (Krifi y col. 1999). El método de doble precipitación salina, termocoagulación y digestión enzimática (método de Pope) para obtener estos fragmentos, es ampliamente aceptado como una de las mejores elecciones para la preparación de antivenenos para uso humano. (Ministerio de Saúde 1996; Chippaux y Goyffon 1998; Krifi y col. 1999). Una de las principales ventajas del método de Pope es la ausencia de regiones de cadena pesada de la inmunoglobulina. La digestión enzimática reduce el suministro de proteínas heterólogas al sistema inmune de las personas o animales tratados con estos fragmentos y, consecuentemente, la posibilidad de aparición de reacciones adversas por la falta de dominios relacionados al sistema de complemento o la activación de células blancas sanguíneas, los cuales se localizan en la parte digerida por la pepsina. (Morell 1986; Sullivan 1987; Le Moli y col. 1989; Chippaux y Goyffon 1998). Estos fragmentos son altamente conservados y la respuesta humoral contra éstos puede resultar en una reacción de Arthus en el subsecuente tratamiento con los antivenenos (de Roodt y col. 2004). Otra ventaja importante del método de precipitación salina es que facilita el trabajo a nivel industrial, dado que las inmunoglobulinas son obtenidas en una alta concentración y dependiendo del sistema de producción, pueden ser almacenadas en pequeños espacios como

una "pasta" de proteína-sulfato por largos períodos de tiempo. En suma, el concentrado de inmunoglobulinas facilita la preparación de los antivenenos, dado que es más fácil y barato diluir proteínas que concentrarlas. Sin embargo, para obtener un producto de alta calidad, este proceso debe ser realizado por personal experimentado, se necesitan varios pasos y es caro a causa de la gran cantidad de sales que requiere, el uso de pepsina, la necesidad de agitación y cambios de pH, y la necesidad de sistemas de calor en algunos pasos del proceso de producción. Contrariamente, la purificación por fraccionamiento con ácido caprílico requiere menor cantidad de pasos de purificación y no necesita el uso de temperatura ni tratamiento enzimático.

Los antivenenos producidos usando fraccionamiento por ácido caprílico han demostrado ser útiles experimentalmente (León y col. 1997; León y col. 1999) y clínicamente en humanos, en países con serios problemas de mordeduras de serpientes (Theakston y col. 2003). Además, estas preparaciones son seguras con respecto a la aparición de reacciones adversas inmediatas, dado que la activación del complemento sería solo levemente mayor que la observada usando fragmentos $F(ab)_2$ (Morais y col. 1994; Rojas y col. 1994).

Una interpretación respecto a las bondades de esta metodología de purificación para el uso veterinario podría ser que, si la inyección de IgG equina altamente purificada no parece plantear un gran problema para humanos, esta presentación no causaría problemas al ser usada en caballos (en este caso, la preparación es un antiveneno homólogo), vacas, perros, gatos u otros animales domésticos que pudieran ser mordidos por una serpiente. El consenso general es que la mejor presentación farmacéutica es la que involucra fragmentos $F(ab)_2$ o Fab (de Roodt y col. 2004). Sin embargo, esta recomendación que ha sido hecha para productos para uso humano, está bajo constante discusión (Morais y col. 1994; Otero-Patiño y col. 1998; Krifi y col. 1999; Gutierrez y col. 2003) y no es necesariamente aplicable a preparaciones que serán usadas en animales.

Independientemente de la ausencia de experimentación en reacciones adversas a los antivenenos en medicina veterinaria, los fenómenos de hipersensibilidad son diferentes en hombres y animales, y en las diferentes especies de animales domésticos (de Roodt

y col. 1994; Driggers 1995; de Roodt y col. 1997) y son raramente encontrados luego del tratamiento con antivenenos (Leisewitz y col. 2004). Puede asumirse que estas preparaciones de inmunoglobulinas de alta calidad no presentarían mayor riesgo en animales que las preparaciones comunes (suero total, fracción gamma, inmunoglobulinas purificadas, fragmentos $F(ab)_2$ o Fab) usadas para tratar el envenenamiento en casi todo el mundo. El riesgo de reacciones adversas inmediatas debería ser bajo y el riesgo de una reacción de Arthus, 7 a 15 días luego de la inoculación, debería ser similar a aquel producido por el uso de cualquier otro tipo de antiveneno. En este aspecto, la experiencia con perros tratados con fragmentos $F(ab)_2$ sugieren que, aunque estas reacciones pueden ocurrir, son raras (Leisewitz y col. 2004).

Sin embargo, a pesar de lo enunciado, los esfuerzos productivos deberían estar dirigidos a obtener el mejor antiveneno, aún para uso veterinario, dado que los animales merecen ser tratados con productos de calidad. De esta manera, todos los procesos de purificación y/o tratamiento enzimático deberían ser considerados para productos veterinarios cuando los costos y la demanda los hagan viables.

Con respecto a los costos de producción de antivenenos, si consideramos los principales reactivos para purificar plasma hiperinmune (con sulfato de amonio, pepsina o ácido caprílico), el costo es alrededor de tres a ocho veces menor con ácido caprílico, dependiendo de algunos aspectos técnicos y de los precios de las drogas usadas (precios estimados a partir del catálogo Sigma, 2007). La diferencia es mayor, si consideramos la necesidad de reactores adecuados, sistemas de filtración y sistemas de calentamiento, necesarios para obtener los fragmentos de inmunoglobulinas por precipitación salina y digestión enzimática (Raw y col. 1991).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que es posible producir antivenenos de calidad con una considerable reducción de los pasos de purificación y de los costos de producción, lo cual nos lleva a asumir que la producción de antivenenos de bajo costo y buena calidad para uso veterinario es posible y debe ser alentada. El paso fundamental, y la clave de este tipo de producción, es obtener altos títulos de anticuerpos evitando la necesidad de labores de concentración para aumentar la potencia neutralizante, lo que encarecería

el costo del producto. Afortunadamente, con varios venenos de serpientes es posible obtener altos títulos de anticuerpos, como en el caso del veneno de la mayoría de los vipéridos americanos.

La producción de antivenenos o antitoxinas para uso veterinario es un desafío para la industria farmacéutica veterinaria. Aunque, en ocasiones, estos productos pueden no rendir altos beneficios a los fabricantes por las razones antes mencionadas (especialmente en comparación con productos cosméticos, antibióticos o antiparasitarios) los antivenenos y antitoxinas pueden constituir una línea regular de producción que sería muy útil para los productores, veterinarios, dueños de animales y animales en países donde las mordeduras de serpientes en animales domésticos son frecuentes.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Akhtari A., Bhoop S. Experimental cobra envenomation. I. Clinical haematological and biochemical changes in cross-bred calves. Indian J Vet Med. 1983;3:21-26.

Arbuckle J.B.R., Theakston R.D.G. Facial swelling in a pony attributable to an adder bite. Vet Rec. 1993;131:75-76.

Barr S.C. Clinical features therapy and epidemiology of tiger snake bite in dogs and cats. Aust Vet J. 1984;61:208-212.

Bicudo P.L. Envenenamento em Animais Domésticos Causados por Serpentes, Artrópodos e Sapos. En: Costa Cardoso J.L., Siqueira Franca F.O. de; Fan Hui Wen, S'Anta Ana Málaque, Vidal Haddad Jr. Animais Peconhentos No Brasil. Biología, Clínica e Terapéutica Dos Acidentes. Sarvier / FAPESP, Sao Paulo, Brazil; 2003. p. 437-449.

Bradford M.M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-257.

Calmette A. Contribution à l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. Ann I Pasteur Paris. 1984;8:275-277.

Cardoso J.L., Fan H.W., Franca F.O.S., Jorge M.T., Leite R.P., Nishioka S.A., Avila A., Sano-

Martins I.S., Tomy S.C., Santoro M.L., Chudzinski A.M., Castro S.C.B., Kamiguti A.S., Kelen E.M.A., Hirata M.H., Mirandolla R.M.S., Theaston R.D.G., Warrell D.A. Randomized comparative trial of three antivenin in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. Q J Med. 1993;86:315-325.

Chippaux J.P., Stock R.P., Alagón A. Report of the 2nd International Conference on Envenomations in Africa. Toxicon. 2005;46(1):115-118.

Chippaux J.P., Goyffon M. Venoms, Antivenin and Immunotherapy. Toxicon. 1998;36:823-846.

Christensen P.A. The preparation and purification of antivenin. Mem Inst Butantan. 1966;22:245-250.

de Roodt A.R., Dolab J.A., Hajos S.E., Fernández T., Segre L. Una modalidad diferente de inmunización para la obtención de suero antiofídico botrópico-crotálico en equinos. Revista Farmacéutica. 1996;138:9-20.

de Roodt A.R., Dolab J.A., Segre L. Accidentes por serpientes venenosas en grandes animales I. Therios. 1994;23:469-481.

de Roodt A.R., Dolab J.A., Fernández T., Segre L., Hajos S.E. Cross reactivity and heterologous neutralization of crotaline antivenin used in Argentina. Toxicon. 1998;36:1025-1038.

de Roodt A.R., Vidal J.C., Dolab J.A., Segre L. Terapéutica en el Envenenamiento por Serpientes. Generalidades y Tratamientos. Revista de Medicina Veterinaria. 1997;78:220-230.

de Roodt, A.R. Estudio Inmunobiológico del veneno de serpientes de importancia sanitaria de la Argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, 313 pp. 2002.

de Roodt A.R., García S.I., Gómez C.M., Estévez J., Alagón A., Gould E.G., Paniagua-Solís J.F., Dolab J.A., Curci O.H. Antitoxinas y Antivenenos para uso terapéutico. Acta Toxicológica Argentina. 2004;12(2):29-41.

de Roodt, A.R., Robelo, M.A., Rivero, M.M., Mattoni, S., Lúquez, R.N., Gould, E.G. Caninos Mordidos por serpientes venenosas en zonas

- urbanas y turísticas. Selecciones Veterinarias. 2006;14(4). Apartado de Toxicología.
- Driggers T. Venomous snakebite in horses. Comp Cont Educ Pract. 1995;17:235-242.
- Ek N. Serum levels of the immunoglobulins IgG and IgG(T) in horses. Acta Vet Scand. 1974;15:609-619.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7° Ed. Editorial Tabacalera, México DF, México, 2000.
- Farmacopea Nacional Argentina (FNA). Codex Medicamentarius Argentino. Suero Antiofidico Antitóxico. FNA Sexta Edición. II Parte. 1978.
- Fernández I., Takehara H.A., Santos A.C.R., Cormont F., Lattine D., Bazin H., Mota I. Neutralization of Bothropic and Crotalic venom toxic activities by IgG(T) and IgGa subclasses isolated from immune horse serum. Toxicon. 1997;35:931-936.
- Grasset E., Christensen P.A. Enzyme purification of polyvalent, South and Equatorial African colubrine and viperine venoms. T Roy Soc Trop Med H. 1947;41:207-211.
- Gutierrez J.M., Leon G., Lomonte B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. Clin Pharmacokinet. 2003;42:721-741.
- Hackett T.B., Wingfield W.E., Mazzaferro E.M., Benedetti J.S. Clinical findings associated with prairie rattlesnake bites in dogs: 100 cases (1989-1998). J Am Vet Med Assoc. 2002;220:1675-1680.
- Harlow E., Lane D. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1988.
- Higashi H.G., Guidolin R., Nishikawa A.K., Yamaguchi I.K., Lima M.L.S.R., Morais J.F., Dias da Silva W. Venenos botrópicos pre-tratados com inibidores ativos para os sitios enzimáticos de proteases e com substancia quelante preservan seu poder imunogénico. Mem Inst Butantan. 1989;51:107-115.
- Kangstrom L.E. Snake bite (*Vipera berus*) in dogs and cats. Svensk Veterinartiding. 1989;41:38-46.
- Kraft W., Reiner B., Bodner C. Snake bites in dogs. Tierarztl Prax K H. 1998; 26:104-109.
- Krifi M.N., El-Ayeb M., Dellagi K. The improvement and standarization of antivenom production in developing countries: comparing antivenom quality. J Venom Anim Toxins. 1999;5:128-141.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680-685.
- Lawal S., Abdu P.A., Jonathan G.B., Hamolu O.J. Snakebites in poultry. Vet Hum Toxicol. 1992;34:528-530.
- Leisewitz A.L., Blaylock L.S., Kettner F., Goodhead A., Goddard A., Schoeman J.P. The diagnosis and management of snakebite in dogs: a southern African perspective. J S Afr Vet Assoc. 2004;75:7-13.
- Le Moli S., Nisini R., Fattorossi A., Matricardi P.M., D'Amelio R. Intravenous immunoglobulins preparations: a comparative in vitro study of Fc mediated functions. J Clin Lab Immunol. 1989;29:79-84.
- Leon G., Rojas G., Lomonte B., Gutierrez J. M. Immunoglobulin G and F(ab)₂ polyvalent antivenoms do not differ in their ability to neutralize hemorrhage, edema and myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. Toxicon. 1997;35:1627-1637.
- Leon G., Stiles B., Alape A., Rojas G., Gutiérrez J.M. Comparative study on the ability of IgG and F(ab')₂ antivenin to neutralize lethal and myotoxic effects induced by *Micrurus nigrocinctus* (coral snake) venom. Am J Trop Med Hyg. 1999;61:266-271.
- Lobetti R.G., Joubert K. Retrospective study of snake envenomations in 155 dogs from the Onderstepoort area of South Africa. J S Afr Vet Assoc. 2004;75:169-172.
- Meier J., Theakston R.D.G. Approximate LD₅₀ determinations of snake venoms using eight to ten experimental animals. Toxicon. 1986;24:395-401.
- Mendez M.C., Riet-Correa F. Snakebite in sheep. Vet Hum Toxicol. 1995;37:62-63.

Ministerio de Salud. Guía de prevención, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica de los envenenamientos ofídicos. Resolución Ministerial (RM) 34/2007. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación; 2007. 48 p.

Ministerio de Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Normas Técnicas de Fabricação e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos, Antitóxicos e Antirrábico Aprobada pela vigilância sanitária. Brasil: Ministerio de Saúde. 1996.

Mirtschin P.J., Masci P., Paton D.C., Kuchel T. Snake bites recorded by veterinary practices in Australia. *Aust Vet J.* 1998;76:195-198.

Morais J.F., Freitas M.C.W., Yamaguchi I.K., Dos Santos M.C., Dias Da Silva W. Snake antivenin from hyperimmunized horses: comparison of the antivenom activity and biological properties of their whole IgG and F(ab')₂ fragments. *Toxicon.* 1994;32:725-734.

Moran N.F., Newman W.J., Theakston R.D.G., Warrell D.A., Wilkinson D. High incidence of early anaphylactoid reaction to SAIMR polyvalent snake antivenom. *T Roy Soc Trop Med H.* 1998;92:69-70.

Morell A. Various immunoglobulin preparations for intravenous use. *Vox Sang.* 1986;51:44-49.

Otero-Patiño R., Cardoso J.L., Higashi H.G., Nunez V., Diaz A., Toro M.F., Garcia M.E., Sierra A., Garcia L.F., Moreno A.M., Medina M.C., Castañeda N., Silva-Diaz J.F., Murcia M., Cardenas S.Y., Dias da Silva W.D. The Regional Group on Antivenom. Therapy Research (REGATHER). A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for Bothrops snake bites in Uraba, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58:183-189.

Pascoe R.R. Brown snake bite in horses in south-eastern Queensland. *J S Afr Vet Assoc.* 1975;46:129-131.

Physalix C., Bertrand G. Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de vipère. *C.R. Academie de Sciences.* 1894;117:356-358.

Pope C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. I. True digestion of the proteins. *Brit J Exp Pathol.* 1939a;20:132-149.

Pope C.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. II. Heat denaturation after partial enzyme action. *Brit J Exp Pathol.* 1939b;20:201-212.

Pope C.G., Stevens M.G. The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. III. Further studies on enzyme systems which split the antitoxin molecule. *Brit J Exp Pathol.* 1951;32:314-324.

Raw I., Guidolin R., Higashi H.G., Kelen E.M.A. Antivenins en Brazil: preparation. En: Tu A.T., Reptile Venoms and Toxins, Handbook of Natural Toxins, Vol 5. New York: Marcel Dekker; 1991. p. 557-581.

Reid H.A. Antivenom reactions and efficacy. *Lancet.* 1980;1:1024-1025.

Robertson I.D., Leggoe M., Dorling P.R., Shaw S.E., Clark W.T. A retrospective study of poisoning cases in dogs and cats: comparison between a rural and an urban practice. *Aust Vet J.* 1992;69:194-195.

Rojas G., Jiménez J.M., Gutiérrez J.M. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon.* 1994;32:351-363.

Sjostrom L., Al Abdulla I.H., Rawat S., Smith D.C., Landon J. A comparison of ovine and equine antivenin. *Toxicon.* 1994;32:427-433.

Stock R.P., Massougbdji A., Alagon A., Chippaux J.-P. Bringing antivenoms to Sub - Saharan Africa. *Nat Biotechnology.* 2007;2(2):173-177.

Sugiura T., Imagawa H., Kondo T. Purification of horse immunoglobulin isotypes based on differential elution properties of isotypes from protein A and protein G columns. *J Chromatogr B.* 2000;742:327-334.

Sullivan J.B.Jr. Past, present and future immunotherapy of snake venom poisoning. *Ann Emerg Med.* 1987;16:938-944.

Sutherland S.K., Lovering K.E. Antivenin: use and adverse reactions over a 12-month period in Australia and Papua New Guinea. *Austr Med J.* 1979;2:671-674.

Theakston R.G.D., Reid H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization.* 1983;61:949-956.

Theaskton R.D.G., Warrell D.A. Antivenin: a list of hyperimmune sera currently available for the treatment of envenoming by bites and stings. *Toxicon.* 1991;29:1419-1470.

Theakston R.D.G., Warrell D.A., Griffiths E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon.* 2003;41:541-557.

United States Pharmacopeia. The National Formulary (USP, NF). Antivenin Crotalidae.

United States Pharmacopeial Convention Inc. Rockville, Md. pp. 163. 2004.

Vaughan-Scott T., Lobetti R.G. Boomslang envenomation in a dog. *J S Afr Vet Assoc.* 1995 Dec;66(4):265-7.

von Behring E.A., Kitasato S. Über das zustandeommen der diphterie-immunität und der tetanus-immunität bei thieren. *Deut Med Wochenschr.* 1890;16:1113-1114.

World Health Organization. Progress in the Characterization of Venoms and Standardization of Antivenin. Offset Publication, WHO, Geneva, 1981.

Yeruham I., Avidar Y. Lethality in a ram from the bite of a Palestina viper (*Vipera xanthina palestinae*) *Vet Hum Toxicol.* 2002;44:26-27

TOXICITY OF THE ESSENTIAL OIL OF THE CYTRAL CHEMOTYPE OF *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN

Olivero-Verbel, Jesús^{1*}; Guerrero-Castilla, Angélica¹; Stashenko, Elena^{2*}

¹Environmental and Computational Chemistry Group. Faculty of Pharmaceutical Sciences. University of Cartagena, Campus of Zaragocilla, Cartagena, Colombia. ²Chromatography Laboratory, Research Centre for Biomolecules, CIBIMOL, CENIVAM, Industrial University of Santander, Bucaramanga, Colombia.

*Corresponding author: jesusolivero@yahoo.com - joliverov@unicartagena.edu.co

Resumen. TOXICIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown QUIMIOTIPO CITRAL. Jesús Olivero-Verbel; Angélica Guerrero-Castilla; Elena Stashenko. *Acta Toxicol Argent (2010) 18 (1): 21-27*. El aceite esencial (AE) de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) ha sido utilizado tradicionalmente para tratar varias enfermedades. En este estudio, los efectos tóxicos agudos del AE de *Lippia alba* quimiotipo citral fueron evaluados en ratones. Los animales fueron tratados por vía intraperitoneal recibiendo el AE en dosis entre 50 y 2500 mg/kg de peso, y el grupo control aceite de sésamo (vehículo). Dosis superiores a 1000 mg/kg del AE mostraron efectos neurotóxicos incluyendo disminución de la locomoción e hipotonía, disnea, cifosis y convulsiones. El AE fue letal a la dosis de 2500 mg/kg. Veinticuatro horas después de que los animales fueron tratados con 1000 mg/kg del AE se les realizó eutanasia y su sangre e hígado fueron recolectados para análisis. Los ratones expuestos al AE de *L. alba*, presentaron actividad alanina aminotransferasa (ALT) en plasma significativamente mayor que el grupo control. Dentro de los cambios histológicos hepáticos se incluyen inflamación leve, en particular, un aumento del tamaño nuclear. En comparación con el grupo control, la expresión de genes seleccionados tuvo diferencias significativas para FABP5, un gen relacionado con el transporte de ácidos grasos. En conclusión, la administración intraperitoneal del AE de *L. alba* (quimiotipo citral) causa daños neurológicos en ratones a una dosis igual o superior a 1500 mg/kg, mientras que a 1000 mg/kg, genera daño hepático leve. Por lo tanto, el uso sistémico de este AE plantea preocupaciones en cuanto a su seguridad.

Palabras clave: Aceite esencial; *Lippia alba*; Daño neurológico; Toxicidad aguda.

Abstract. TOXICITY OF THE ESSENTIAL OIL OF THE CYTRAL CHEMOTYPE OF *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. Jesús Olivero-Verbel; Angélica Guerrero-Castilla; Elena Stashenko. *Acta Toxicol Argent (2010) 18 (1): 21-27*. The essential oil (EO) of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) has been traditionally used to treat several diseases. In this study, the acute toxic effects of the citral chemotype of *L. alba* EO were evaluated in mice. Animals were treated via intraperitoneal receiving the *L. alba* essential oil at doses between 50 and 2500 mg/kg, and the control group received sesame oil (vehicle). The EO induced dose-dependent neurotoxic effects at doses greater than 1000 mg/kg, including decreased locomotion, motor skills and muscle strength, hypotonia, dyspnea, kyphosis and convulsions. The EO was lethal at a dose of 2500 mg/kg. Animals receiving 1000 mg/kg were euthanized at the end of the treatment period and their blood and livers were collected for analysis. Mice exposed to *L. alba* EO presented significantly greater plasma alanine aminotransferase (ALT) activities than the control group. Liver histological changes included mild inflammation, in particular, an increase in nuclear size. Compared to vehicle control group, changes in expression for selected genes were significant for FABP5, a fatty acid transport related gene. In summary, the intraperitoneal administration of *L. alba* EO (citral chemotype) causes neurological damage in mice at doses equal or greater than 1500 mg/kg, whereas at 1000 mg/kg, it generates mild liver damage. Therefore, the systemic use of this EO raises concerns about its safety.

Keywords: Essential oil; *Lippia alba*; Neurological damage; Acute toxicity.

INTRODUCTION

Essential oils (EOs) are complex mixtures of volatile compounds with diverse chemical-structure. They are composed of secondary metabolites that plants produce for their survival. EOs can be isolated from any part

of aromatic plants and are widely used in cosmetics, food industry and pharmaceuticals (Stashenko 2009). Within aromatic species, *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae) has been commonly used in natural and

traditional medicine in Latin America. *L. alba* is one of the most studied species within the *Lippia* genus, and several studies have described its use as a sedative, as well as for the treatment of digestive disorders (vomiting, flatulence, diarrhea, abdominal pain), respiratory infections (bronchitis, sore throat, flu, cough, cold), hypertension, anemia, and skin diseases (Hennebelle et al. 2008a). In Colombia, *L. alba* has been found to exist as three different chemotypes: carvona, citral/geranial and the mixed type carvone/citral. Other major components present in this EO include limonene, bicyclosesquiphellandrene, piperitenone, piperitone and β -bourbonene (Stashenko et al. 2004). Despite the fact that *L. alba* EO is currently used as either phytomedicine or food flavouring, the knowledge about its mammalian toxicity is scarce. Although this is also true for many other EOs, the available literature has registered a wide toxicological profile for these substances, in particular, at high doses, and depending on their chemical composition. These include lipid peroxidation and hepatic damage (Sztajnkrzyer et al. 2003; Akdogan et al. 2004), increases in kidney-body weight ratio (Odeyemi et al. 2009) and glutathione depletion (Lima et al. 2004), among others. However, it also should be stated that EOs have also been tested as protectors in different toxicity models such as those induced by cyclophosphamide (Rezvanfar et al. 2008) and carbon tetrachloride (Mansour et al. 2001). The aim of this work was to study the effects of the *L. alba* (citral chemotype) EO on a mice model of acute toxicity.

MATERIALS AND METHODS

L. alba EO (citral chemotype) was obtained by hydrodistillation from plants grown at the CENIVAM at the Industrial University of Santander, Bucaramanga, Colombia, and chemically characterized as described previously (Stashenko et al. 2004; Mesa-Arango et al. 2009; Olivero-Verbel et al. 2009). The species has been identified by botanist José Luis Fernández at the Institute of Natural Sciences of the National University of Colombia (Bogotá). A voucher of *L. alba* has been deposited at the Institute's Herbarium with the number 480750. Female BALBc mice, aged 8 to 10 weeks, were purchased from the National Institute of Health (INS), Bogotá, Colombia, and allowed to acclimate for a minimum of 2 weeks before the start of the experiments. Groups of 10 mice

were injected intraperitoneally with sesame oil (vehicle) or the citral chemotype of *L. alba* EO (50-2500 mg/kg), and their behaviour/signs and symptoms were followed for a 24 h period. Preliminary experiments showed that doses greater than 2500 mg/kg were lethal within minutes. Mice were given *ad libitum* access to food and water, housed in polycarbonate cages, and maintained in a climate-controlled room with a 12:12-h light-dark cycle in an animal facility at the University of Cartagena, Cartagena, Colombia. Mice receiving the maximum dose, at which not behavioral changes were noticed after the exposure period, were euthanized with sodium pentobarbital.

Portal blood was collected in sodium citrate, plasma isolated by centrifugation and alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities were measured spectrophotometrically using commercially available kits (Product Codes: ALT, 11568; AST, 11567, Biosystems, Barcelona, Spain). Liver was removed immediately after blood collection; a section was also immediately stored in RNA Later (Ambion, Austin, Texas, USA) for gene expression analysis. Another section was fixed with 10% buffered formalin, and subsequently embedded in paraffin for histological analysis. Sections were stained with hematoxylin and eosin using standard techniques. Sections were viewed without knowledge of the treatment group to which each animal had belonged.

Gene expression measurements were performed from RNA isolated from the liver using RNeasy Mini Kit (Qiagen, California, USA) as described by the manufacturer. cDNA was prepared from total mRNA using QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA). In this work we studied changes in mRNA expression on selected genes, representing different signaling pathways important in liver function, including oxidative stress defense mechanisms (superoxide dismutase, SOD), cholesterol metabolism (cholesterol 7 α -hydroxylase, CYP7A1; sterol regulatory element binding protein, SREBP), fatty acid transport (FABP5), fatty acid metabolism (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR α) and cell cycle regulation (cyclin, CYCL). Changes in gene expression were determined using real-time RT-PCR with β -actin as the reference gene. Each sample was run in duplicates on the LightCycler 1.5 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA).

Gene-specific primers for SOD (forward, 5'-GATTAAGTGAAGGCCAGCATG-3'; reverse, 5'-GGTCCATGAGAAACAAGAGAC-3'), PPAR α (forward, 5'-CAACGGCGTCGAAGACAAA-3'; reverse, 5'-CAACGGCGTCGAAGACAAA-3'), CYCL (forward, 5'-ACCCTGACACCAATCTCCTCAAC-3'; reverse, 5'-CAGAAGGAGATTGTGCCATCCA-3'), FABP5 (forward, 5'-GGAAGGAGAGCAGCATAACAAGA-3'; reverse, 5'-TGTGTCATGAACAATGCCACC-3'), SREBP (forward, 5'-GATCAAAGAGGAGCCAGTGC-3'; reverse, 5'-CACTCAGCAGCCACCATCTA-3'), CYP7A1 (forward, 5'-CTGTCATACCACAAAGTCTTATGTCA-3'; reverse, 5'-GGCATTGGACACAGAAGCAT-3'), and β -ACTIN (forward, 5'-CTTTGAGCTCCTTCGTTGC-3'; reverse, 5'-GCTGTATTCCCCTCCATCGT-3'), were designed based on sequences obtained from Gen-Bank. The relative expression of the target gene was calculated by the relative standard curve method, using a stock cDNA sample containing the target gene, from which a 2-fold serial dilution was made to obtain the curve. Negative controls, where no cDNA was added, were included in each run.

Ethical considerations

The study was conducted according to the declaration of Helsinki (Villar 1988), and following national scientific and ethical guidelines established in Law 84 of December 27, 1989, Chapter VI; as well as those in the Resolution 8430 of 1993, issued by the Colombian Ministry of Health.

Statistical analysis

All data were expressed as means \pm SE. A two-tailed *t*-test was used to compare vehicle vs. EO-treated groups. *P* values <0.05 were considered statistically significant. All statistics were performed using Prism software (version 5.0a).

RESULTS

Mice treated with vehicle control or doses of *L. alba* lower than 1000 mg/kg did not experience any signs or symptoms of toxicity during the 24 h surveillance. However, doses equal or greater than 1500 mg/kg induced several dose-dependent neurological and motor deficits (Table 1), mostly characterized by decreased locomotion and muscle strength, hypotonia, dyspnea, kyphosis and seizures. A greater dose (2500 mg/kg) was lethal for all mice within 24 h exposure (Figure 1), although 91% of them died during the first 12 hours. As 1000 mg/kg of *L. alba* EO did not cause any observable change in normal behaviour, this

Table 1. Characteristic signs and survival of BALB/c at different doses of *Lippia alba* essential oil.

Dose (mg/kg)	Time post-injection	Signs and symptoms
1500	15 min	Decreased locomotion, motor skills and muscle strength. Hypotonia, dyspnea, tachycardia and kyphosis.
	30 min	Seizures, ataxia, unbalance, uncoordinated gait, and disorientation.
	60 min	Redness in ears and legs.
	90 min	Apparent recovery of locomotion, balance and orientation.
	90 min - 24 h	Conditions improved and mice behave mostly normal as healthy mice, with the exception of fatigue, and changes in the hair appearance. However there are still signs of weakness and a low tolerance to manipulation.
2500	5 - 60 min	Loss of locomotion, motor skills, quadriplegia, hypotonia in the limbs.
	90 min	Animals showed a recovery in quadriplegia, but still presented ataxia, with a tendency to cluster with each other. At this time 27% of the population died because late complications of the respiratory system.
	120 min	Mice experienced motor convulsions and versive or circling seizures. Marked hypothermia and ataxia.
	2 - 22 h	Surviving mice showed versive or circling seizures, alternating with loss of locomotion, hypotonia, asthenia, and ataxia. Prior to death, animals presented fatigue, hypotonia, quadriplegia, marked dyspnea, cyanosis, hypothermia and bradycardia. Note: 18% (2/11) of treated mice showed cornea opacity.

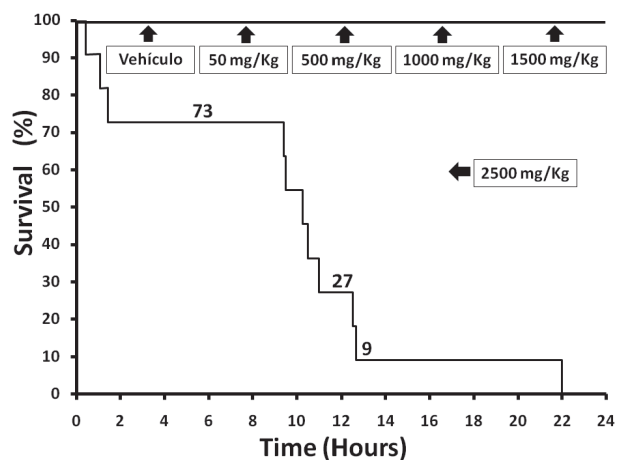


Figure 1. Survival of the different groups of mice exposed to vehicle (sesame oil) or *L. alba* EO.

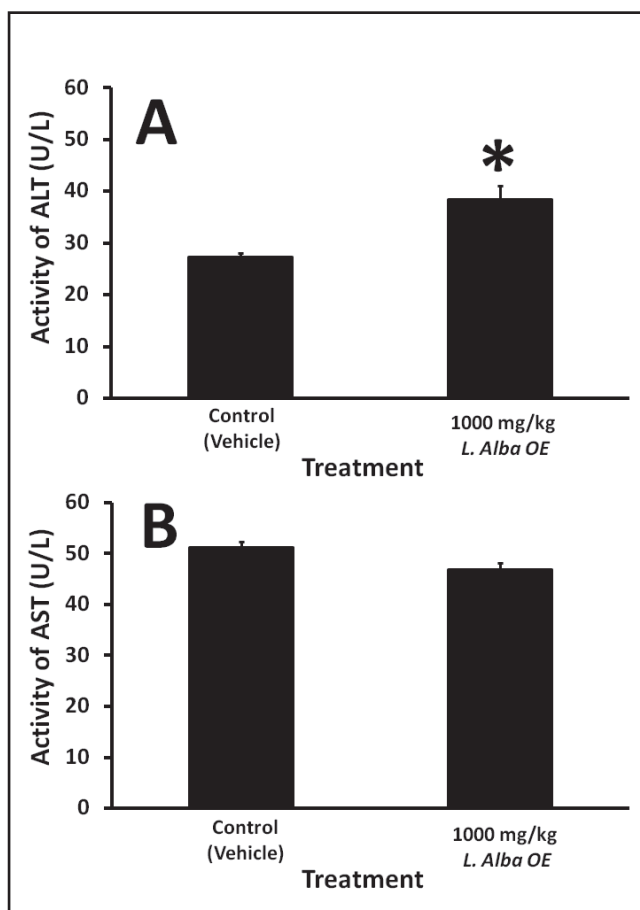


Figure 2. Plasma ALT (A) and AST (B) activities in vehicle or 1000 mg/kg *L. alba* EO-treated mice. *Significantly different from control ($P < 0.05$).

dose was chosen to study the effects on liver function. ALT activities in the 1000 mg/kg group was significantly higher than in the control group ($P < 0.05$), whereas AST activities did not change with the treatment (Figure 2). Although the ALT values in the EO-treated group were near 40% greater than in the control group, this increase in ALT is far from the threshold value used to define potential liver injury (Navarro and Senior 2006).

Compared to the vehicle group, mice treated with 1000 mg/kg of *L. alba* EO did not show significant histological liver lesions (Figure 3), with the exception of some minor inflammation, mostly characterized by increase in nuclear size, and few scattered polymorphonuclear-monocytic infiltrations.

Gene expression analysis of liver was performed on vehicle and 1000 mg/kg *L. alba* EO-treated mice after 24 h exposure and the results are presented in Figure 4. Treatment with EO significantly downregulated gene expression of FABP5 in the liver. On the other hand, SREBP was also downregulated, whereas SOD, PPAR- α , CYP7A1 and CYCL, were upregulated in the EO-treated group when average values were compared to control, although these changes in mRNA expression were not statistically significant.

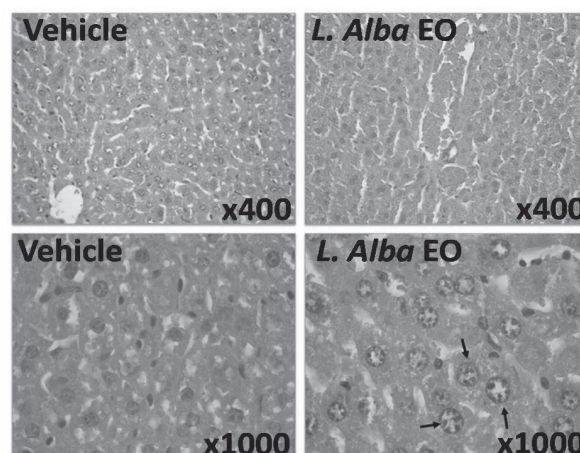


Figure 3. H&E staining of liver sections from vehicle- or 1000 mg/kg *L. alba* EO-treated mice. Vehicle-treated mice showed normal liver histology, whereas *L. alba* exposed group presented scattered foci of enlarged hepatocyte nucleus.

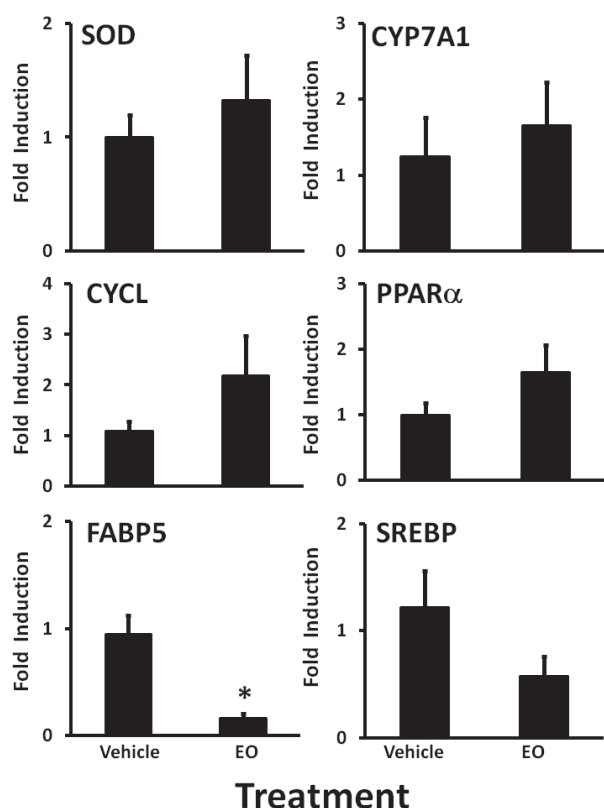


Figure 4. Liver mRNA expression of selected genes after mice exposure to vehicle or 1000 mg/kg *L. alba* EO. *Significantly different from control ($P < 0.05$).

DISCUSSION

L. alba has an important therapeutic background in traditional medicine. Different types of non volatile compounds isolated from this plant have shown antioxidant, neurosedative (Zétola et al. 2002; Hennebelle et al. 2008b), anticonvulsant (Neto et al. 2009) and antimicrobial (Oliveira et al. 2006) properties, whereas its EO has been shown to be antifungal (Mesa-Arango et al. 2009). However, up to now few studies have shown the *in vivo* toxic effects of its EO in eukaryotic species (Olivero-Verbel et al. 2009; Sena-Filho et al. 2009).

The present experimental study found that a high acute dose (>1000 mg/kg) of *L. alba* EO (citral chemotype) causes signs and symptoms of severe neurological damage, and also that a dose of 2500 mg/kg was lethal in a 24 h period. A previous report (Vale et al. 1999) used elevated plus maze, open field and rota rod tests to demonstrate that mice exposed to 50-200 mg/kg *L. alba* EO (all three chemotypes) developed behavioral changes, which varied according to the chemotype used in the assays. The mechanisms by which this

happens are not clear, though effects on the central nervous system may play a role, as it has been observed for citral, (Yang et al. 2009) one of the major components of the *L. alba* EO, probably as a result of retinoic acid deficiency (Zhang et al. 2009). On the other hand, it has also been reported that the ethanolic non-volatile fraction of *L. alba* presents sedative and myorelaxant effects (Zetola et al. 2002).

The level of ALT activity reflects damage to hepatocytes and it is considered to be a highly sensitive and fairly specific biomarker of hepatotoxicity (Ozer et al. 2008). Results reported here showed that the essential oil-treated group presented a small increase in ALT activity, suggesting that this EO has little hepatotoxicity, observation correlated to the mild histological effects observed. Moreover, this negligible increase in plasma ALT activity level could also be associated with other organ toxicities, especially considering that no changes were observed in AST activity.

This is the first report on the effects of *L. alba* EO on gene expression in mice liver. Gene expression analysis revealed that among several targets, only FABP5 was significantly downregulated by 1000 mg/kg EO. It has been suggested that the expression of FABP5 in liver parenchymal cells facilitates lipid uptake, transport, and metabolism as a response to the uptake of dietary lipids (Boord 2002; Glatz 2002). Therefore, downregulation of this gene could derive from decreased food intake, as a result of altered taste and smell senses, due to the volatile components of the EO, or as well as a consequence of central depression.

In average, SREBP was also downregulated in the EO-exposed group, although this event was not significant. However, some action on cholesterol metabolism cannot be completely neglected. On the other hand, the lack of significant effects of the EO on the expression of genes related to cholesterol metabolism (CYP7A1), fatty acid metabolism (PPAR α), cell cycle regulation (CYCL) and oxidative stress (SOD), might indicate that the liver is not a primary target for the EO. Moreover, the fact that no significant change in SOD RNA expression was produced by *L. alba* EO was not surprising, taking into account that this species has shown antioxidant properties (Aran and Nur 2009). Alternatively, it is important to state that, as also seen in the mortality study, the response to the EO in some animals is highly variable, and this could indeed impact the

significance obtained in the comparisons between groups. This observation adds uncertainty to the toxic effects associated with the acute exposure of the *L. alba* EO to mice, suggesting that care must be taken when evaluating possible health risks in humans.

CONCLUSION

High doses of the *L. alba* essential oil (citral chemotype) induced severe neurological and motor damage in mice. A dose with non observable neurological effects (1000 mg/kg) produced a mild liver inflammation and down-regulation of liver FABP5, a gene involved in lipid uptake, transport and metabolism.

Acknowledgements

The authors wish to thank Colciencias, Bogotá, and the University of Cartagena, Cartagena (Colombia) for their financial support (Grants RC 432-2004 and 110749326186-2009), as well as to Barbara Arroyo for her expertise.

REFERENCES

Akdogan M., Ozguner M., Aydin G., Gokalp O. Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* Labiatae and *Mentha spicata* Labiatae on liver tissue in rats. Hum Exp Toxicol. 2004;23:21-28.

Aran N., Nur H. In vitro antioxidant activity of methanolic leaves and flowers extracts of *Lippia alba*. Res J Med Medical Sci. 2009;4:107-110.

Boord J.B., Fazio S., Linton M.F. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. Curr Opin Lipidol. 2002;13:141-147.

Glatz J.F., Luiken J.J., Van Bilsen M., Van der Vusse G.J. Cellular lipid binding proteins as facilitators and regulators of lipid metabolism. Mol Cell Biochem. 2002;239:3-7.

Hennebelle T., Sahpaz S., Gressier B., Joseph H., Bailleul F. Antioxidant and neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba*. Phytother Res. 2008a;22:256-258.

Hennebelle T., Sahpaz S., Joseph H., Bailleul F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. J Ethnopharmacol. 2008b;16:211-222.

Lima C.F., Carvalho F., Fernandes E., Bastos M.L., Santos-Gomes P.C., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C. Evaluation of toxic/protective

effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. Toxicol In Vitro. 2004;18:457-465.

Mansour M.A., Ginawi O.T., El-Hadiyah T., El-Khatib A.S., Al-Shabanah O.A., Al-Sawaf H.A. Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 2001;110:239-25.

Mesa-Arango A.C., Montiel-Ramos J., Zapata B., Durán C., Betancur-Galvis L., Stashenko E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:878-884.

Navarro V.J., Senior J.R.N. Drug-related hepatotoxicity. Engl J Med. 2006;354:731-739.

Neto A.C., Netto J.C., Pereira P.S., Pereira A.M., Taleb-Contini S.H., França S.C., Marques M.O., Belebony R.O. The role of polar phytocomplexes on anticonvulsant effects of leaf extracts of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. J Pharm Pharmacol. 2009;61:933-939.

Odeyemi O., Yakubu M.T., Masika P.J., Afolayan A.J. Toxicological evaluation of the essential oil from *Mentha longifolia* L. subsp. capensis leaves in rats. J Med Food. 2009;12:669-674.

Oliveira D.R., Leitão G.G., Santos S.S., Bizzo H.R., Lopes D., Alviano C.S., Alviano D.S., Leitão S.G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil J Ethnopharmacol. 2006;108:103-108.

Olivero-Verbel J., Guette-Fernandez J., Stashenko H. Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromát. 2009;8(5):419-427.

Ozer J., Ratner M., Shaw M., Bailey W., Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. Toxicology. 2008;245:194-205.

Rezvanfar M., Sadrkhanlou R., Ahmadi A., Shojaei-Sadee H., Rezvanfar M., Mohamma-

dirad A., Salehnia A., Abdollahi M., Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. Hum Exp Toxicol. 2008;27:901-910.

Sena-Filho J.G., Durringer J., Souza I., Da Cunha E., Craig A.M., Silva M., Barbosa-Filho J., Xavier H. Phytochemistry and acute toxicity from the roots of *Lippia alba*. Pharmaceut Biol. 2009;47:142-145.

Stashenko E., Jaramillo B.E., Martinez J.R. Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiya aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. J Chromatogr A. 2004;1025:93-103.

Stashenko E. Propiedades y caracterización de los aceites esenciales. En: Aceites esenciales. División de publicaciones UIS - Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia, 2009. p. 85-124.

Sztajnkrzyer M.D., Otten E.J., Bond G.R., Lindsell C.J., Goetz R.J. Mitigation of pennyroyal oil hepatotoxicity in the mouse. Acad Emerg Med. 2003;10:1024-1028.

Vale T.G., Matos F.J., De Lima T.C., Viana G.S. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. J Ethnopharmacol. 1999;67:127-133.

Villar J. Recomendaciones de la declaración de Helsinki sobre la investigación clínica y guías principales en el cuidado y uso de animales de laboratorio. Med Clin. 1988;91:702-703.

Yang Z., Xi J., Li J., Qu W. Biphasic effect of citral, a flavoring and scenting agent, on spatial learning and memory in rats. Pharmacol Biochem Behav. 2009;93:391-396.

Zetola M., De Lima T.C.M., Sonaglio D. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba*-Verbenaceae (Brazilian false melissa). J Ethnopharmacol. 2002;82:207-215.

Zhang M., Wan C., Ji B., Zhang Z., Zhu H., Tian N., La Y., Huang K., Jiang L., He G., Gao L., Zhao X., Shi Y., Huang G., Feng G., He L. Proteome alteration of U251 human astrocytoma cell after inhibiting retinoic acid synthesis. Mol Cell Biochem. 2009;323:185-193.

RESÚMENES DE TESIS

FITORREMEDIACIÓN DE HERBICIDAS ORGANOCORADOS: DISEÑO DE ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA SU APLICACIÓN EN LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

Merini, Luciano J.

Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Junín 956, 6°, CABA. C1113ADD.

lmerini@ffyb.uba.ar

La fitorremediación es una tecnología emergente y en constante desarrollo desde la última década del siglo XX. El término fitorremediación se utilizó en sus inicios para referirse a técnicas de recuperación de sitios contaminados en las que participaba de manera directa o indirecta una especie vegetal. Actualmente, podríamos definir la fitorremediación, como el uso de vegetación y su microflora asociada para el tratamiento *in situ* de suelos, sedimentos o aguas contaminadas. A pesar que aún no cuenta con el reconocimiento de los métodos físico-químicos de descontaminación de suelo, la fitorremediación constituye por su bajo costo y su valor estético y ecológico una excelente herramienta para complementar para estos métodos o abordar proyectos de remediación de grandes extensiones moderadamente contaminadas. Los herbicidas organoclorados constituyen un problema de contaminación en suelos de la Pampa Húmeda, la región agrícola de mayor significación económica en nuestro país. En esta región, se practica una agricultura intensiva con rotación anual de cultivos. Allí, sólo el cultivo de maíz (un 10% del total), implica el uso de 6000 toneladas anuales de atrazina y 1500 toneladas anuales de fenoxiherbicidas. El incesante uso, la topografía y las características edáficas de la Pampa Húmeda, son los principales factores que determinan la percolación y migración horizontal de los herbicidas. Esto hace que estos pesticidas y/o sus productos de degradación no se circunscriban a la zona de aplicación y afecten áreas linderas, contaminando suelos y napas superficiales y profundas.

El objetivo general de este trabajo fue generar conocimientos que permitan desarrollar estrategias biotecnológicas para fitorremediar

suelos agrícolas contaminados por la aplicación de herbicidas organoclorados. Con estos conocimientos se ensayó la aplicabilidad de las diferentes estrategias en ensayos de degradación a escala laboratorio (ensayos con microcosmos), a fin de obtener información para su potencial aplicación a campo (parcelas seleccionadas a campo).

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se seleccionaron lotes representativos de la región central de la Pampa Ondulada, con y sin historia de uso de herbicidas, que representaron cabalmente el tipo de suelos dominante y el modelo de explotación agrícola intensiva. Estos suelos pertenecen al orden taxonómico "Molisoles", que combinan un alto contenido de material húmico con un regular contenido de arcillas, lo que conformó una matriz de gran complejidad desde el punto de vista analítico. En este sentido, se optimizó la extracción y cuantificación de herbicidas y sus metabolitos, lo que permitió disponer de una herramienta segura para monitorear la evolución de los procesos de remediación. Así mismo, se diseñaron y optimizaron unidades experimentales de distinto grado de complejidad que permitieron evaluar la contribución de cada uno de los componentes (bióticos y abióticos) al proceso de fitorremediación. El sistema seleccionado garantizó el desarrollo de la especie vegetal, la actividad rizosférica, el mantenimiento de la esterilidad (cuando se requirió) y niveles controlados de humedad durante todo el ensayo. En estos sistemas experimentales se evaluó la influencia de la historia de aplicación de herbicidas y la presencia de plantas (*Medicago sativa* y *Zea mais*), sobre la disipación de los herbicidas, la evolución de la microflora del suelo y los efectos

sobre la fisiología vegetal, a través del tiempo. Estos sistemas fueron incubados en condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo y humedad.

Los resultados obtenidos mostraron que: a) La degradación biológica fue el principal componente en la disipación de 2,4-DB y 2,4-D y la contribución de factores abióticos fue mínima en las condiciones ensayadas. b) El 2,4-DB y 2,4-D fueron rápidamente degradados y la permanencia de su principal metabolito (2,4-DCP) en el suelo dependió de la presencia de plantas y microorganismos del suelo. c) El alto número de bacterias degradadoras presentes en suelos bajo prácticas agrícolas intensivas y con historia de uso de fenoxi herbicidas, reveló la presencia de microorganismos cultivables que podrían ser utilizados en futuros ensayos de remediación a escala, incluyendo estrategias de bioaumentación.

Con el fin de abordar procesos de fitorremediación aplicables a través de estrategias específicas para la Pampa Húmeda se evaluaron, a través de ensayos de tolerancia al herbicida, distintas especies candidatas. Dado el contexto de aplicación de esta tecnología, se seleccionaron las especies candidatas en base a sus propiedades agronómicas y a las estrategias planteadas para las particularidades de cada sitio (sitio especificidad).

Del *screening* efectuado, se demostró, por

primera vez, la tolerancia de *Lolium multiflorum* a dosis agronómicas de atrazina y se probó que el metabolismo aumentado vía P_{450} es el mecanismo responsable de su tolerancia. La tolerancia a atrazina y la versatilidad para crecer en todos los suelos y climas de la Pampa Húmeda determinaron la selección de *L. multiflorum* como especie vegetal más adecuada para diseñar procesos de fitorremediación en esta región.

La velocidad y niveles de degradación alcanzados en los suelos implantados con *L. multiflorum* y su versatilidad cultural, permiten ampliar la estrategia planteada para los cultivos de maíz en la Pampa Ondulada, hacia el diseño de reducción del "run-off" en la Pampa Deprimida.

La implantación de *L. multiflorum* podría constituir una herramienta versátil de fitorremediación, capaz de ser implementada en toda la Llanura Pampeana, donde más de 6000 toneladas de atrazina son aplicadas cada año. Esto constituye una ventaja en términos de fitorremediación, ya que su presencia, independientemente de su participación en la degradación del herbicida, asegura mejoras en la calidad de nutrientes y estructura de los suelo.

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Directora: Dra. Ana María Giulietti

SIMILITUD BIOQUÍMICA E INMUNOQUÍMICA ENTRE VENENOS DE CORALILLOS NORTEAMERICANOS

Bénard-Valle, Melisa

Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de México. Av. Universidad 1001, colonia Chamilpa. Cuernavaca, Morelos.
mel@ibt.unam.mx

En México y E.U.A., las mordeduras por serpiente de coral (géneros *Micrurus* y *Micruroides*) representan alrededor del 1% de los accidentes ofídicos. Sin embargo, la alta toxicidad del veneno y el riesgo de muerte por insuficiencia respiratoria hacen de estos envenenamientos una seria emergencia médica. El cuadro clínico ocasionado por éstos es principalmente neurotóxico, y es causado por una mezcla muy poco estudiada de toxinas, presumiblemente activas a nivel de la unión neuromuscular. Sorprendentemente, de entre las 17 especies presentes en Norteamérica sólo los venenos de *M. fulvius* y *M. laticollaris* han sido estudiados con cierto detalle. El antiveneno comercial Coralmyn®, un faboterápico generado mediante la inmunización de caballos con el veneno de *Micrurus nigrocinctus*, es utilizado en México para tratar estos envenenamientos. Aunque se ha comprobado su eficacia clínica, se ha observado que presenta una baja potencia neutralizante contra algunas especies.

El objetivo del presente trabajo fue obtener información respecto a las características bioquímicas de los venenos de coralillos norteamericanos así como determinar grupos antigénicos con base en la similitud inmunológica entre ellos.

Se utilizaron venenos de 11 especies de coralillos mexicanos (*M. browni*, *M. diastema*, *M. distans*, *M. elegans*, *M. ephippifer*, *M. laticollaris*, *M. latifasciatus*, *M. limbatus*, *M. nigrocinctus*, *M. tener* y *Micruroides euryxanthus*), una especie estadounidense (*M. fulvius*) y una sudamericana (*M. surinamensis*). Los venenos de *Naja nigricollis* y *Atropoides nummifer* se utilizaron como comparativos. Todos los venenos fueron obtenidos mediante la ordeña de ejemplares mantenidos en el Herpetario Kiinam/IBT UNAM excepto el de *Naja nigricollis* que fue comprado a la empresa Latoxan (L1327).

Los venenos fueron cargados en geles de SDS-PAGE al 17%. El fraccionamiento se llevó a cabo mediante un sistema FPLC de intercambio catiónico con una columna MonoS estabilizada en acetato de amonio 50 mM pH 4,7, y la elución se realizó con el mismo buffer + NaCl 2 M (0-60% B en 80 min. Flujo 1 ml/min). Se determinó actividad de PLA₂ mediante un ensayo titulométrico sobre yema de huevo al 10% a pH 8,0 y titulando con NaOH 50 mM. La actividad hemolítica directa fue determinada cuantificando la hemoglobina liberada (A_{540nm}) después de 10 minutos de incubación de los venenos con eritrocitos humanos. Finalmente, la Dosis Letal Media (DL₅₀) fue determinada por vía intravenosa en ratones de la cepa CD1 entre 18 y 20 g.

El análisis inmunológico se realizó utilizando el antiveneno comercial Coralmyn® así como dos sueros hiperinmunes experimentales desarrollados previamente. El primero de estos sueros fue generado mediante la inmunización de un caballo con el veneno crudo de *M. laticollaris*. El segundo fue generado mediante la inmunización de conejos con una α -neurotoxina letal purificada del veneno de *M. laticollaris* denominada MlatA1. Se realizaron ensayos de tipo Western Blot y ELISA. Posteriormente, se determinó la potencia neutralizante *in vivo* del suero de caballo anti-*M. laticollaris*, inoculando por vía intravenosa ratones de la cepa CD1 con 3 DL₅₀s de cada veneno previamente incubado con distintas cantidades de suero. Finalmente, estos datos fueron utilizados para evaluar la similitud inmunológica entre los venenos y generar grupos antigénicos. Todos los datos de ELISA, DL₅₀ y potencia neutralizante fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism 4.0.

Todos los venenos presentaron perfiles proteicos complejos en los cuales la mayoría de los componentes resultaron tener pesos

moleculares entre 4 y 18 KDa, aunque también se observaron algunas bandas poco abundantes de alto peso molecular. Se observó actividad de PLA₂ en todos los venenos. Por otro lado, sólo los venenos de *M. fulvius*, *M. laticollaris* y *M. laifasciatus* mostraron actividad hemolítica directa (15,6; 14,7 y 14,2% de la hemólisis causada por 1 ml de agua destilada, respectivamente). Se determinaron valores de DL₅₀ entre 5 y 24,5 ug/ratón, similares a los reportados para algunas especies de coralillos centro y sudamericanas. Se observaron variaciones interespecíficas muy significativas. No existió una correlación evidente entre la letalidad de los venenos y la presencia de cierta actividad o grupo de componentes.

Tanto Coralmyn® como el suero de caballo anti-*M. laticollaris* reconocen componentes alrededor de los 14 KDa, así como algunos de alto peso molecular, sin embargo, sólo Coralmyn reconoce los componentes alrededor de 7 KDa. El suero de conejo anti-MlatA1 reconoce bandas en 5 de los venenos probados, lo cual sugiere importantes diferencias inmunológicas en este tipo de toxinas entre las distintas especies de *Micrurus*. El suero de caballo anti-*M. laticollaris* presenta alta potencia neutralizante (0,49 a 1,67 mg de veneno neutralizados por ml de suero) contra los venenos

de *M. laticollaris*, *M. diastema*, *M. ephippifer*, *M. distans* y *M. browni*, mientras que los venenos de *M. latifasciatus*, *M. limbatus*, *M. nigrocinctus*, *M. fulvius* y *M. tener* son pobremente neutralizados (0,15 a 0,26 mgV/mlAV).

Finalmente, los datos de reactividad del suero de conejo anti-MlatA1 y de potencia neutralizante del suero de caballo anti-*M. laticollaris* fueron utilizados como criterio para generar los siguientes cuatro grupos antigénicos: Grupo I, *M. diastema* y *M. laticollaris*; Grupo II, *M. browni*, *M. distans* y *M. ephippifer*; Grupo III, *M. latifasciatus* y *M. limbatus*; Grupo IV, *M. fulvius*, *M. nigrocinctus* y *M. tener*.

Conclusiones. Los venenos presentan tres grupos principales de componentes: a.) Nucleósidos; b.) Tipo PLA₂ (≈14 Kda); c.) Tipo α-neurotoxinas (≈7 KDa). Existen al menos dos grupos antigénicos de α-neurotoxinas. Se determinaron cuatro grupos antigénicos.

Este trabajo contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México y del Instituto Bioclon, México.

Tesis profesional por etapas para obtener el título de Biólogo, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Biológicas.

Director: M. en C. Alejandro Carbajal Saucedo

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, 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.

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 cam-

bios 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

Los manuscritos se pueden remitir por vía electrónica a: envios.acta.ATA@gmail.com o en CD-ROM por correo postal a: Alsina 1441, oficina 302, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1088AAK).

En el caso de envío electrónico indicar en el asunto: "manuscrito para *Acta*" y en el cuerpo del mensaje indicar el título del trabajo y los nombres y apellidos de todos los autores. Adjuntar el manuscrito (archivo de Word 2003 o superior) redactado según las instrucciones para los autores que se detallan más abajo.

Junto con el envío del manuscrito se deberá enviar una carta al Director en formato Word, con el nombre de todos los autores solicitando la consideración del artículo para su publicación. En la carta deberá constar claramente que:

- El trabajo remitido no ha sido publicado en ningún medio y no será enviado a otra revista científica o a cualquier otra forma de publicación, mientras dure la evaluación en *Acta*.
- Todos los autores son responsables del contenido del artículo.
- Todos los autores manifiestan si hubo o no, conflicto de intereses. De haber financiación externa, aclarar cuál fue la fuente. Asimismo, señalar si uno o más de los autores tiene alguna relación con la compañía comercial cuyo producto/s fueron empleados o son mencionados en el estudio realizado.
- En caso que el artículo sea publicado, todos los autores ceden los derechos de autor al *Acta*.

No se podrá iniciar el proceso editorial si la carta no contiene todos los puntos señalados.

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

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

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

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

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

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

Resultados. Se presentarán a través de una de las siguientes formas: en el texto, o mediante tabla/s y/o figura/s. Se evitarán repeticiones y se destacarán sólo los datos importantes. Se dejará para la sección Discusión la interpretación más extensa.

Las **tablas** se presentarán en hoja aparte,

numeradas consecutivamente con números arábigos, con las leyendas y/o aclaraciones que correspondan al pie. Las llamadas para las aclaraciones al pie se harán empleando números arábigos entre paréntesis y superíndice. Sólo los bordes externos de la primera y la última fila y la separación entre los títulos de las columnas y los datos se marcarán con línea continua. No se marcarán los bordes de las columnas. Asegúrese que cada tabla sea citada en el texto. Las **figuras** se presentarán en hoja aparte, numeradas consecutivamente con números arábigos. Los dibujos deberán estar en condiciones que aseguren una adecuada reproducción. Los gráficos de barras, tortas o estadísticas deberán tener formato GIF. Los números, letras y signos tendrán dimensiones adecuadas para ser legibles cuando se hagan las reducciones necesarias. Las referencias de los símbolos utilizados en las figuras deberán ser incluidas en el texto de la leyenda.

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

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

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

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

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

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

Todos los valores de parámetros hematológicos y bioquímicos se presentarán en unidades del sistema métrico decimal, de acuerdo con el

Sistema Internacional de Unidades (SI). No obstante, los editores podrán solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores añadan unidades alternativas o distintas de las del SI.

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

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

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

Bibliografía. Las citas bibliográficas se señalarán en el texto mediante el apellido del/los autor/es (hasta dos autores) y el año de publicación todo entre paréntesis, separados por punto y coma en el caso de más de una cita, empezando por la cita más antigua a la más actual. En el caso de más de dos autores se señalará el apellido del primer autor seguido de y col. y el año de la publicación.

Ejemplos:

“La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es la sustancia psicoactiva más consumida en el mundo (Concon 1988; Lewin 1998; Nehlig 1999)”.

“El consenso general es que sería deseable que la ingesta total de cafeína durante el embarazo no supere los 300 mg/día (Organization of Teratology Information Specialists (OTIS) 2001; Kaiser y Allen 2002; Nawrot y col. 2003)”.

Las referencias bibliográficas completas se incluirán al final del manuscrito bajo el título de Bibliografía Citada, en orden alfabético, con el nombre de todos los autores en cada caso.

Ejemplos:

1. Artículo estándar en publicación periódica Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L.

Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2002;347(4):284-287.

2. Libros y monografías
Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A.. *Medical microbiology.* 4th ed. St. Louis: Mosby, 2002.
3. Capítulo de libro
Meltzer P.S., Kallioniemi A., Trent J.M. Chromosome alterations in human solid tumors. En: Vogelstein B., Kinzler K.W., editores. *The genetic basis of human cancer.* New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.
4. Material electrónico
 - a. Artículo en publicación periódica en internet Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [en línea]. 2002 Jun. [consulta 12 de Agosto 2002];102(6):[1 p.]. Disponible en: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htmArticle>
 - b. Página en internet Cancer-Pain.org [en línea]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [actualizado al 16 de Mayo de 2002; consulta 9 de Julio de 2002]. Disponible en: <http://www.cancer-pain.org/>.
 - c. Parte de una página de internet American Medical Association [en línea]. Chicago: The Association; c1995-2002 [actualizado al 23 de Agosto de 2001; consulta 12 de Agosto de 2002]. AMA Office of Group Practice Liaison. Disponible en: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

Para la correcta citación de posibles referencias bibliográficas que pudiesen no citarse en este instructivo, consultar el estilo propuesto por el Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas en “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals disponible en: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

INSTRUCTIONS TO CONTRIBUTORS

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

The goal of *Acta Toxicológica Argentina* is to publish articles concerning all areas of Toxicology, including original articles, case reports, short communications, revisions, popularization of science articles, technical notes, 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.

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

Manuscripts can be submitted in electronic

form by the e-mail address to: envios.acta.ATA@gmail.com, or sent in CD-ROM to the postal address: Alsina 1441, office 302, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1088AAK).

For electronic submissions, please include "Manuscript for *Acta*" in the subject. The body of the e-mail should contain the title of the article, as well as the first and last name of all authors. Articles must be attached as Microsoft Word 2003 files or higher, and be in accordance to the guide for authors specified below.

A letter to the Director in Word format in the name of all authors requesting the article be considered for publication also needs to be included. This letter should clearly state that:

- The submitted article has not been published, is not under consideration for publication elsewhere, and will not be sent to another journal or published in any way until the reviewing process in *Acta* concludes.
- All authors are responsible for the content of the article.
- All authors express whether any conflict of interest arose from the study. If they received external funding, the source should be declared. Likewise, any association between authors and commercial companies whose product/s were used or mentioned in the study must be stated.
- If the article is accepted for publication, all authors agree to transfer copyright to *Acta*.

If one or more of these items are not addressed in the letter the editorial process cannot be initiated.

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 (in capital letters), full name and affiliations of all

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

Second page must include an English title and the abstract, both in the language of submission and in English, each followed by four key words in the corresponding language. If the article is written in English, then the abstract in Spanish must be provided. Keywords must be headed by capital letters and separated by semicolons.

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

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

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

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

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

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

Figures should be numbered consecutively with Arabic numerals and presented in separate pages. Drawings must be of good enough quality to ensure adequate reproduction. Bar,

pie or statistical charts must be prepared in GIF format. Numbers, letters and signs within figures must be of the appropriate size to be legible when the final sizing takes place. All signs used must have a reference in the figure caption.

Black-and-white only **photographs** should have proper contrast and a minimum resolution of 300 dpi. Submit all original drawings and photographs in glossy paper with the authors' name and figure number written in pencil in the back. For the electronic submission, photographs should be in high resolution JPEG or GIF formats. Both figures and photographs must be clearly legible. The minimum size for figures is half-letter paper size (21 x 15 cm) at 300 dpi. Magnification must be indicated whether by a scale bar or the magnification number.

Present figure captions in a separate page, accordingly numbered. Only the elements visible in the corresponding figure must be included in the caption.

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

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

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

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

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

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

References. Citations in the text consist of the authors' last name (up to two authors) and the year of publication in parentheses. In the case

of more than one citation, list them from the oldest to the newest and separate citations by semicolons. For more than two authors, only cite the first author's last name followed by *et al.* and the year of publication.

Examples:

"Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is the psychoactive substance with the largest consumption worldwide (Concon 1988; Lewin 1998; Nehlig 1999)".

"During pregnancy the total consumption of caffeine should not exceed 300 mg/day (Organization of Teratology Information Specialists (OTIS) 2001; Kaiser and Allen 2002; Nawrot *et al.* 2003)".

Full references must be listed alphabetically at the end of the manuscript under the subheading References.

Examples:

1. Standard article in periodical publications.
Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2002;347(4):284-7.
2. Books and monographs.
Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. *Medical microbiology.* 4th ed. St. Louis: Mosby, 2002.
3. Book chapters.
Meltzer P.S., Kallioniemi A., Trent J.M.

Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B., Kinzler K.W., editors. *The genetic basis of human cancer.* New York: McGraw-Hill; 2002. P. 93-113.

4. Electronic material.

a. Article published in an online journal.
Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [on line]. 2002 Jun. [accessed August 12, 2002];102(6):[1 p.]. Available at: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>Article

b. Website.Cancer-Pain.org [online]. New York: Association of Cancer On line Resources, Inc.; c2000-01[updated May 16, 2002; accessed July 9, 2002]. Available at: <http://www.cancer-pain.org/>.

c. Partial website. American Medical Association [online]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated August 23, 2001; accessed August 12, 2002]. AMA Office of Group Practice Liaison. Available at: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

For correct citation please refer to the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" proposed by the International Committee of Medical Journals Directors, available at: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

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

Acta Toxicológica Argentina (em diante *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 trabalhos podem ser enviados por via eletrônica à: envios.acta.ATA@gmail.com ou em CD-ROM por correio postal à: Alsina 1441, oficina 302, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1088AAK).

No caso de envio eletrônico, indicar no assunto: trabalho para *Acta* e no corpo da mensagem indicar o título do trabalho e os nomes e sobrenomes de todos os autores. Anexar o trabalho (arquivo de Word 2003 ou superior) digitado segundo instruções para autores detalhadas abaixo. Junto com o envio do trabalho deverá ser enviada uma carta ao Diretor em formato Word, com os nomes de todos os autores solicitando a consideração do artigo para publicação. Na carta deverá constar claramente que:

- O trabalho enviado não tenha sido publicado em nenhum outro meio e não será enviado a outra revista científica ou a qualquer outra forma de publicação, enquanto dure a avaliação na *Acta*.
- Todos os autores são responsáveis pelo conteúdo do artigo.
- Todos os autores deverão manifestar se houve ou não conflito de interesses. Se houver financiamento externo, deverá deixar clara a fonte. Assim mesmo, indicar se um ou mais autores tem alguma relação com a companhia comercial cujo produto/s foram empregados ou são mencionados no estudo realizado.
- Em caso do artigo ser publicado, todos os autores cedem os direitos de autor à *Acta*.

Não poderá dar-se por iniciado o processo editorial se a carta não contiver todos os pontos indicados.

Aspectos gerais na preparação do trabalho como artigo original:

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

Na primeira página deverá estar indicado: título do trabalho (maiúscula), nomes e sobre-

nomes completos de todos os autores; lugar de trabalho (nome da instituição e endereço postal), se houver autores com distintos lugares de trabalho, deverão ser colocados super-índices numéricos, não entre parênteses, junto aos nomes, para identificar cada autor com seu respectivo lugar de trabalho; fax e/ou correio eletrônico do autor responsável correspondente (que será indicado com um asterisco na posição de super-índice localizado junto ao nome).

Na segunda página será incluído título em inglês e o resumo no idioma do artigo e em inglês, seguido cada um deles de uma lista de quatro palavras-chave, no idioma correspondente. Se o trabalho estiver escrito em inglês, deverá apresentar um resumo em espanhol. As palavras-chave devem começar com letra maiúscula e estar separadas por ponto-e-vírgula.

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

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

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

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

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

As **tabelas** deverão ser apresentadas em folha à parte, numeradas consecutivamente com números arábicos, com as **aclarações** correspondentes. Os avisos para esclarecimentos de rodapé deverão ser realizados empregando

números arábicos entre parênteses e super-índice. Somente as bordas externas da primeira e última linhas e a separação entre os títulos das colunas e os dados deverão ser marcados com linha contínua. Não marcar as bordas das colunas. Assegurar-se de que cada tabela seja citada no texto.

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

As **fotografias** deverão ser feitas 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).

As epígrafes das figuras deverão ser apresentadas exclusivamente em folha à parte, ordenadas e numeradas, e deverão expressar especificamente o que mostra a figura.

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

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

os autores agreguem unidades alternativas ou diferentes das do SI.

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

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

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

Bibliografia. As citações bibliográficas deverão estar indicadas no texto por meio do sobrenome

de/os autor/es (até dois autores) e o ano de publicação, tudo entre parênteses, separados por ponto-e-vírgula, e no caso de mais de uma citação, deve-se começar pela mais antiga à mais atual. No caso de mais de dois autores, serão indicados o sobrenome do primeiro autor seguido de *et al.* e o ano da publicação.

Exemplos:

“A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma substância psicoativa mais consumida no mundo (Concon 1988; Lewin 1998; Nehlig 1999)”.

“Em um consenso geral, seria desejável que a ingestão total de cafeína durante a gravidez supere 300 mg/dia (Organization of Teratology Information Specialists (OTIS) 2001; Kaiser y Allen 2002; Nawrot *et al.* 2003)”.

As referências bibliográficas completas serão incluídas ao final do trabalho, abaixo do título da Bibliografia Citada, em ordem alfabética, com o nome de todos os autores em cada caso.

Exemplos:

1. Artigo padrão em publicação periódica

Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected pa-

tients. N Engl J Med. 2002;347(4):284-287.

2. Livros e monografias

Murray P.R., Rosenthal K.S., Kobayashi G.S., Pfaller M.A.. Medical microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby, 2002.

3. Capítulo de livro

Meltzer P.S., Kallioniemi A., Trent J.M. Chromosome alterations in human solid tumors. En: Vogelstein B., Kinzler K.W., editores. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw- Hill; 2002. p. 93-113.

4. Material eletrônico

a. Artigo em publicação periódica em internet Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [on-line]. 2002 Jun. [consulta 12 de Agosto 2002];102(6):[1 p.]. Disponível em: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htmArticle>.

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

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

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