

**DIMENSÃO FRACTAL EM ACHADOS HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE RATOS  
WISTAR INTOXICADOS EXPERIMENTALMENTE COM VENENO DE *Crotalus  
durissus terrificus***

**ISABELLA KEYKO NAVARRO  
SANESHIGUE DOS SANTOS**

**DIMENSÃO FRACTAL EM ACHADOS HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE RATOS  
Wistar INTOXICADOS EXPERIMENTALMENTE COM VENENO DE *Crotalus  
durissus terrificus***

**ISABELLA KEYKO NAVARRO  
SANESHIGUE DOS SANTOS**

Dissertação de Mestrado apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Maria Barilli Nogueira

636.089 59 Santos, Isabella Keyko Navarro Saneshigue dos  
S237d Dimensão Fractal em achados histológicos de  
fígado de ratos *wistar* intoxicados  
experimentalmente com veneno de *Crotalus  
durissus terrificus* / Isabella Keyko Navarro  
Saneshigue dos Santos. – Presidente Prudente,  
2017.

52 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,  
Presidente Prudente, SP, 2017.

Bibliografia.

Orientador: Rosa Maria Barilli Nogueira.

1. *Crotalus*. 2. Dimensão fractal. 3. Rato. 4.  
Histologia. I. Título.

**Campus I** Rua José Bongiovani, 700 · Cidade Universitária · CEP 19050 920 · Presidente Prudente SP · Tel| Fax: 18 3229 1000

**Campus II** Rodovia Raposo Tavares, Km 572 · Bairro Limoeiro · CEP 19067 175 · Presidente Prudente SP · Tel| Fax: 18 3229 2000

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** “DIMENSÃO FRACTAL EM ACHADOS HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE RATOS *WISTAR* INTOXICADOS EXPERIMENTALMENTE COM VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*”

**AUTOR(A):** ISABELLA KEYKO NAVARRO SANESHIGUE DOS SANTOS


**ORIENTADOR(A):** ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

Área de Concentração: FISIOPATOLOGIA ANIMAL

### COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Cecília Braga Laposy   
UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. Leonice Seolin Dias   
Bióloga - Autônoma / Presidente Prudente (SP)

Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira   
UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Presidente Prudente, 24 de novembro de 2017.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho á minha família pela força incondicional que me deram nesses dois anos de estudo, por não medirem esforços para que eu conseguisse concluir o Mestrado, fazendo desse sonho a realidade.

Agradeço aos meus Pais Neli E. Navarro e Elvis Katsumi Saneshigue, pelo incentivo e ajuda nessa jornada, assim como em todas as outras. Pelo amor, carinho e exemplo que me dão na vida, isso faz toda diferença.

Ao meu marido Mailton de Oliveira dos Santos pela paciência, por me encorajar e incentivar e acreditar que sou capaz nos momentos de dificuldades, fazendo com que eu não desista dos meus sonhos. Obrigado por seu grande amor em nossa família, tornando as dificuldades menores com o seu jeito de ser.

Ao meu avô Hiros Saneshigue, serei eternamente grata por tudo que fez por mim durante o mestrado, pela disponibilidade em me trazer à faculdade, por todas as vezes que precisei e sempre esteve ao meu lado me apoiando em tudo, fazendo das minhas prioridades as suas. Não tenho palavras para descrever a enorme gratidão pelo senhor !!

À minha querida filha Anne Tamie Saneshigue dos Santos por ser a minha força. Com você aprendi que posso mais e faço mais por você !!

À toda minha família, avós, Ana Tamie Hara Saneshigue pelo carinho imenso que tem por mim, pela serenidade e confiança que me passa, isso é essencial em todos os momentos. Aos meus Avós Maria Assunta Sacco Navarro e Jorge Navarro pelas tantas ajudas no decorrer desse caminho, o que pode não parecer mas tornaram as coisas mais fáceis.

Aos meus irmãos Isadora Midori Navarro Saneshigue e Daniel Toshio Navarro Saneshigue pela amizade, cumplicidade e carinho que tem comigo.

E é claro, a minha grande orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosa Maria Barilli Nogueira, amiga, paciente e prestativa, sempre de prontidão para compartilhar todo o seu conhecimento científico comigo, incentivando, e direcionando os caminhos para esta realização. Meu eterno muito obrigado, não tenho as palavras corretas para descrever o quanto me sinto honrada por você ser minha orientadora.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela oportunidade do mestrado e por nunca me desamparar nesse caminho me ensinando e capacitando.

À minha querida família, sem vocês não seria possível a realização de tudo isso, pela força incondicional.

Aos meus queridos amigos, Carolini Cervini, que tive o privilégio de conhecer no Mestrado em Ciência Animal da Unoeste, que torceram por mim e que de alguma forma contribuíram para o término dele.

À Me. Gabriela Haro de Melo, ao Professor Me. Paulo Felipe Izique Goiozo, por me ajudarem cedendo vossos tempos me proporcionando conhecimento nesse trabalho, sem vocês não seria possível.

À todos os Docentes do Mestrado em Ciência animal, que incentivaram para a conclusão do meu trabalho da melhor forma, me ensinando os caminhos do conhecimento.

Ao Professor Doutor e Coordenador do curso de Ciências Biológicas Silvério Takao Hosomi, por me incentivar na pós-graduação.

À UNOESTE por mais uma vez abrir as portas da casa, e por toda equipe que nela trabalha fazendo com que tudo aconteça.

À minha orientadora Professora. Dr<sup>a</sup> Rosa Maria Barilli Nogueira, que muitas vezes dedicou seu tempo livre para que eu pudesse concluir esse trabalho com eficiência. Pela ótima orientadora que és, por passar o conhecimento, o caminho e a verdade, dentro da ciência. Serei eternamente grata por tudo e pela oportunidade que me proporcionou.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*  
*(Marthin Luther King)*

## RESUMO

### **Dimensão fractal em achados histológicos de fígado de ratos *Wistar* intoxicados experimentalmente com veneno de *Crotalus durissus terrificus***

Os acidentes causados pelo veneno das serpentes do gênero *Crotalus*, conhecidas popularmente no Brasil como cascavel, causam o maior índice de óbitos em seres humanos e animais, principalmente pelo grande potencial neurotóxico, miotóxico, coagulante, nefrotóxico e hepatotóxico do seu veneno. O presente estudo teve por objetivo analisar pela a dimensão fractal e achados histológicos em amostras de fígado de ratos *Wistar* intoxicados experimentalmente com veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. A hipótese é que o veneno da *Crotalus durissus terrificus* seja capaz de induzir lesão hepática na dose preconizada neste estudo, que suas alterações possam ser quantificadas pela dimensão fractal e que o soro antiofídico seja capaz de minimizar as lesões hepáticas induzidas pelo veneno. Noventa ratos, foram distribuídos em diferentes grupos e tratados com: grupo controle (GC, n=30) solução de cloreto de sódio 0,9%; grupo veneno (GV, n=30) veneno crotálico; grupo veneno/soro antiofídico (GVS, n=30) veneno crotálico e soro antiofídico 6 horas após aplicação do veneno. As amostras do fígado foram realizadas nos momentos 2h (M1), 8h (M2) e 24h (M3) após administração do veneno e submetidas a análise histológica e dimensão fractal (DF) utilizou o software ImageJ® e método de *box-counting*. Os procedimentos para coletar, processar e analisar as amostras foram padronizados. Não foram observadas lesões significativas no GC e no GV foram evidenciadas necrose, vacuolização citoplasmática e nuclear e ausência de infiltrado inflamatório nos M2 e M3, enquanto que no GVS evidenciou-se infiltrado inflamatório mononuclear em todos os momentos, além das lesões constatadas no GV. As lesões de necrose, vacuolização citoplasmática e nuclear, consideradas de maior severidade foram visualizadas no M3 tanto no GV quanto no GVS. Observou-se uma elevação da DF para as mesmas alterações nos GV e GVS ao longo do tempo, porém sem diferença entre eles, mas com diferença significativa comparado ao GC. As lesões evidenciadas em fígado não foram minimizadas pela aplicação do soro antiofídico. Este estudo concorda com outros autores quanto a hepatotoxicidade do veneno crotálico frente aos achados histológicos e os resultados apontam aumento da DF para os achados de vacuolização e necrose, mostrando ser um método eficaz na avaliação quantitativa de alterações morfológicas induzidas pelo veneno, sem a interferência do observador. Além disso, a não proteção do fígado pelo soro antiofídico foi evidente. Conclui-se que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* apresenta efeitos hepatotóxicos; a DF é eficaz na avaliação morfológica quantitativa do fígado para vacuolização e necrose, e o soro antiofídico não protegeu o fígado de lesões induzidas pelo veneno.

**Palavras-chave:** *Crotalus durissus*, dimensão fractal, histologia, hepatotoxicidade.



## ABSTRACT

### Fractal dimension in liver histological findings of Wistar rats experimentally poisoned with *Crotalus durissus terrificus* venom

Accidents caused by venom of *Crotalus* snakes, popularly known in Brazil as rattlesnake, cause the highest number of deaths in humans and animals, mainly due to the great neurotoxic, myotoxic, coagulant, nephrotoxic and hepatotoxic potential of their venom. The present study had the objective of analyzing by histology and fractal dimension liver samples of Wistar rats experimentally poisoned with venom of the snake *Crotalus durissus terrificus*. The hypothesis is that the venom of *Crotalus durissus terrificus* is capable of inducing hepatic damage at the dose recommended in this study, that its alterations can be quantified by the fractal dimension and that the antiofidic serum be able to minimize the hepatic lesions induced by the venom. Ninety rats were divided into different groups and treated with: control group (GC, n = 30) 0.9% sodium chloride solution; venom group (GV, n = 30) crotalic venom; (GVS, n = 30) Crotalic venom and antiofidic serum 6 hours after the application of the venom. Liver samples were collected at 2h (M1), 8h (M2) and 24h (M3) after venom administration and submitted to histological analysis and fractal dimension (DF) using the ImageJ® software and box-counting method. Procedures for collecting, processing and analyzing samples were standardized. No significant lesions were observed in GC and GV. Necrosis, cytoplasmic and nuclear vacuolization and absence of inflammatory infiltrate were observed in M2 and M3, whereas in GVS, mononuclear inflammatory infiltrate was evident at all times, in addition to the lesions found in GV. The lesions of necrosis, cytoplasmic and nuclear vacuolization, considered of greater severity were visualized in M3 in both GV and GVS. There was an increase in DF for the same changes in GV and GVS over time, but with no difference between them, but with a significant difference compared to CG. The lesions evidenced in the liver were not minimized by the application of the antiofidic serum. This study agrees with other authors about the hepatotoxicity of crotalic venom in relation to histological findings and the results indicate an increase in FD for the findings of vacuolization and necrosis, proving to be an efficient method for the quantitative evaluation of morphological changes induced by venom without observer interference. In addition, non-protection of the liver by antiofidic serum was evident. It is concluded that *Crotalus durissus terrificus* venom has hepatotoxic effects; FD is effective in the quantitative morphological evaluation of the liver for vacuolization and necrosis, and antiofidic serum did not protect the liver from venom-induced lesions.

**Keywords:** *Crotalus durissus*, fractal dimension, histology, hepatotoxicity.

## LISTA DE SIGLAS

ANOVA - Análise de variância

DF - Dimensão fractal

HE - Hematoxilina e eosina

LAAO - L-aminoácido-oxidase

mg/kg - miligrama por quilo

PLA2 - Fosfolipases A2

$\mu\text{m}$  - micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>10</b>
	<b>ANEXO 1 - APROVAÇÃO ÉTICA.....</b>	<b>30</b>
	<b>ANEXO 2 - NORMAS REVISTA ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE.....</b>	<b>31</b>

1 **1 ARTIGO CIENTÍFICO**2 **Acta Scientiae Veterinariae**3 **RESEARCH ARTICLE**4 **Dimensão Fractal em Achados Histológicos de Fígado de Ratos *Wistar* Intoxicados**5 **Experimentalmente com Veneno de *Crotalus durissus terrificus*.**6 Isabella Keyko Navarro Saneshigue dos Santos<sup>1</sup>, Paulo Felipe Izique Goiozo<sup>2</sup>, Adriana Falco  
7 de Brito<sup>2</sup>, Gabriela Haro de Melo<sup>1</sup>, Cristiane de Pauli Pereira<sup>1</sup>, Rosa Maria Barilli Nogueira<sup>3</sup>.

8

9

10

11

12

13

14

15

16 <sup>1</sup>Discente do Programa de Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista  
17 (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil. <sup>2</sup>Discentes do Programa de Doutorado em  
18 Fisiopatologia Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente,  
19 SP, Brazil. <sup>3</sup>Docente do programa de Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste  
20 Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

21

22

23

24

25

## RESUMO

26  
27 **Introdução:** Os acidentes causados pelo veneno das serpentes do gênero *Crotalus*,  
28 conhecidas popularmente no Brasil como cascavel, causam o maior índice de óbitos em seres  
29 humanos e animais, principalmente pelo grande potencial neurotóxico, miotóxico, coagulante,  
30 nefrotóxico e hepatotóxico do seu veneno. O presente estudo teve por objetivo analisar pela  
31 histologia e dimensão fractal, amostras de fígado de ratos *Wistar* intoxicados  
32 experimentalmente com veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. Assim a hipótese é  
33 que a hepatotoxicidade causada pelo veneno possa ser quantificada pela dimensão fractal e que  
34 o soro antiofídico seja capaz de minimizar as lesões hepáticas induzidas pelo veneno.

35 **Materiais, Métodos e Resultados:** Noventa ratos, foram distribuídos em diferentes grupos e  
36 tratados com: grupo controle (GC, n=30) solução de cloreto de sódio 0,9%; grupo veneno  
37 (GV, n=30) veneno crotálico; grupo veneno/soro antiofídico (GVS, n=30) veneno crotálico e  
38 soro antiofídico 6 horas após aplicação do veneno. As amostras do fígado foram realizadas  
39 nos momentos 2h (M1), 8h (M2) e 24h (M3) após administração do veneno e submetidas a  
40 análise histológica e dimensão fractal (DF) utilizado o software ImageJ<sup>®</sup> e método de *box-*  
41 *counting*. Os procedimentos para coletar, processar e analisar as amostras foram  
42 padronizados. Não foram observadas lesões significativas no GC e no GV foram evidenciadas  
43 necrose, vacuolização citoplasmática e nuclear e ausência de infiltrado inflamatório nos M2 e  
44 M3, enquanto que no GVS evidenciou-se infiltrado inflamatório mononuclear em todos os  
45 momentos, além das lesões constatadas no GV. As lesões de necrose, vacuolização  
46 citoplasmática e nuclear, consideradas de maior severidade foram visualizadas no M3 tanto no  
47 GV quanto no GVS. Observou-se uma elevação da DF para as mesmas alterações nos GV e  
48 GVS ao longo do tempo, porém sem diferença entre eles, mas com diferença significativa  
49 comparado ao GC. As lesões evidenciadas em fígado não foram minimizadas pela aplicação  
50 do soro antiofídico. **Discussão:** Este estudo concorda com outros autores quanto a

51 hepatotoxicidade do veneno crotálico frente aos achados histológicos e os resultados apontam  
52 aumento da DF para os achados de vacuolização e necrose, mostrando ser um método eficaz  
53 na avaliação quantitativa de alterações morfológicas induzidas pelo veneno, sem a  
54 interferência do observador. Além disso, a não proteção do fígado pelo soro antiofídico foi  
55 evidente. Conclui-se que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* apresenta efeitos  
56 hepatotóxicos; a DF é eficaz na avaliação morfológica quantitativa do fígado para  
57 vacuolização e necrose, e o soro antiofídico não protegeu o fígado de lesões induzidas pelo  
58 veneno.

59 **Palavras-chave:** *Crotalus durissus*, dimensão fractal, histologia, hepatotoxicidade.

**ABSTRACT**

60  
61 **Introduction:** Accidents caused by venom of *Crotalus* snakes, popularly known in Brazil as  
62 rattlesnake, cause the highest number of deaths in humans and animals, mainly due to the  
63 great neurotoxic, myotoxic, coagulant, nephrotoxic and hepatotoxic potential of their venom.  
64 The present study had the objective of analyzing by histology and fractal dimension liver  
65 samples of Wistar rats experimentally poisoned with venom of the snake *Crotalus durissus*  
66 *terrificus*. The hypothesis is that the venom of *Crotalus durissus terrificus* is capable of  
67 inducing hepatic damage at the dose recommended in this study, that its alterations can be  
68 quantified by the fractal dimension and that the antiofidic serum be able to minimize the  
69 hepatic lesions induced by the venom. **Materials, Methods and Results:** Ninety rats were  
70 divided into different groups and treated with: control group (GC, n = 30) 0.9% sodium  
71 chloride solution; venom group (GV, n = 30) crotalic venom; (GVS, n = 30) Crotalic venom  
72 and antiofidic serum 6 hours after the application of the venom. Liver samples were collected  
73 at 2h (M1), 8h (M2) and 24h (M3) after venom administration and submitted to histological  
74 analysis and fractal dimension (DF) using the ImageJ® software and box-counting method.  
75 Procedures for collecting, processing and analyzing samples were standardized. No  
76 significant lesions were observed in GC and GV. Necrosis, cytoplasmic and nuclear  
77 vacuolization and absence of inflammatory infiltrate were observed in M2 and M3, whereas  
78 in GVS, mononuclear inflammatory infiltrate was evident at all times, in addition to the  
79 lesions found in GV. The lesions of necrosis, cytoplasmic and nuclear vacuolization,  
80 considered of greater severity were visualized in M3 in both GV and GVS. There was an  
81 increase in DF for the same changes in GV and GVS over time, but with no difference  
82 between them, but with a significant difference compared to CG. The lesions evidenced in the  
83 liver were not minimized by the application of the antiofidic serum. **Discussion:** This study  
84 agrees with other authors about the hepatotoxicity of crotalic venom in relation to histological

85 findings and the results indicate an increase in FD for the findings of vacuolization and  
86 necrosis, proving to be an efficient method for the quantitative evaluation of morphological  
87 changes induced by venom without observer interference. In addition, non-protection of the  
88 liver by antiofidic serum was evident. It is concluded that *Crotalus durissus terrificus* venom  
89 has hepatotoxic effects; FD is effective in the quantitative morphological evaluation of the  
90 liver for vacuolization and necrosis, and antiofidic serum did not protect the liver from  
91 venom-induced lesions.

92 **Keywords:** *Crotalus durissus*, fractal dimension, histology, hepatotoxicity.

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114



## INTRODUÇÃO

115  
116 As serpentes do gênero *Crotalus durissus*, popularmente conhecidas como cascavel,  
117 causam o maior índice de óbito em seres humanos e animais. São animais pecilotérmicos,  
118 pouco ágeis e não agressivos, possuem chocalho ou “guizo” característico no final da cauda,  
119 fosseta loreal, dentição solenóglifa, língua bífida e reprodução vivípara. Alimentam-se  
120 principalmente de roedores, aves e pequenos répteis [4]. Habitam regiões do Distrito Federal,  
121 São Paulo, Mato Grosso, Goiás e Região Sul, principalmente áreas secas, arenosas e  
122 raramente regiões litorâneas, [6,32,23].

123 O veneno da *Crotalus durissus terrificus* possui composição complexa, sendo  
124 constituído por uma fração orgânica que corresponde a 90% do peso seco, onde se encontra  
125 proteínas, enzimas hidrolíticas (fosfolipase A2, fosfodiesterases e fosfomonoesterases),  
126 enzimas não hidrolíticas (L-aminoácido-oxidase - LAAO), enzimas proteolíticas  
127 (endopeptidases, exopeptidases, collagenases, elastases, arginina éster-hidrolases,  
128 hialuronidases e NAD-nucleosidades), crotalfina, onde juntas formam as toxinas convulxina,  
129 giroxina, crotoxina e crotamina, e também polipeptídeos biologicamente ativos. Já a fração  
130 inorgânica que representa aproximadamente 10% do peso seco é formada por sódio, cálcio,  
131 magnésio, ferro, zinco, cobalto e níquel [5,23].

132 A principal toxina encontrada no veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* é a  
133 crotoxina [31]. É formada por duas subunidades, uma composta por um complexo chamado  
134 crotapotina, conhecido como Crotoxina A e outra composta por fosfolipases A2 (PLA2)  
135 chamada Crotoxina B, sendo que juntas conferem alta toxicidade a esta substância [1].

136 A hepatotoxicidade já foi relatada em alguns estudos, no entanto, na maioria das vezes  
137 os achados são de casos atendidos após o acidente, e poucos são de achados histopatológicos  
138 em induções do acidente de forma experimental [2,3,16,13,14].

139 Uma nova ferramenta de auxílio diagnóstico, denominada análise fractal, vem sendo  
140 citada em alguns estudos, como um método de quantificação de alterações em células como,  
141 retina [11], hepatócitos [27], vasculatura renal [17] e pulmonar [34,10], estudos cardíacos [18,  
142 35,12,33,26] e de neoplasias[7].

143 A análise fractal permite uma comparação mais precisa sobre o tamanho das lesões  
144 teciduais encontradas em lâminas histológicas e a técnica de *box-counting* é uma das mais  
145 utilizadas. Além da sua contribuição como ferramenta diagnóstica, possui a vantagem de ter  
146 boa aplicabilidade, ser de baixo custo e ser independente do avaliador [21,19].

147 Nesse contexto, o objetivo do estudo foi analisar pela histologia e dimensão fractal  
148 amostras de fígado de ratos *Wistar* intoxicados experimentalmente com veneno da serpente  
149 *Crotalus durissus terrificus*. Hipotetiza-se que a hepatotoxicidade causada pelo veneno possa  
150 ser quantificada pela dimensão fractal e que o soro antiofídico seja capaz de minimizar as  
151 lesões hepáticas induzidas pelo veneno.

## 152 MATERIAIS E MÉTODOS

### 153 Animais e grupos experimentais

154 Os procedimentos experimentais utilizados ao longo do estudo foram aprovados pela  
155 Comissão de Ética no uso de animais da Universidade de origem, pelo protocolo de número  
156 3847.

157 Noventa animais foram distribuídos em três grupos sendo, grupo controle (GC, n=30),  
158 tratados com solução de cloreto de sódio 0,9%; Grupo veneno (GV, n=30), tratados com  
159 veneno crotálico; Grupo veneno/soro antiofídico (GVS, n=30), tratado com o veneno  
160 crotálico e soro antiofídico.

161 Os animais foram avaliados com 2h, (M1) 8h (M2) e 24horas (M3) após administração  
162 do veneno.

163 O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* foi fornecido pelo Centro de Estudos  
164 de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP)<sup>1</sup> da Universidade Estadual Paulista (UNESP) –  
165 Campus Botucatu. A inoculação do veneno foi realizada no terço médio da face lateral da  
166 coxa esquerda do rato, via intramuscular (IM), na dose de 1mg/kg. O soro antiofídico  
167 botrópico crotálico (Laboratório Vencofarma<sup>®</sup>)<sup>2</sup> foi administrado pela via intraperitoneal, seis  
168 horas após a administração do veneno, na dose preconizada pelo fabricante para neutralizar a  
169 quantidade de veneno inoculado. A solução de cloreto de sódio 0,9% foi administrada no  
170 grupo controle no terço médio da face lateral da coxa esquerda, via intramuscular.

### 171 **Colheita das amostras e análise histológica**

172 Nos diferentes momentos de avaliação, 10 animais de cada grupo foram sacrificados  
173 com tiopental sódico na dose 150mg/Kg Motta et al.,[22]. As amostras de fígado foram  
174 coletadas e acondicionadas em formol tamponado a 10%, emblocadas em parafina, cortados  
175 em micrótomo com 4µm de espessura, distendidas em lâminas de vidro com extremidade  
176 fosca e, posteriormente, coradas com hematoxilina e eosina (HE).

177 O método de análise de classificação das lesões e escores foi feito a partir de Gerez et  
178 al.,[15], modificado. Conforme apresentado na Tabela 1, as observações microscópicas do  
179 fígado levaram à identificação de diferentes lesões e severidade permitindo estabelecer uma  
180 pontuação de lesão por animal. O escore mínimo foi 0 e o escore lesional máximo foi de 36.

### 181 **Dimensão fractal**

182 Os diferentes cortes teciduais do fígado de ratos Wistar foram fotografados utilizando  
183 do microscópio LEICA (modeloDM750, Alemanha) acoplado à câmera de vídeo, que envia  
184 imagens digitais a um computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus  
185 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Todas as imagens microscópicas  
186 digitalizadas foram capturadas na resolução 800x600 (aumento de 400x). Para fazer a análise  
187 da dimensão fractal (DF) as imagens coradas em HE (Figura 1A) passaram pelo processo de

188 binarização, tornando-as preto e branco (Figura 1B), com o resultado em gráfico,  
189 demonstrando a inclinação da linha de regressão com os valores dos dois logs (Figura 1C). Os  
190 procedimentos foram realizados no software ImageJ<sup>®</sup>, do Instituto Nacional de Saúde dos  
191 Estados Unidos (NIH), disponível gratuitamente na internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). O  
192 método *box-counting* considera duas dimensões, permitindo a quantificação da distribuição de  
193 pixels nesse espaço, não considerando a textura da imagem [21]. Isso influencia para que duas  
194 imagens com a mesma distribuição dos pixels, uma binarizada e outra em níveis de cinza,  
195 possuirão a mesma DF, então a DF calculada com o ImageJ<sup>®</sup> ficará sempre entre 0 e 2, não  
196 distinguindo texturas diferentes [24].

### 197 **Análise estatística**

198       Para as análises estatísticas, após verificada a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk  
199 e a homogeneidade pelo teste de Bartlett, os dados foram submetidos à análise de variância  
200 (ANOVA) com contraste de teste de Duncan com o nível de significância de 5%.

201

202

## **RESULTADOS**

203       Na análise histológica, não foram evidenciadas lesões significativas no GC, no  
204 entanto, em todos os animais do GV e GVS lesões evidentes e severas foram observadas e  
205 diferiram ( $P < 0,05$ ) do GC. Necrose, vacuolizações citoplasmática e nuclear, discreto  
206 desarranjo de cordão de hepatócitos e ausência de infiltrado inflamatório foram constatados  
207 nos M2 (Figura 2) e M3 para os animais do GV.

208       Para os animais do GVS, o infiltrado inflamatório mononuclear foi bem evidente em  
209 todos os momentos, além da necrose, vacuolização citoplasmática e nuclear e desarranjo de  
210 cordão de hepatócitos serem acentuados no M3 (Figura 3).

211 A severidade das lesões foi proporcionalmente crescente à medida em que houve  
212 aumento do tempo de avaliação, sendo significativa ( $P < 0,05$ ) na comparação entre GV e GVS  
213 nos M1 e M2 (Tabela 2).

214 As lesões de maior severidade ou intensidade foram visualizadas nos GV e GVS no  
215 M3, no entanto, não ocorreu diferença estatística significativa ( $P > 0,05$ ) entre eles neste  
216 momento (Tabela 2).

217 Maiores valores da dimensão fractal para necrose e vacuolização citoplasmática foram  
218 observados nos animais do GVS, nos M2, seguido do M3 e M1, enquanto no GV os maiores  
219 valores foram observados no M3, M2 e M1 respectivamente. Diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ )  
220 foram observadas nos animais do GV e GVS no M2 e M3 comparado ao GC nos M1 e M3  
221 (Figura 4).

## 222 **DISCUSSÃO**

223 De acordo com os resultados obtidos nas lesões histológicas e frente ao aumento dos  
224 valores da DF, foi possível observar a gravidade da ação do veneno crotálico no fígado dos  
225 animais intoxicados, concordando com outros autores que relatam um grau de  
226 comprometimento hepático moderado a severo, e lesões semelhantes em diferentes espécies  
227 animais [2,3,30,13,36].

228 Segundo MacLachlan & Cullen [20] lesão hepática induzida por toxinas pode variar  
229 com o tipo, dose e a duração da exposição à toxina. Nas reações do hepatócito à agressão  
230 tóxica pode ser observado tumefação celular, esteatose, acompanhada ou não de colestase, e  
231 em casos mais graves pode progredir para necrose e insuficiência hepática. Desta forma,  
232 podemos afirmar que a dose de 1mg/Kg de veneno crotálico utilizado neste estudo, induziu  
233 lesões após 2 horas da aplicação do veneno e progrediu ao longo do tempo para lesões mais  
234 graves e severas como vacuolização citoplasmática necrose e apoptose.

235 Um estudo realizado por Da Silva [9] mostra que o veneno bruto da serpente *Crotalus*  
236 *durissus terrificus* exerce efeitos significativos no fígado, que estão relacionados não somente  
237 ao metabolismo, mas ao estresse oxidativo e às funções mitocondriais.

238 Os achados do presente estudo corroboram os achados de Pereira [28], onde lesões  
239 graves como necrose se instalam duas horas após aplicação do veneno e se intensificam ao  
240 longo do tempo de avaliação. Além disso, o autor descreve que o soro antiofídico testado  
241 isoladamente pode contribuir para lesão hepática.

242 Neste estudo a dimensão fractal foi aplicada pela primeira vez na análise de lesões  
243 induzidas por veneno ofídico, não tendo sido encontrado na literatura nenhum estudo  
244 semelhante. Sua aplicação foi realizada na lesão de maior ocorrência e gravidade, ou seja,  
245 vacuolização e necrose.

246 Nos estudos atuais, sobre a ação do veneno de ofídios em diversos tecidos e órgãos a  
247 análise histológica é realizada de forma qualitativa por meio de características do tecido,  
248 morfologia das células, tamanho, posição de núcleo, presença ou não de infiltrado  
249 inflamatório, e outros achados [30,28,29]. Porém é sabido que esse tipo de análise é  
250 dependente do analisador, o que leva a variações intra e interobservador [21]. Diferente desse  
251 método, a análise por meio da dimensão fractal, além de quantificar as alterações histológicas,  
252 é independente do avaliador, por tratar-se de uma análise automática feita por um *software*  
253 [25].

254 Na dimensão fractal quando submetemos lâminas coradas com HE ao processo de  
255 binarização, os núcleos são destacados do restante das células, sendo é possível mensurar o  
256 tamanho do infiltrado ou outros achados pela análise da sua dimensão fractal [25].

257 Os achados deste estudo, mostram que a DF é uma ferramenta que pode ser utilizada  
258 como meio de análise quantitativa de uma determinada lesão, o que agrega ao estudo uma  
259 forma de avaliação independente do avaliador. Apesar de não ter ocorrido muitas diferenças

260 estatísticas significativas na comparação entre os grupos, a análise da dimensão fractal  
261 demonstrou que os animais intoxicados pelo veneno e até mesmo os submetidos a tratamento  
262 com soro antiofídico, apresentaram aumento da dimensão fractal em comparação aos animais  
263 do GC, sugerindo que estes possuem maior dimensão fractal. Estruturas irregulares, quando  
264 analisadas pela DF, são quantificadas com relação a sua complexidade, de forma que, maiores  
265 valores de DF se relacionam com imagens mais complexas [8,21]. Mesmo tendo sido  
266 eficiente a avaliação das lesões pela histologia e por meio da DF, outros estudos devem ser  
267 realizados na mesma ou em diferente espécie animal para maior compreensão dos danos  
268 hepáticos causados pelo veneno crotálico, assim como a avaliação dos efeitos do soro  
269 antiofídico, indispensável aos pacientes acidentados.

## 270 CONCLUSÃO

271 Conclui-se que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* causa efeitos hepatotóxicos  
272 segundo a dose utilizada; a DF é eficiente na análise morfológica do fígado e o antiveneno  
273 não protegeu o fígado de lesões causadas pelo veneno.

### 274 ***Fabricantes:***

275 <sup>1</sup> CEVAP-UNESP. Botucatu, SP, Brasil.

276 <sup>2</sup> Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda. Londrina, PR, Brasil.

277 ***Aprovação ética:*** estudo aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais, protocolo n<sup>o</sup>  
278 3847, da Universidade do Oeste Paulista, Unoeste, Presidente Prudente-SP, Brasil.

279 ***Declaração de conflito de interesse:*** os autores declaram não haver conflito de interesse. Os  
280 autores sozinhos são responsáveis pelo conteúdo e escrita do artigo.

281

282

283

284

285

## REFERENCES

286

1. **Bancher W., Rosa R.R. & Furlaneto R.S. 1973.** Estudos sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno de *Crotalus Durissus Terrificus* nos tecidos nervosos, renal, hepático e muscular de *Mus musculus* Linnaeus, 1758. *Memórias do Instituto Butantan*. 37: 139-148.

287

288

289

290

2. **Barraviera B., Júnior B.J.C., Akaki D., Domingues M.A.C., Pereira P.C.M., Mendes R.P., Machado J.M. & Meira D.A. 1989.** A retrospective study of 40 victims of *Crotalus* snake bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 22(1): 5-12.

291

292

293

294

3. **Barraviera B., Coelho K.Y.R., Curi P.R. & Meira D.A. 1995.** Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes in Botucatu (state of São Paulo, Brazil). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 37(1): 63-69.

295

296

297

298

4. **Blanco B. S. & Melo M. M. 2014.** Acidente Crotálico. In: *Cadernos Técnicos de Medicina Veterinária e Zootecnia - Animais Peçonhentos*, Belo Horizonte: Centro de Extensão da Escola de Veterinária da UFMG, pp. 27-35.

299

300

301

5. **Beghini D.G. 2001.** Isolamento e purificação de uma neurotoxina crotoxina do veneno de *Crotalus durissus cascavella*: caracterização bioquímica e biológica. Campinas, SP. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade de Campinas-UNICAMP, Campinas.

302

303

304

305

6. **BRASIL. 2001.** Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília, Fundação Nacional de Saúde, 120p.

306

307

7. **Chan A. & Tuszynsky J.A. 2016.** Automatic prediction of tumour malignancy in breast cancer with fractal dimension. *Royal Society Open Science*. 3(12):1-10.

308

309

8. **Cross, S.S. 1997.** Fractals in Pathology. *Journal of pathology*, 182: 1-8.



- 310 9. **Da Silva J. G. 2009.** Estudo dos efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus*  
311 sobre o metabolismo e estresse oxidativo em fígado de ratos. 52f. Curitiba, PR.  
312 Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-graduação em  
313 Farmacologia, Universidade Federal do Paraná.
- 314 10. **Dioguardi N., Grizzi F., Franceschini B., Bossi P. & Russo C. 2006.** Liver fibroses  
315 and tissue architectural change measurement using fractal-rectified metrics and Hurst's  
316 exponent. *World Journal of Gastroenterol.*12(14): 2187-2194.
- 317 11. **Doubal F.N., Macgillivray T.J., Patton N., DhillonB., Dennis M.S. & Wardlaw**  
318 **J.M. 2010.** Fractal analysis of retinal vessels suggests that a distinct vasculopathy  
319 causes lacunar stroke. *Neurology.*74: 1102–1107.
- 320 12. **Fabrizii M., Moinfar F., Jelinek H.F., Karperien A. & Ahammer H. 2014.** Fractal  
321 Analysis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Plos One.* 9(10): 1-9.
- 322 13. **França R.F. 2004.** Estudo histopatológico e bioquímico induzido por veneno de  
323 *Crotalus durissus terrificus* e avaliação hepatoprotetora do diltiazem em fígado de rato  
324 Wistar. 99f. São José dos Campos, SP. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)  
325 - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do  
326 Paraíba.
- 327 14. **França R.F., Vieira R.P., Ferrari E.F., Souza R.A., Osorio R.A.L., Priant-Jr**  
328 **A.C.G., Hyslop S., Zamuner S.R., Cogo J.C. & RibeiroW. 2009.** Acute hepatotoxicity  
329 of *Crotalus durissus terrificus* (south american rattlesnake) venom in rats. *Journal of*  
330 *Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases (Online).* 15(1): 61-78.
- 331 15. **Gerez J.R., Pinton P., Callu P., Grosjean F., Oswald I.P. & Bracarense A.P.F.L.**  
332 **2015.** Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce  
333 systemic histological changes in pigs. *Experimental and Toxicologic*  
334 *Pathology.*67:(2015) 89-98.

- 335 16. **Hernández Cruz A., Garcia-Jimenez S., Mendonça R.Z. & Petricevich V.L. 2008**  
336 Pro-and Anti-Inflammatory Cytokines Release in Mice Injected with *Crotalus durissus*  
337 *terrificus* Venom. *Mediators of Inflammation*. 1: 1-10.
- 338 17. **Karslioglu Y., Gunal A., Kurt B., Onguru O. & Ozcan A. 2009.** Fractal dimension  
339 of microvasculature in renal oncocytomas and chromophobe renal cell carcinomas.  
340 *Pathology, research and practice*. 205(10): 677-81.
- 341 18. **Keipes M., Ries F. & Dicato M. 1993.** Of the British coastline and the interest of  
342 fractals in medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 47(9): 409-15.
- 343 19. **Lee L.H., Tambasco M., Otsuka S., Wright A., Klimowics A., Petrillo S., Morris**  
344 **D., Magliocco A. & Bebb D.G. 2014.** Digital differentiation of non-small cell  
345 carcinomas of the lung by the fractal dimension of their epithelial architecture. *Micron*  
346 (Oxford, England : 1993).67: 125–31.
- 347 20. **MacLachlan N. J. & Cullen, J.M. 1998.** Fígado, Sistema Biliar e Pâncreas exócrino.  
348 In: Carlton, W.W., McGavin, M.D. *Patologia Veterinária Especial*. 2.edição. Artmed,  
349 São Paulo, pp.95-131.
- 350 21. **Moreira R.D., Moriel A.R., Murtajunior L.O., Neves L.A. & Godoy M.F. 2011.**  
351 Dimensão Fractal na quantificação do grau de rejeição celular miocárdica pós-  
352 transplante cardíaco. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 26(2): 155–63.
- 353 22. **Motta Y.P, Nogueira R.M.B., Floriano R.S., Laposy C.B., Camplesi A.C., Correal**  
354 **M.L. & Sakate M. 2017.** Effects of *Mikania glomerata* Leaf Extraction Experimental  
355 Bothropoides jararaca envenomation in Wistar rats. *Acta Scientiae Veterinaria*. 45:  
356 1464.
- 357 23. **Nogueira R.M.B. 2011.** Intoxicação por animais peçonhentos. In: Nogueira, R.M.B.  
358 & Andrade, S.F. (Ed). *Manual de Toxicologia Veterinária*. 1. ed. São Paulo: Roca, pp.  
359 295-313.

- 360 24. **Oliveira M.A.B., Brandi A.C., Santos C.A., Botelho P.H.H., Cortez J.L.L., Godoy**  
361 **M.F. & Braile D.M. 2014.** Comparison of fractal dimension and Shannon entropy in  
362 myocytes from rats treated with histidine-tryptophan-glutamate and histidine-  
363 tryptophan cetoglutamate. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 29(2): 156-  
364 62.
- 365 25. **Ozaki G.A.T., Camargo R.C.T., Koike T.E., Garcia T.A., Castoldi R.C &**  
366 **CamargoFilho J.C.S. 2015.** Fractal Analysis of Skeletal Muscle Tissue of Rats  
367 Subjected to Stretch Injury Análisis Fractal de Tejido Muscular Esquelético en Ratas  
368 Sometidas a Lesión por Estiramiento. *International Journal of Morphology*. 33: 908–  
369 913.
- 370 26. **Pacagnelli F.L., Sabela A.K.D.A., Mariano T.B., Ozaki G.A.T., Castoldi R.C.,**  
371 **Carmo E.M. Carvalho R.F., Tomasi L.C., Okashi K. &Vanderlei L.C.M. 2016.**  
372 Dimensão Fractal na quantificação da disfunção cardíaca induzida por hipertensão  
373 pulmonar experimental em ratos. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 107(1): 33-39.
- 374 27. **Pantic I., Petrovic D., Paunovic J., Vucevic D., Radosavljevc T. & Pantic S. 2016.**  
375 Age-related reduction of chromatin fractal dimension in toluidine blue -stained  
376 hepatocytes. *Mechanisms of Ageing and Development*.157: 30-4
- 377 28. **Pereira C.P. 2012.** Avaliação clínica e da hepatotoxicidade do veneno de *Crotalus*  
378 *durissus terrificus* e do soro antiofídico em ratos Wistar. 43f. Presidente Prudente – SP.  
379 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-graduação em Ciência  
380 Animal. Universidade do Oeste Paulista.
- 381 29. **Sakate M., Nogueira R.M.B. & Motta Y.P. 2015.** Acidentes por animais peçonhentos  
382 e venenosos. In: Jericó, M.M., Neto, J.P.A., Kogika, M.M. (Ed). *Tratado de Medicina*  
383 *Interna de Cães e gatos*. 1.ed. Rio de Janeiro: Roca, pp.664-677.

- 384 30. **Sangiorgio F., Sakate M., Nogueira R.M.B. & Tostes R.A. 2008.** Histopathological  
385 evaluation in experimental envenomation of dogs with *Crotalus durissus terrificus*  
386 venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 14(1):  
387 83-87.
- 388 31. **Santoro M.L., Sousa-e-Silva M.C., Gonçalves L.R., Almeida-Santos S.M., Cardoso**  
389 **D.F., Laporta-Ferreira I.L., Saiki M., Peres C.A. & Sano-Martins I.S. 1999.**  
390 Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South  
391 American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C.*  
392 *durissus collilineatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 122(1): 61-73
- 393 32. **Sawaya R.J., Marques O.A.V. & Martins M. 2008.** Composição e História Natural  
394 das Serpentes de Cerrado de Itirapina, São Paulo, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropical*.  
395 8(2): 127-149.
- 396 33. **Šoštarić-Zuckermann I.C., Severin K., Huzak M., Hohsteter M., Kurilj A.G.,**  
397 **Artukovic B., Dzaja A. & Grabarevic Z. 2016.** Quantification of morphology of  
398 canine circumanal gland tumors: a fractal based study. *European Journal of*  
399 *Histochemistry*. 60(26) 91- 98.
- 400 34. **Venegas J.G. & Galletti G.G. 2000.** Low-pass filtering, a new method of fractal  
401 analysis: application to PET images of pulmonary blood flow. *Journal of Applied*  
402 *Physiology*. 88: 1365-1373.
- 403 35. **Wielgus E., Pawlicki K., Kawa A., Wloch S. & Kamuinski M. 2000.** Fractal analysis  
404 of placenta mature villi in healthy smoking and no smoking women. *Medical Science*  
405 *Monitor*. 6(2): 271-277.
- 406 36. **Yeh M.M. 2011.** Nonalcoholic Fatty Liver Disease, In: Saxena, R., Practical Hepatic  
407 Pathology. *A Diagnostic Approach, Philadelphia: Elsevier*, pp.435-440.  
408

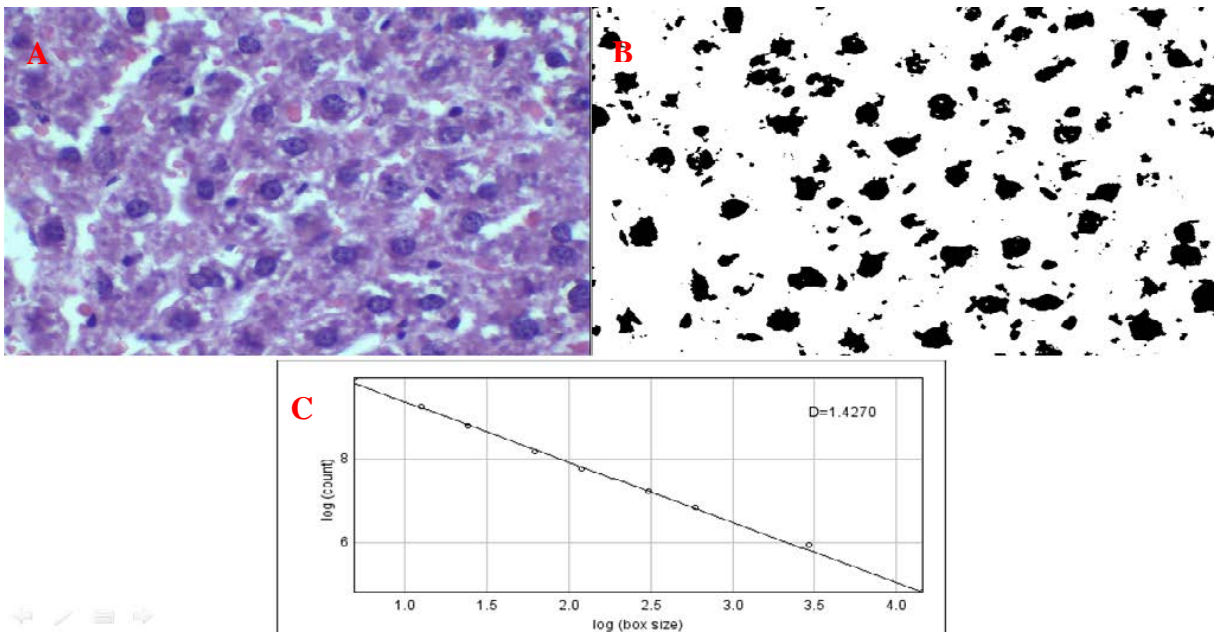
## 409 ANEXOS

410 Tabela 1- Escores das lesões histológicas<sup>a</sup> encontradas no fígado de ratos *Wistar*.

Tecido	Tipos de lesão	Fator de gravidade	Escore máximo
Fígado	Apoptose	6	36
	Inf. inflamatório	6	
	Necrose	9	
	Vacuolização Citoplasmática	6	
	Vacuolização nuclear	3	
	Megalocitose	6	
	Desorganização de Cordão hepatócitos	3	

411 <sup>a</sup>A pontuação para cada lesão foi obtida pela multiplicação do fator de gravidade com a  
 412 extensão da lesão. A pontuação do órgão foi então obtida pela soma de cada pontuação da  
 413 lesão. Fator de gravidade (ou grau de gravidade), 1 = lesões leves, 2 = lesões moderadas, 3 =  
 414 lesões severas.

415 A extensão de cada lesão (intensidade ou frequência observada) foi avaliada e pontuada como  
 416 0 = sem lesão, 1 = baixa extensão, 2 = extensão intermediária, 3 = grande extensão.  
 417



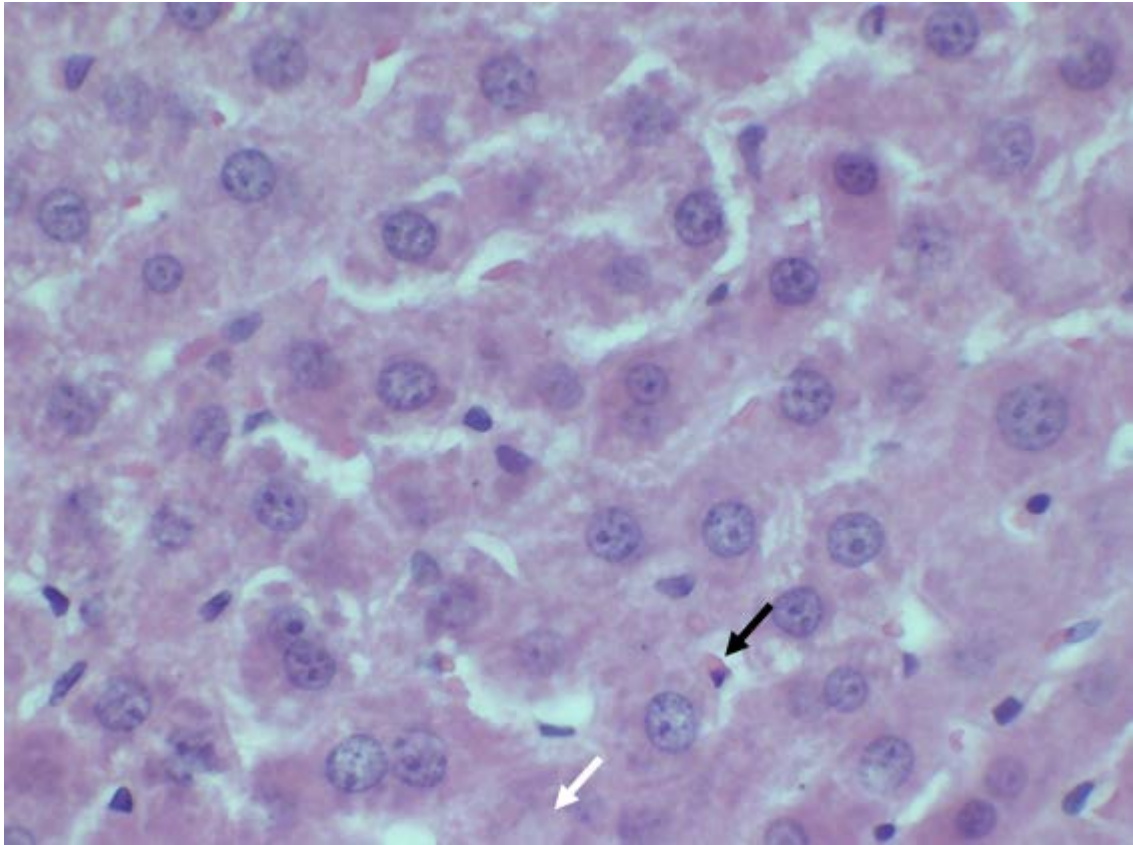
418

419 Figura 1 – A) Corte histológico do fígado corado em Hematoxilina e Eosina (HE), aumento  
 420 de 400x. B) Imagem de HE após a binarização. C) Gráfico de regressão linear, mostrando a  
 421 inclinação da linha de regressão dos valores dos dois log.

422

423

424



425  
426  
427  
428  
429  
430

Figura 2. Fotomicrografia hepática no grupo veneno (GV), 8horas (M2) após aplicação do veneno crotálico: Discreto desarranjo de cordões de hepatócitos, seta preta demonstra corpo apoptótico, seta branca cariólise. Hematoxilina e Eosina – 400x

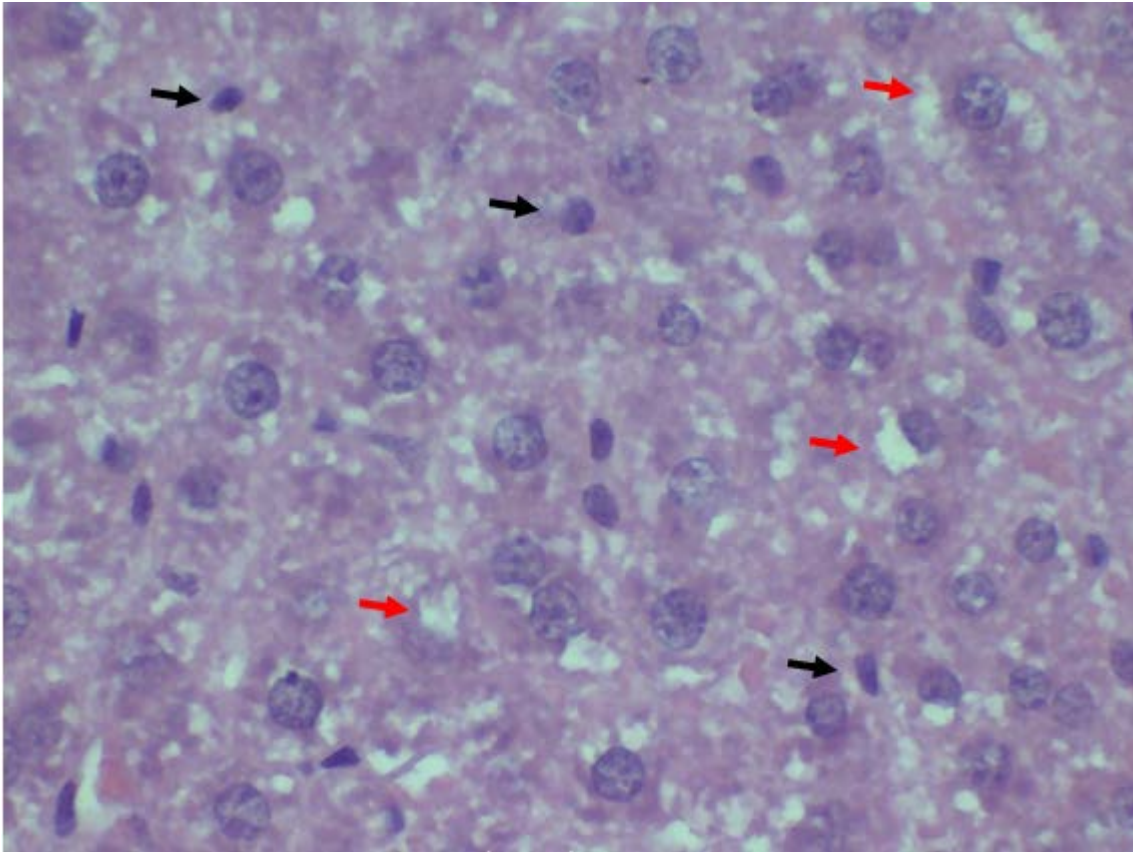
431 Tabela 2. Escore lesional total da histologia de amostras do fígado nos grupos controle (GC),  
432 veneno (GV), veneno/soro (GVS) nos momentos 2h (M1), 8h (M2) e 24h (M3) após  
433 aplicação do veneno.

	M1 (2h)	M2 (8h)	M3 (24h)
<b>Grupo controle</b>	5.60±2.27 <sup>a</sup>	5.60±1.26 <sup>a</sup>	6.22±2.48 <sup>a</sup>
<b>Grupo veneno</b>	10.22±2.63 <sup>b</sup>	12.87±2.03 <sup>c</sup>	17.12±2.64 <sup>ef</sup>
<b>Grupo veneno/soro</b>	16.00±2.44 <sup>de</sup>	14.44±2.06 <sup>cd</sup>	18.30±1.76 <sup>f</sup>

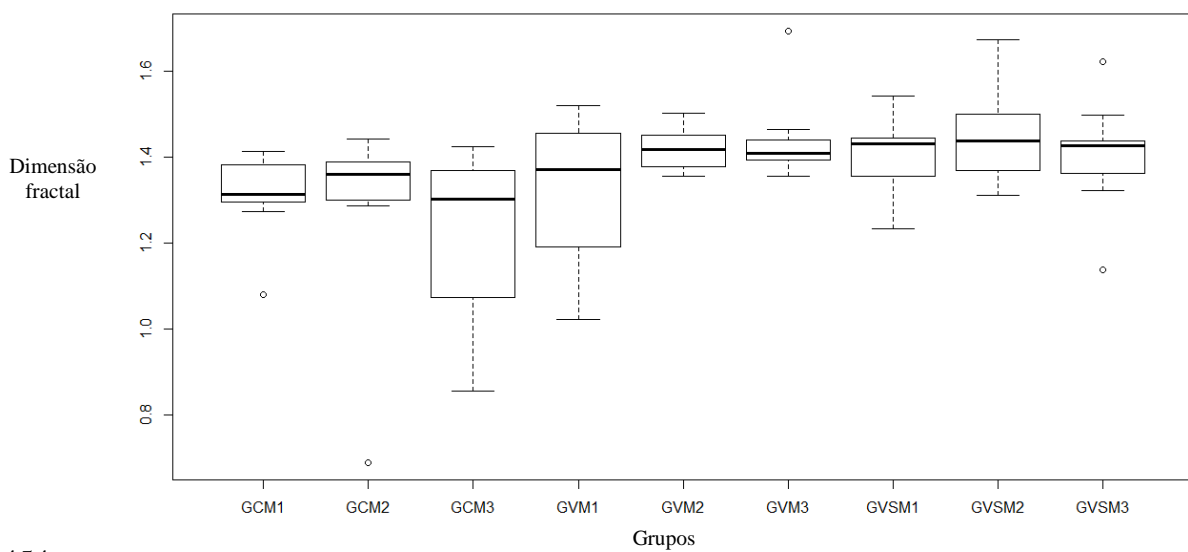
434 Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas entre grupos.

435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446

447



448  
 449 Figura 3. Fotomicrografia hepática no grupo veneno/soro (GVS), 24horas (M3) após  
 450 aplicação do veneno crotálico: Acentuado desarranjo de cordões de hepatócitos, seta preta  
 451 demonstra núcleo picnótico, seta vermelha vacuolização citoplasmática. Hematoxilina e  
 452 Eosina – 400x.  
 453



454  
 455 Figura 4. Análise da dimensão fractal (DF) nos grupos controle (GC), grupo veneno (GV),  
 456 grupos veneno/soro (GVS) nos momentos 2h (M1), 8h (M2) e 24 horas (M3) após aplicação  
 457 do veneno.

## ANEXO 1 – APROVAÇÃO ÉTICA

19/09/2017

Certificado

# UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação  
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

## Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "**DIMENSÃO FRACTAL EM ACHADOS HISTOLÓGICOS DE AMOSTRAS DE FÍGADO DE RATOS WISTAR INTOXICADOS EXPERIMENTALMENTE COM VENENO DE CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS.**", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº **3847** e tendo como participante(s) **ISABELLA KEYKO NAVARRO SANESHIGUE DOS SANTOS (discente), ELAINE CARRION DE FARES (discente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (orientador responsável)**, foi avaliado e **APR. COM RECOMENDAÇÃO** pelo **COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido **APR. COM RECOMENDAÇÃO** em reunião realizada em 20/06/2017.

Vigência do projeto: 05/2017 a 11/2017.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
rato	90	250 gramas	60 dias	M	Biotério Central
rato	90	250 gramas	60 dias	M	Biotério Central

Presidente Prudente, 23 de Junho de 2017.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.  
Coordenador Científico da CPDI

Prof. Ms. Adriana Falco de Brito  
Coordenadora da CEUA -  
UNOESTE



## ANEXO 2 - NORMAS REVISTA ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE

### **I**NSTRUÇÕES AOS AUTORES ASV – 2017

---

**OBJETIVOS:** a revista *Acta Scientiae Veterinariae*, continuação dos Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS [vol.1 (1973) - vol.29 (2001)], destina-se à publicação de trabalhos científicos relativos à Veterinária que abordem aspectos médicos, clínicos, patológicos, epidemiológicos, cirúrgicos, imunológicos, diagnósticos e terapêuticos, além de estudos fundamentais em fisiologia, bioquímica, imunohistoquímica, genética, biologia molecular e celular aplicados aos domínios da Veterinária e da interface com a Saúde Pública.

#### **METODOLOGIA DA AVALIAÇÃO**

A publicação dos manuscritos dependerá da **rigorosa observância das Normas Editoriais**, dos pareceres do Conselho Editorial (C.E.), da Assessoria Científica e/ou de relatores *ad hoc* nacionais ou internacionais. Antes de enviar os trabalhos leia atentamente as “Instruções aos Autores” (abaixo) que apresentam as normas específicas adotadas pela ASV.

Os trabalhos conceitos e opiniões são de inteira responsabilidade dos autores (aa.) devem ser acompanhados por uma carta assinada [via e-mail] por todos os autores e com seus respectivos e-mails. **OBSERVAÇÃO MUITO IMPORTANTE:** Autor/autores ou grupo de pesquisa que publicou/publicaram recentemente na ASV pode/podem enviar outro artigo [o segundo artigo] **SOMENTE** após decorridos três meses da data de publicação do mesmo). A participação dos autores (autoria/co-autoria) em trabalhos publicados na ASV é limitada a somente DUAS por ano (não contabilizando artigos de Revisão ou Case Reports).

**INICIALMENTE os trabalhos serão triados pelo Conselho Editorial. NÃO SERÃO aceitos manuscritos FORA dos padrões específicos da ASV. O ABSTRACT (OBRIGATÓRIO: total mínimo de 3400 caracteres com espaços e máximo de 3900 cce, SEM contar keywords e descritores). É composto de três partes:**

**1. Background (seção curta com no máximo de 700 cce) que sempre terminará com o objetivo do trabalho. 2. Materials, Methods & Results. 3. Discussion. Abstract deve ser preparado por tradutor / serviço reconhecidamente qualificado (anexar o**

comprovante). ASV se reserva o direito de **RECUSAR** texto- inglês considerado tecnicamente inadequado. O texto não aceitável (Abstract ou trabalho integral) passará **OBRIGATORIAMENTE** por revisão do inglês e a ser realizado por serviços especializados (opções **RECOMENDADAS** pela ASV).

### CONSIDERAÇÕES PRÉVIAS

**Autoria:** O reconhecimento da autoria deve estar baseado em contribuição substancial relacionada aos seguintes aspectos: 1) Concepção e projeto ou análise e interpretação dos dados; 2) Redação do artigo ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual e 3) Aprovação final da versão a ser publicada. Os membros da equipe que não se encaixem nestes critérios podem figurar na seção de *Acknowledgements*. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação final de todos os requisitos [conteúdo (texto e ilustrações) e correta formatação] e pagamento da taxa de publicação. A ASV se reserva o direito de **LIMITAR** a participação de um mesmo autor em somente **DOIS** artigos por ano.

#### **Resumo dos Requisitos Técnicos (verificar artigos online):**

- Apresentar o texto em fonte Times, tamanho 12, espaço duplo e margem de 2,5cm. **NUNCA** colocar nota de rodapé em nenhuma página.
- Enumerar em ordem crescente, na margem esquerda, todas as linhas do trabalho.
- **IMPORTANTE:** informar o endereço postal completo do autor principal para “CORRESPONDENCE”. Sempre informar a filiação (nome da Instituição com SIGLA e cidade-estado) dos outros autores (nomes completos). Observar exemplos e a correta sequência das informações pertinentes. Esta informação deve ser colocada abaixo da nominata dos autores. Nunca como nota de rodapé.
- Ilustrações (figuras individuais/e-mail TIFF ou em CDs/DVDs) apresentadas em tamanho maior do que o da montagem final que terá o mínimo de 8 e o máximo de 17 cm de largura. **NUNCA** incluir ilustrações [figuras ou tabelas] dentro do texto Word.
- Incluir permissão (do autor ou da editora) para reproduzir material previamente publicado.
- Anexar também termo de cessão dos direitos autorais (texto simples/não temos modelo).

<p>Para a submissão dos trabalhos ou comunicação com os Editores <b>SOMENTE</b> utilizar o e-mail:  <a href="mailto:actascivet-submission@ufrgs.br">actascivet-submission@ufrgs.br</a></p>
--

**IMPORTANTE:** A taxa de publicação [R\$ 650,00] deverá ser paga (enviar por e-mail) após a

aprovação final do trabalho. A publicação ocorrerá SOMENTE após o pagamento. A taxa única de fotolitagem colorida é de R\$ 150,00].

### MODALIDADES DOS TRABALHOS

**ARTIGO DE REVISÃO:** por convite do C.E. ou por iniciativa do autor. **O autor - ou grupo - deve ser considerado como *expert* no assunto da Revisão (comprovadamente, através de diversas publicações em revistas internacionais autocitadas no texto.** É condição básica que os autores sejam citados na revisão em no mínimo 10 artigos relativos ao assunto abordado [obrigatório que pelo menos 5 deles tenham sido publicados em Revistas com Fator de Impacto igual ou superior a 1.0 e as restantes com F.I. mínimo de .5 ]. **Nos artigos: o F.I deve ser colocado em negrito após o número de pp.** Sem o preenchimento dessas condições básicas o artigo não será analisado. Enviar *previamente* uma proposta com descrição, sequencial e numerada, dos tópicos a serem abordados na revisão baseada em torno de no máximo 120 referências. Apresentar ABSTRACT (limites 3400-3900 cce) composto por: 1. *Introduction* (Máximo 700 cce), 2. *Review* e 3. *Conclusion*. Descritores e Keywords. A revisão terá inicialmente um Sumário (numerado por algarismos romanos) Introdução, diversas seções opcionais; Discussão ou Conclusões. Observar a formatação-padrão disponível online.

**ARTIGO DE PESQUISA:** composto de dados inéditos com apresentação clara da hipótese (delineamento experimental apropriado, quando for o caso). A redação deve ser concisa, mas que permita a reprodução da metodologia descrita, perfeito entendimento da discussão no contexto geral do assunto, *gerando conclusões alicerçadas nos dados obtidos ou observados*, normalmente não deve ultrapassar 15 páginas e uma base de no máximo 60 referências. ABSTRACT (limites: 3400-3900 cce). Texto com Introdução (Máximo de 1700 cce); Materiais e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Manufacturers; Acknowledgements; Funding, Ethical Approval; Declaration of interest e References. **Não citar autores no texto e/ou apresentar referências INCOMPLETAS. Nunca utilizar notas de rodapé.**

### ESTRUTURA BÁSICA DOS TRABALHOS

**1. Página-título:** a) Título não deve exceder 60 palavras. Title: com letras maiúsculas iniciais (ex.: Journal of Clinical Microbiology). b) Nomes dos aa por extenso seguidos de números sobrescritos para identificar suas filiações. Abaixo serão informados os nomes das Instituições (com siglas),

cidade, estado, Brazil. Fornecer e-mail e o endereço postal completo do autor indicado para “correspondence”, incluindo CEP. Na submissão informar DOIS e-mails (autores diferentes) para contato durante avaliação do trabalho. d) Para *trabalhos extraídos de dissertações ou teses* citar na página título os detalhes pertinentes (PPG, cidade, estado, Brazil).

**2. ABSTRACT [3400-3900]:** na **forma direta e no passado** destacando a importância do assunto, o objetivo do trabalho, como foi realizado (M&M), os resultados *alcançados* com dados específicos e seu significado estatístico (se possível) e as *princi- pais conclusões*, isto é, apresenta **todas as seções do artigo sob forma condensada. Texto deve ser preparado por tradutor / serviço reconhecidamente qualificado.**

**3. INTRODUÇÃO:** Deve ser **CURTA, clara e objetiva**, contendo informações que justifiquem a importância do trabalho e re- stringindo as citações ao assunto específico. Sempre finalizar com o (s) objetivo (s) do trabalho. **É obrigatório considerar o limite MÁXIMO de 1700 ccespaços.**

**4. MATERIAIS E MÉTODOS:** Todas as informações necessárias para que *o trabalho possa ser facilmente repetido*, devem ser fornecidas. Métodos e técnicas já bem conhecidos devem ser apenas citados, enquanto novas tecnologias devem ser detalhadas. Quando pertinente, **indicar insumos e aparelhos DIRETOS no texto com números sobrescritos; os fabricantes (nome, cidade e país deverão ser citados em Manufacturers.** Ao utilizar animais nos experimentos observar os princípios éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) ou pelo International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals de acordo com o Council for International Organizations of Medical Sciences [C.I.O.M.S. - W.H.O.]. Apresentar o número do processo aprovado no Comitê de Ética local.

**Estatística:** Sempre que for possível, quantificar e apresentar os resultados com indicadores apropriados como por exem- plo, intervalos de confiança. Evitar apoiar-se unicamente nas hipóteses estatísticas, tais como o uso de valores *P*, uma vez que omite informação quantitativa importante. Justificar a escolha dos indivíduos objeto da pesquisa, detalhar o método, informar sobre as possíveis complicações relacionadas ao tratamento. Indicar também se foram utilizados programas de computador e citá-los.

**5. RESULTADOS [separados da Discussão]:** *informação clara e concisa* somente das *observações relevantes* que, conforme a natureza do trabalho, deverão apresentar a análise estatística. O conteúdo deve ser **informativo** (não interpretativo) e, se necessário, acompanhado por tabelas, figuras ou outras ilustrações auto-explicativas. As legendas das tabelas / figuras devem ser suficientemente detalhadas, para que o leitor não precise retornar ao texto para obter informações complementares necessárias à compreensão das ilustrações. Somente as legendas deverão ser colocadas após as referências. É indicado expressar em gráficos resultados complexos condensados em tabelas com excesso de detalhes supérfluos. Apresentar os *resultados em uma sequência lógica no texto*, tabelas e figuras (o texto e a documentação devem ser complementares). *Não repetir no texto todos os dados das tabelas ou ilustrações.*

**5.1 Tabelas:** numeradas em algarismos arábicos e enviadas em **arquivos-word** separados (não incluir dentro do texto). Todas as tabelas devem ser citadas no texto em ordem numérica e a posição aproximada indicada na margem. Formatadas em espaço duplo e em páginas separadas. As legendas (colocadas após as referências) devem ser **auto-explicativas** com o título descritivo [incluir local e o período quando necessário, além de outros detalhes para que o leitor não precise consultar o texto]. Os sinais de chamada são indicados por letras ou símbolos e ordenados no rodapé da Tabela. Recomenda-se incluir apenas os dados imprescindíveis, para evitar tabelas longas, com dados dispersos e de valor não representativo. Identificar as medidas estatísticas (intervalo de confiança, desvio-padrão, etc.).

**5.2 Figuras:** As imagens devem ser digitalizadas em 300 dpi em CMYK (coloridas) e Gray Scale (tons de cinza), ao serem salvas **deve ser selecionada a extensão TIFF** e **enviadas em CD**. Para a digitalização pode ser usado qualquer programa de imagem, *mas nunca enviar dentro do documento Word*. As fotografias feitas através de microscópio devem conter indicadores internos de escala. Os símbolos, flechas ou letras usados em fotomicrografias devem contrastar claramente com o fundo, com a escala (bar) inserida e a magnitude descrita na legenda. **Para as fotos em câmera digital**, a máquina deve ter **resolução superior a 5 Megapixel** (observar no momento de bater a foto se a câmera está configurada em resolução máxima). **Nunca enviar as imagens com extensão jpg ou gif.**

**5.3 Unidades de Medidas:** Medidas de comprimento, altura, peso e volume devem ser expressas em unidades métricas (metros, gramas ou litros, ou seus múltiplos decimais). As temperaturas devem ser dadas em graus Celsius. A pressão sanguínea em milímetros de mercúrio. Todos os valores

hematológicos ou bioquímicos devem ser apresentados em unidades do sistema métrico decimal de acordo com o Sistema Internacional de Medidas (SI).

**5.4 Abreviações:** devem ser evitadas e, se empregadas [só abreviatura padrão], definidas na primeira menção, salvo se forem unidades comuns de medida. Para nomes latinos binominais, abreviar o gênero após citação inicial, exceto quando iniciar frase.

**6. DISCUSSÃO:** O conteúdo deve ser *interpretativo* e as hipóteses e especulações formuladas embasadas nos dados obtidos pelos aa. e, relacionadas ao conhecimento atual sobre o tema, fornecido por outros estudos. Nesta seção referenciar somente a documentação essencial. Discutir as implicações dos achados e suas limitações mencionando envolvimento com futura pesquisa.

**Observação sobre as citações:** Normalmente citadas no texto **por números separados por vírgula SEM espaços entre colchetes**, correspondendo aos aa. ordenados e numerados por ordem alfabética. Exs.: [2], [7,9,16], [23-27,31,33,45-48]. **Só quando for essencial (fundamental para o assunto) citar o nome dos aa. no texto.** Observe as sugestões: A primeira descrição coube a Autor & Autor [3]...; Autor & Autor [32] iniciaram...; Autor *et al.* [18] em 1958... Os dados não publicados ou comunicações pessoais só devem ser aparecer no texto assim: (A.autor, comunicação pessoal, ano) e (C.D.autor & E.F. autor, dados não publicados); nestes casos informar antes das Referências o endereço completo ou e-mail dos aa.

**7. CONCLUSÃO:** Vincular as mesmas aos objetivos do estudo. Devem estar baseadas exclusivamente nos resultados oriundos do trabalho e em fatos plenamente respaldados pelos mesmos. Os autores devem evitar, em particular, fazer declarações sobre os benefícios econômicos e gastos, a menos que seu manuscrito inclua informações e análises econômicas.

**8. MANUFACTURERS:** usar para referenciar a origem dos produtos comerciais citando firma, cidade e País. Devem ser numeradas (sobrescrito) consecutivamente e apresentadas antes das referências.

**9. Funding:** informar órgão financiador e no. do Projeto. Quando se aplicar

**10. Acknowledgements:** se necessários, devem ser sucintos e dirigidos para significativa assistência técnica, cooperação ou orientação recebida de colegas, etc. Suporte financeiro para bolsas de estudo devem constar no rodapé da página-título. Quando se aplicar.

**11. Ethical Approval: da Instituição [com número do processo]:**

Quando se aplicar

**12. Declaration of interest.**

**13. REFERENCES:** Atenção para todos os detalhes (dois exemplos bem detalhados são apresentados

no final das instruções). Os trabalhos não serão analisados enquanto as mesmas estiverem incompletas ou fora das normas. Relacionar somente em ordem alfabética e numerada, os trabalhos publicados e seguir as especificações da Revista conforme os vários exemplos abaixo. Sequencia: Número / Referenciar sobrenome (letra maiúscula só a inicial) sem vírgulas e iniciais de todos aa. seguidas de ponto e separados por virgula entre cada autor (usar “&” para separar os últimos aa. / Ano da publicação. / Título do artigo. / *Nome completo da revista em itálico* (s/abreviação). / nº do volume (nº fascículo = opcional): pp- pp. REVISAR cada Reference em todos detalhes antes de enviar o tarabalho).  
**Importante: no máximo DOIS RESUMOS.**

### • TRABALHOS

→ COM DOIS AUTORES:

**Spilki F.R. & Arns C.V. 2008. Vírus respiratório sincicial bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36(3): 197-214.**

→ COM VÁRIOS AUTORES:

**Pereira S.A., Schubach T.M.P., Gremião I.D.F., Silva D.T., Figueiredo F.B., Assis N.V. & Passos S.R.L. 2009. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(4): 311-321.**

**Obs.1:** A numeração (sem ponto após os números) das referências segue a prioridade da **ordem alfabética dos sobrenomes dos diversos autores/co-autores** e não do ano da publicação.

Exemplos:

7 Berlinguer F., Leoni G., Bogliolo L., Pintus P.P., Rosati I., Ledda S. & Naitana S. 2004.

8 Bernardi M.L., Cotinot C., Payen E. & Delouis C. 1996. 9 Bernardi M.L. & Delouis C. 1995.

10 Bernardi M.L. & Delouis C. 1996.

11 Bernardi M.L., Fléchon J-E. & Delouis C. 1996.

26 Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A., Par-rilla J.L., Vazquez J.L. & Day B.N. 2002.

27 Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A. & Vazquez J.L. 2001.

28 Martini R. L. 1998.

29 Matthijsa A., Hakze R., Potsma A. & Woelders H. 2000. 30 Matthijsa A., Harkema W., Engel B. & Woelders H. 2000. 68 Tervit H.R., Whittingham D.G. & Rowson L.E.A. 1972.

69 Thompson J.G. 1997.

70 Thompson J.G., Gardner D.K., Pugh P.A., McMillan W.H. & Tervit H.R. 1995.

71 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A., Donnelly P.E. & Tervit H.R. 1990.

72 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A. & Tervit H.R. 1992. 73 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A., Wright R.W. & Tervit H.R. 1991.

**Obs.2:** Para referências com *idêntica ordenação dos a.*, mesmo ano de publicação e em diferentes Revistas, dar prioridade de numeração para aquela que foi citada primeiro no trabalho. Se for na mesma Revista, priorizar a referência com numeração mais baixa.

→ EM VOLUME COM SUPLEMENTO:

**Pier A.C., Cabañes F.J., Chermette R., Ferreiro L., Guillot J., Jensen H.E. & Santurio J.M. 2000.** Prominent animal mycoses from various regions of the world. *Medical Mycology*. 38 (Suppl 1): 47-58.

→ EM FASCÍCULO SEM VOLUME:

**Turan L., Wredmark T. & Fellander-Tsai I. 1995.** Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clinical of Orthopedic*. (320): 110-114.

→ SEM VOLUME E SEM FASCÍCULO:

**Schulman R.L. 2003.** Insulin and other therapies for diabetes mellitus. *Veterinary Medicine*. April: 334-347.

→ EM FORMATO ELETRÔNICO:

**Morse S.S. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases.** *Emerging Infectious Diseases*. 1: 7-15. [Fonte: <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>>].

→ IN PRESS/ Publicação ahead of print [mencionar as data]:

**Teifke J.P., Driemeier D. & Kaden V. 2002.** Arrest of metaphyseal ossification with classical swine fever. *Veterinary Record*. [in press].

→ COMPLETO EM EVENTO:

[Sempre com o N.º do evento (Cidade e País)]

**Bortolozzo F.P., Uemoto D.A., Wentz I. & Pozzobon, M.C. 1999. Reproductive**



performance of gilts submitted to artificial insemination in different intervals before ovulation. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Board Semen Preservation* (Beltsville, U.S.A.). pp.239-240.

→ EM COLEÇÃO OU SÉRIE:

**Jellieff D.B. 1968.** Evaluación del estado de nutrición de la comunidad. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. [Serie de Monografias, 53], 201p.

#### • RESUMOS - No máximo DOIS

[Sempre com o N.º do evento (Cidade e País)]

→ PUBLICADO EM ANAIS:

**Bisol J.F.W., Vieira M.J., Keller A., Mattos R.C. & Gregory R.M. 2000.** Efeito da adição de antibióticos ao diluente de sêmen resfriado equino na fertilidade de éguas. In: *Resumos do XII Salão de Iniciação Científica da UFRGS* (Porto Alegre, Brasil). p.125.

→ PUBLICADO EM ANAIS COM VÁRIOS VOLS.:

**Barcellos D.E.S.N., Razia L.E. & Borowski S.M. 2002.** Micro- agglutination test detecting antibodies against *Brachyspira pilosicoli* [paper 537]. In: *Proceedings of the 17th Congress of the International Pig Veterinary Society*. v.2. (Ames, U.S.A.). p.362.

→ PUBLICADO EM REVISTA:

**Reischak D., Costa U.M., Moojen V. & Ravazzolo A.P. 1999.** Ovine synovial membrane cell line permissive to *in vitro* caprine lentivirus replication [abstract A-097]. In: *Virologica* 99 (Curitiba, Brazil). *Virus Reviews & Research*. 4(1): 81-82.

#### • DISSERTAÇÕES / TESES

**Machado M.L.S. 2001.** Dermatofitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. 82f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)  
- Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## •LIVROS

[Sempre com nome da Cidade: nome da Editora]

→ CAPÍTULO EM LIVRO COM AUTORIA:

**Rodrigues J.L. 1982.** Transferência Embrionária. In: Mies Filho A. (Ed). *Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial*. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, pp.710-720.  
[mencionar o Ed ou Eds]

→ CAPÍTULO EM LIVRO SEM AUTORIA:

**Solomon S.E. & Nascimento V.P. 1994.** Hen's eggshell structure and function. In: *The Microbiology of the Avian Egg*. London: Chapman & Hall, pp.1-24.

→ CITAÇÃO DE LIVRO:

**Bladh W. H. 1971.** *Nuclear Medicine*. 2nd edn. New York: Mac Graw-Hill, 858p.

## •RELATÓRIOS / BOLETINS TÉCNICOS

**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 1982.** Censo Demográfico: Dados Distritais. Rio de Janeiro. v.1. IBGE, 20p.

**World Health Organization. 1994.** Expert Committee on Drug Dependence. Geneva. 29th Report . Geneva. (WHO- Technical Report Series, 856).120p.

## •OUTRAS MODALIDADES

• *Carta ao Editor / Letter*: **Enzensberger W. & Fischer P.A. 1996.** Metronome in Parkinson's disease. *Lancet*. 347: 1337. [Letter]

• *Editorial*: **Singer M.V., Gyr K. & Sarles H. 1985.** Revised classification of peritonitis. *Gastroenterology*. 89: 683-685. [Editorial]

• *Editorial*: **Cancer in South Africa/Editorial/**. **1994.** *South Africa Medical Journal*. 84: 15. [Editorial]

• *Doc. Eletrônico (internet)*: **United States Food and Drug Administration. 2003.** Center for Food Safety & Applied Nutrition. *Bacteriological Analytical Manual Online*. *Salmonella*, 13p.

Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov>>. [Acessado em 04/2003]

-*Doc. Eletrônico (CD ou disquete): Pereira R.L., Wolkmer P., Lopes S.T.A., Cunha C.M.S., Silva J.H.S. & Cecin M. 2003. Comparação de métodos de avaliação da glicose sérica em cães. In: Anais do XXIV Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA (Belo Horizonte, Brasil). 1 CD-ROM.*

## EXEMPLOS - PADRÃO ASV

### Exemplo 1

- 1 **Benitah N. 2006.** Canine nasal aspergillosis. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 21(2): 82-88.
- 2 **Cadwallader J.A., Goulden B.E., Baxter M., Wyburn R.S. & Alley M.R. 1973.** Rhinitis and sinusitis involving *Aspergillus fumigatus* in a dog. *New Zealand Veterinary Journal*. 21(11): 229-233.
- 3 **Davey T.N. 2003.** Aspergilose. In: Tilley L.P. & Smith Jr. F.W.K. (Eds). *Consulta veterinária em 5 minutos, espécies canina e felina*. 2.ed. São Paulo: Manole, pp.460-461.
- 4 **Day M.J. 2009.** Canine sino-nasal aspergillosis: parallels with human disease. *Medical Mycology*. 47(Suppl 1): s315-s323.
- 5 **De Lorenzi D., Bonfanti U., Masserdotti C., Caldin M. & Furlanello T. 2006.** Diagnosis of canine nasal aspergillosis by cytological examination: a comparison of four different collection techniques. *Journal of Small Animal Practice*. 47(6): 316-319.
- 6 **Harvey C.E. & O'Brien J.A. 1983.** Nasal aspergillosis and penicilliosis. In: Kirk R.W. (Ed). *Current Veterinary Therapy VIII*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., pp.236-240.
- 7 **Hawkins E.C. 2006.** Distúrbios da Cavidade Nasal. In: Nelson R.W. & Couto C.G. (Eds). *Medicina interna de pequenos animais*. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp.219-230.
- 8 **Johnson L.R., Drazenovich T.L., Herrera M.A. & Wisner E.R. 2006.** Results of rhinoscopy alone or in conjunction with sinuscopy in dogs with aspergillosis: 46 cases (2001-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 228(5): 738-742
- 9 **Kohn B., Kittner A., Werner H., Schmitz S., Rudolph R. & Brunnberg L. 2002.** Nasal aspergillosis in dogs - diagnosis and therapy. *Kleintierpraxis*. 47(7):415-426.

- 10 **Lane J.G., Clayton-Jones D.G., Thoday K.L. & Thomsett L.R. 1974.** The diagnosis and successful treatment of *Aspergillus fumigatus* infection of the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. *Journal of Small Animal Practice*. 15(2): 79-87.
- 11 **Mathews K.G. 2004.** Fungal Rhinitis. In: King L.G. (Ed). *Textbook of respiratory disease in dogs and cats*. Missouri: Saunders, pp.284-293.
- 12 **Mathews K.G., Davidson A.P., Roplik P.D., Richardson E.F., Komtebedde J., Pappagianis D., Hector R.F. & Kass P.H. 1998.** Comparison of topical administration of clotrimazole through surgically versus nonsurgically placed catheters for treatment of nasal aspergillosis in dogs: 60 cases (1990-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 213(4): 501-506.
- 13 **Menezes E.A., Trindade E.C.P., Costa M.M., Freire C.C.F., Cavalcante M.S. & Cunha F.A. 2004.** Airborne fungi isolated from Fortaleza city, State of Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 46(3): 133-137.
- 14 **Mezzari A., Perin C., Santos Jr. S.S. & Bernd L.A.G. 2002.** Airborne fungi in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 44(5): 269-272.
- 15 **Mortellaro C.M., Della Franca P.D. & Caretta G. 1989.** *Aspergillus fumigatus*, the causative agent of infection of the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. *Mycoses*. 32(7): 327-335.
- 16 **Peeters D. & Clercx C. 2007.** Update on Canine Sinonasal Aspergillosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 37(5): 901-916.
- 17 **Pomrantz J.S., Johnson L.R., Nelson R.W. & Wisner E.R. 2007.** Comparison of serologic evaluation via agar gel immunodiffusion and fungal culture of tissue for diagnosis of nasal aspergillosis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 230(9): 319-323.
- 18 **Saunders J.H. & Van Bree H. 2003.** Diagnosis of nasal aspergillosis in the dog. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 72: 399-408.

- 19 **Sharp N.J.H. 1998.** Aspergillosis and Penicilliosis. In: Greene C.E. (Ed). *Infectious diseases of the dog and cat*. 2nd edn. Philadelphia: Saunders, pp.714-722.
- 20 **Tasker S., Knottenbelt C.M., Munro E.A., Stone-hewer J., Simpson J.W. & Mackin A.J. 1999.** Aetiology and diagnosis of persistent nasal disease in the dog: a retrospective study of 42 cases. *Journal of Small Animal Practice*. 40(10): 473-478.
- 21 **Turek M.M. & Lana S.E. 2007.** Canine nasosinal tumors. In: Withrow S.J. & MacEwen E.G. (Eds). *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4th edn. Philadelphia: Saunders Company, pp.525-539.
- 22 **von Biberstein S.E., Spiro J.D. & Coll W. 1999.** Acinic cell carcinoma of the nasal cavity. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 120(5): 759-762.
- 23 **Wilson D.W. & Dungworth D.L. 2002.** Tumors of the respiratory tract. In: Meuten D.J. (Ed). *Tumors in Domestic Animals*. 4th edn. Iowa: Blackwell, pp.365-399.
- 24 **Windsor R.C., Johnson L.R., Herrgesel E.J. & De Cock H.E. 2004.** Idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis in dogs: 37 cases (1997-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 224(12): 1952-1957.
- 25 **Wolf A.M. 1992.** Fungal diseases of the nasal cavity of the dog and cat. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 22(5): 1119-1132.
- 26 **Wuiermattei D.L. & Flo G.L. 1999.** *Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair*. 3rd edn. Philadelphia: W.B. Saunders, 743p.
- 27 **Zchwarz P.D. 1993.** Fracture biomechanics of the appendicular skeleton: causes and assessment. In: Bojrab M.J., Smeak D.D. & Bloomberg M.S. (Eds). *Disease mechanisms in small animal surgery*. Philadelphia: Lea & Febiger, pp.1009-1026.

### **Exemplo 2**

- 1 **Beltran M.P. & Vasconcelos J.L.M. 2008.** Conception rate in Holstein cows treated with GnRH or hCG on the fifth day post artificial insemination during summer. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60(3): 580-586.
- 2 **Bender R.W., Nascimento A.B., Souza A.H., Ayres H., Araújo R.R., Guenther J.N. & Wiltbank M.C. 2011.** Effect of treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) on day 5 after timed artificial insemination (TAI) on fertility in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 94(E-Suppl.1): 62.

- 3 **Bisinotto R.S., Chebel R.C. & Santos J.E.P. 2010.** Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93(8): 3578-3587.
- 4 **Breuel K.F., Spitzer J.C. & Henricks D.M. 1989.** Systemic progesterone concentration following human chorionic-gonadotropin administration at various times during the estrous-cycle in beef heifers. *Journal of Animal Science*. 67(6): 1564-1572.
- 5 **Brusveen D.J., Cunha A.P., Silva C.D., Cunha P.M., Sterry R.A., Silva E.P., Guenther J.N. & Wiltbank M.C. 2008.** Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during Ovsynch affects pregnancies per AI in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 91(3): 1044-1052.
- 6 **Brusveen D.J., Souza A.H. & Wiltbank M.C. 2009.** Effects of additional prostaglandin F-2 alpha and estradiol-17 beta during Ovsynch in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 92(4): 1412-1422.
- 7 **Bulman D.C. & Lamming G.E. 1978.** Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 54(2): 447-458.
- 8 **Carter F., Forde N., Duffy P., Wade M., Fair T., Crowe M.A., Evans A.C.O., Kenny D.A., Roche J.F. & Lonergan P. 2008.** Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development*. 20(3): 368-375.
- 9 **Carter F., Rings F., Mamo S., Holker M., Kuzmany A., Besenfelder U., Havlicek, V., Mehta J.P., Tesfaye D., Schellander K. & Lonergan P. 2010.** Effect of elevated circulating progesterone concentration on bovine blastocyst development and global transcriptome following endoscopic transfer of in vitro produced embryos to the bovine oviduct. *Biology of Reproduction*. 83(5): 707-719.
- 10 **Cerri R.L.A., Chebel R.C., Rivera F., Narciso C.D., Oliveira R.A., Amstalden M., Baez-Sandoval G.M., Oliveira L.J., Thatcher W.W. & Santos J.E.P. 2011.** Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *Journal of Dairy Science*. 94(7): 3352-3365
- 11 **Cerri R.L.A., Chebel R.C., Rivera F., Narciso C.D., Oliveira R.A., Thatcher W.W. & Santos J.E.P. 2011.** Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. Ovarian and embryonic responses. *Journal of Dairy Science*. 94(7): 3342-3351.

- 12 **Chebel R.C., Al-Hassan M.J., Fricke P.M., Santos J.E.P., Lima J.R., Martel C.A., Stevenson J.S., Garcia R. & Ax R.L. 2010.** Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93(3): 922-931.
- 13 **Christenson R.K., Ford J.J. & Redmer DA. 1985.** Metabolic-clearance and production-rates of estradiol and progesterone during pubertal and postpubertal development in gilts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 75(1): 247-253.
- 14 **Clemente M., de la Fuente J., Fair T., Al Naib A., Gutierrez-Adan A., Roche J.F., Rizos D. & Lonergan P. 2009.** Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction* 138(3): 507-517.
- 15 **Cunha A.P., Guenther J.N., Maroney M.J., Giordano J.O., Nascimento A.B., Bas S., Ayres H. & Wiltbank M.C. 2008.** Effects of high vs. low progesterone concentrations during Ovsynch on double ovulation rate and pregnancies per AI in high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 91(Suppl 1): 246.
- 16 **Dawson F.L.M. 1954.** Progesterone in functional infertility of cattle. *Veterinary Records*. 66: 324-326.
- 17 **Denicol A.C., Lopes Jr. G., Mendonça L.G.D., Rivera F.A, Guagnini F., Perez R.V., Lima J.R., Bruno R.G.S., Santos J.E.P. & Chebel R.C. 2012.** Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*. 95(4): 1794-1806.
- 18 **De Silva A.W.M.V., Anderson G.W., Gwazdauskas F.C., McGilliard M.L. & Lineweaver J.A. 1981.** Inter-relationships with estrous behavior and conception in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 64(12): 2409-2418.
- 19 **Diaz F.J., Anderson L.E., Wu Y.L., Rabot A., Tsai S.J. & Wiltbank M.C. 2002.** Regulation of progesterone and prostaglandin F<sub>2</sub>alpha production in the CL. *Molecular Cellular Endocrinology*. 191(1): 65-80.
- 20 **Fischer-Tenhagen C., Thiele G., Heuwieser W. & Tenhagen B.A. 2010.** Efficacy of a Treatment with hCG 4 days After AI to Reduce Pregnancy Losses in Lactating Dairy Cows After Synchronized Ovulation. *Reproduction in Domestic Animals*. 45(3): 468-472.
- 21 **Forde N., Beltman M.E., Duffy G.B., Duffy P., Mehta J.P., O'Gaora P., Roche J.F., Lonergan P. & Crowe M.A. 2011.** Changes in the endometrial transcriptome during the bovine

**estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biology of Reproduction*. 84(2): 266-278.**

- 22 **Funston R.N., Lipsey R.J., Geary T.W. & Roberts A.J. 2005.** Effect of administration of human chorionic gonadotropin after artificial insemination on concentrations of progesterone and conception rates in beef heifers. *Journal of Animal Science*. 83(6): 1403-1405.
- 23 **Ghanem M.E., Nakao T., Nakatani K., Akita M. & Suzuki T. 2006.** Milk progesterone profile at and after artificial insemination in repeatbreeding cows: effects on conception rate and embryonic death. *Reproduction in Domestic Animals*. 41(2): 180-183.
- 24 **Gumen A., Guenther J.N. & Wiltbank M.C. 2003.** Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 86(10): 3184-3194.
- 25 **Hanlon D.W., Davidson P.J., Hittmann A.R. & Joe A.K. 2005.** Supplementing previously treated anestrous dairy cows with progesterone does not increase first-service conception rate. *Theriogenology*. 63(1): 239-245.
- 26 **Hanlon D.W., Jarratt G.M., Davidson J.P.J., Millar A.J. & Douglas V.L. 2005.** The effect of hCG administration five days after insemination on the first service conception rate of anestrous dairy cows. *Theriogenology*. 63(7): 1938-1945.
- 27 **Herlihy M.M., Giordano J.O., Souza A.H., Ayres H., Ferreira R.M., Keskin A., Nascimento A.B., Guenther J.N., Gaska J.M., Kacuba S.J., Crowe M.A., Butler S.T. & Wiltbank M.C. 2012.** Presynchronization with Double-Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 95(12): 7003-7014.
- 28 **Herrick J.B. 1953.** Clinical observation of progesterone therapy in repeat breeding heifers. *Veterinary Medicine*. 48: 489-490.
- 29 **Howard J.M., Manzo R., Dalton J.C., Frago F. & Ahmadzadeh A. 2006.** Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 95(3-4): 224-233.
- 30 **Hunter R.H.F. 2005.** The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reproduction, Nutrition and Development*. 45(3): 281-290.
- 31 **Inskeep E.K. 2004.** Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science*. 82(E-Suppl): E24-39.



- 32 Janson P.O., Damber J.E. & Axen C. 1981.** Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*. 63(2): 491-497.
- 32 Kendall N.R., Flint A.P.F. & Mann G.E. 2009.** Incidence and treatment of inadequate postovulatory progesterone concentrations in repeat breeder cows. *Veterinary Journal*. 181(2): 158-162.
- 34 Larson S.F., Butler W.R. & Currie W.B. 1997.** Reduced fertility associated with low progesterone post-breeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 80(7): 1288-1295.
- 35 Larson S.F., Butler W.R. & Currie W.B. 2007.** Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 102(1-2): 172-179.
- 36 Larson J.E., Krisher R.L. & Lamb G.C. 2011.** Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*. 23(2): 311-318.
- 37 Lemley C.O., Wilmoth T.A., Tager L.R., Krause K.M. & Wilson M.E. 2010.** Effect of a high cornstarch diet on hepatic cytochrome P450 2C and 3A activity and progesterone half-life in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93(3): 1012-1021.
- 38 Lonergan P., Woods A., Fair T., Carter F., Rizos D., Ward F., Quinn K. & Evans A. 2007.** Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. 19(7): 861-868.
- 39 Mann G.E. & Lamming G.E. 1999.** The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 34(3-4): 269-274.
- 40 Martins J.P.N., Policelli R.K., Neuder L.M., Raphael W. & Pursley J.R. 2011.** Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F-2 alpha of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 94(6): 2815-2824.
- 41 McNeill R.E., Sreenan J.M., Diskin M.G., Cairns M.T., Fitzpatrick R., Smith T.J. & Morris D.G. 2006.** Effect of systemic progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during the early luteal phase. *Reproduction Fertility and Development*. 18(5): 573-583.
- 42 Moreira F., de la Sota R.L., Diaz T. & Thatcher W.W. 2000.** Effect of day of the estrous cycle at

the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. 78(6): 1568-1576.

- 43 **Moreira F., Orlandi C., Risco C.A., Mattos R., Lopes F. & Thatcher W.W. 2001. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 84(7): 1646-1659.**
- 44 **Morris D. & Diskin M. 2008. Effect of progesterone on embryo survival. *Animal*. 2(8): 1112-1119.**
- 45 **Murray M. 1991. Microsomal cytochrome-P450-dependent steroid metabolism in male sheep liver - Quantitative importance of 6-beta-hydroxylation and evidence for the involvement of a P450 from the IIA subfamily in the pathway. *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology*. 38(5): 611-619.**
- 46 **Murray M. 1992. Participation of the a cytochrome P450 enzyme from the 2C subfamily in progesterone 21-hydroxylation in sheep liver. *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology*. 43(6): 591-593.**
- 47 **Nascimento A.B., Souza A.H., Guenther J.N., Dalla Costa F.P., Sartori R. & Wiltbank M.C. 2012. Effects of treatment with human chorionic gonadotrophin or intravaginal progesterone-releasing device after AI on circulating progesterone concentrations in lactating dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development*. [in press].**
- 48 **Nasser L.F., Sá Filho M.F., Reis E.L., Rezende C.R., Mappletoft R.J., Bo G.A. & Baruselli P.S. 2011. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 76(2): 320-327.**
- 49 **Niswender G.D., Juengel J.L., Silva P.J., Rollyson M.K. & McIntush E.W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiology Review*. 80(1): 1-29.**
- 50 **O'Shea J.D., Rodgers R.J. & D'Occhio M.J. 1989. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*. 85(2): 483-487.**
- 51 **Parr R.A., Davis I.F., Miles M.A. & Squires T.J. 1993. Liver blood-flow and metabolic-clearance rate of progesterone in sheep. *Research Veterinary Science*. 55(3): 311-316.**
- 52 **Ribeiro E.S., Bisinotto R.S., Favoreto M.G., Martins L.T., Cerri R.L., Silvestre F.T., Greco, L.F., Thatcher W.W. & Santos J.E. 2012. Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F2 $\alpha$  as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*. 78(2):**

273-284.

- 53 **Rivera F.A., Mendonça L.G.D., Lopes G., Santos J.E.P., Perez R.V., Amstalden M., Correa-Calderon A. & Chebel R.C. 2011.** Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction*. 141(3): 333-342.
- 54 **Robinson N.A., Leslie K.E. & Walton J.S. 1989.** Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 72(1): 202-207.
- 55 **Sangsrivong S. 2002. Studies of steroid metabolism in dairy cattle. 90f. Madison, WI. (PhD Dissertation - Dairy Science) - University of Wisconsin, USA. Sangsrivong S., Combs D.K., Sartori R.F., Armentano L.E. & Wiltbank M.C. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol 17 $\beta$  in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 85(11): 2831-2842.**
- 56 **Santos J.E.P., Thatcher W.W., Pool L. & Overton M.W. 2001. Effect of human chorionic gonadotropin, on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 79(11): 2881-2894.**
- 57 **Schmitt E.J.P., Diaz T., Barros C.M., de la Sota R.L., Drost M., Fredriksson E.W., Staples C.R., Thorner R. & Thatcher W.W. 1996.** Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Animal Science*. 74(8): 1074-1083.
- 58 **Shams-Esfandabadi N., Shirazi A., Mirshokrai P. & Bonyadian M. 2007.** Influence of hCG administration after AI on conception rates and serum progesterone concentration in cattle. *Pakistan Journal of Biology Science*. 10(16): 2709-2713.
- 59 **Silva C.C., Groome N.P. & Knight P.G. 1999.** Demonstration of a suppressive effect of inhibin alpha-subunit on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 115(2): 381-388.
- 60 **Silva C.C. & Knight P.G. 2000.** Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of *in vitro* matured oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 115(2): 381-388.
- 61 **Smith D.L., Stinefelt B.M., Blemings K.P. & Wilson M.E. 2006. Diet-induced alterations in progesterone clearance appear to be mediated by insulin signaling in hepatocytes. *Journal***

*of Animal Science*. 84(5): 1102- 1109.

- 62 **Souza A.H., Ayres H., Ferreira R.M., Wiltbank M.C. 2008.** A new presynchronization system (Double-Ovs- ynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 70(2): 208-215.
- 63 **Souza A.H., Gumen A., Silva E.P.B., Cunha A.P., Guenther J.N., Peto C.M., Caraviello D.Z. & Wiltbank M.C. 2007.** Supplementation with estradiol-17 beta before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90(10): 4623-4634.
- 64 **Souza A.H., Silva E.P.B., Cunha A.P., Gumen A., Ayres H., Brusveen D.J., Guenther J. N. & Wiltbank M.C. 2011.** Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology*. 75(4): 722-733.
- 65 **Sreenan J.M. & Diskin M.G. 1983.** Early embryonic mortality in the cow - its relationship with progesterone concentration. *Veterinary Records*. 112(22): 517-521.
- 66 **Sterry R.A., Welle M.L. & Fricke P.M. 2006.** Treatment with gonadotropin-releasing hormone after first timed artificial insemination improves fertility in noncycling lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 89(11): 4237-4245.
- 67 **Stevenson J.S., Portaluppi M.A., Tenhouse D.E., Lloyd A., Eborn D.R., Kacuba S. & DeJarnette J.M. 2007.** Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. *Journal of Dairy Science*. 90(1): 331-340.
- 68 **Stevenson J.S. & Pulley S.L. 2012.** Pregnancy per artificial insemination after presynchronizing estrous cycles with the Presynch-10 protocol or prostaglandin F(2 $\alpha$ ) injection followed by gonadotropin-releasing hormone before Ovs- ynch-56 in 4 dairy herds of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 95(11): 6513-6522.
- 69 **Stevenson J.S., Pursley J.R., Garverick H.A., Fricke P.M., Kesler D.J., Ottobre J.S. & Wiltbank M.C. 2006.** Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *Journal of Dairy Science*. 89(7): 2567-2578.
- 70 **Stevenson J.S., Tenhouse D.E., Krisher R.L., Lamb G.C., Larson J.E., Dahlen C.R., Pursley J.R., Bello N.M., Fricke P.M., Wiltbank M.C., Brusveen D.J., Burkhart M., Youngquist R.S. & Garverick H.A. 2008.** Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. *Journal of Dairy*

*Science*. 91(7): 2901-2915.

- 71 Stormshak F., Inskeep E.K., Lynn J.E., Pope A.L. & Casida L.E. 1963. Progesterone levels in corpora lutea and ovarian effluent blood of the ewe. *Journal of Animal Science*. 22(4): 1021-1026.
- 72 Stronge A.J. H., Sreenan J.M., Diskin M.G., Mee J.F., Kenny D.A. & Morris D.G. 2005. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*. 64(5): 1212-1224.
- 73 Villarroel A., Martino A., BonDurant R.H., Deletang F. & Sischo W.M. 2004. Effect of post-insemination supplementation with PRID on pregnancy in repeat-breeder Holstein cows. *Theriogenology*. 61(7-8): 1513-1520.
- 74 Waldmann A., Reksen O., Landsverk K., Kom-misrud E., Dahl E., Refsdal A. & Ropstad E. 2001. Progesterone concentrations in milk fat at first insemination - effects on non-return and repeat-breeding. *Animal Reproduction Science*. 65(1-2): 33-41.
- 75 Walton J.S., Halbert G.W., Robinson N.A. & Leslie K.E. 1990. Effects of progesterone and human chorionic-gonadotropin administration 5 days postinsemination on plasma and milk concentrations of progesterone and pregnancy rates of normal and repeat breeder dairy cows. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. 54(3): 305-308.
- A. Willard S., Gandy S., Bowers S., Graves K., Elias & Whisnant C. 2003. The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology*. 59(8): 1799-1810.
- 76 Wiltbank M.C., Carvalho P.D., Keskin A., Hackbart K.S., Meschiatti M.A., Bastos M.R., Guenther J.N., Nascimento A.B., Herlihy M.M., Amundson M.C. & Souza A.H. 2011. Effect of progesterone concentration during follicle development on subsequent ovulation, fertilization, and early embryo development in lactating dairy cows. *Biology of Reproduction*. 85: 685.
- 77 Wiltbank J.N., Hawk H.W., Kidder H.E., Black W.G., Ulberg L.C. & Casida L.E. 1956. Effect of progesterone therapy on embryos survival in cows of lowered fertility. *Journal of Dairy Science*. 39(4): 456-461.
- 78 Wiltbank M., Lopez H., Sartori R., Sangsritavong S. & Gumen A. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*. 65(1): 17-29.

