



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**LILIANE GIROTTO PEREIRA**

**ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO FAVORECE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS  
INDUZIDAS PELO VENENO DE *Lachesis muta muta* EM RATOS WISTAR**

Presidente Prudente - SP

2021



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**LILIANE GIROTTO PEREIRA**

**ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO FAVORECE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS  
INDUZIDAS PELO VENENO DE *Lachesis muta muta* EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora:

Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira

Presidente Prudente - SP

2021

636.089 59    Pereira, Liliane Giroto.  
P436o            Óleo de girassol ozonizado favorece a cicatrização de feridas induzidas pelo veneno de *lachesis muta muta* em ratos wistar / Liliane Giroto Pereira. – Presidente Prudente, 2021.  
                    49f.: il.

                    Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista–Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.  
                    Bibliografia.  
                    Orientadora: Rosa Maria Barilli Nogueira

                    1. Acidente ofídico 2. Lesão cutânea 3. Acidente laquético 4. Ozonioterapia 5. Reepitelização. I. Título.

Catlogação na fonte: Michele Mogni – CRB 8/6204

**LILIANE GIROTTO PEREIRA**

**ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO FAVORECE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS  
INDUZIDAS PELO VENENO DE *Lachesis muta muta* EM RATOS WISTAR**

Exame geral de qualificação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 22 de fevereiro de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Profa. Dra. Cecília Laposy Santarém  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

---

Profa. Dra. Karina Maria Basso  
Centro Universitário Filadélfia (UNIFIL)  
Londrina-PR

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho em especial ao meu querido irmão que não se encontra mais conosco, Rodrigo Romero Giroto Bolonheis. Eternamente em nossos corações, mente e alma.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pela vida, pela família e pelos amigos. Pela coragem, fé e força que me deu. Por me permitir observar e sentir cada criação sua, e auxiliar nos cuidados de nossos irmãos mais puros, os animais.

Agradeço pela família, que sempre esteve comigo durante toda a minha jornada, meus avós Elenir Romero Giroto e Wilson Giroto, minha mãe, Viviane Romero Giroto e minha irmã, Rebecca Romero Giroto Bolonheis.

Agradeço ao meu noivo, Leonardo de Souza Soares, que me apoiou, me acalmou e me encorajou diversas vezes durante essa trajetória.

Aos meus sogros, Sirlei Alves de Souza Soares e Paulo Roberto Soares que me ajudaram muito mais do que podem imaginar, no dia a dia, fazendo parte da minha família.

Agradeço a Professora Doutora Rosa Maria Barilli Nogueira por acreditar em mim e me orientar tão bem além do mestrado, se tornando uma amiga.

Ao hoje, colega de profissão, Doutor Paulo Felipe Izique Goiozo que me auxiliou mesmo de longe, e me incentivou a iniciar mais essa fase da vida que hoje está se concluindo.

Agradeço aos colegas Gabrielle Gomes dos Santos Ribeiro e Guilherme Ozaki, que me auxiliaram e orientaram durante a análise estatística e a análise da dimensão fractal.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001”.

*“Os sonhos não determinam o lugar que você vai estar, mas produzem força necessária para o tirar do lugar que está.” (Augusto Cury)*

## RESUMO

### **Óleo de girassol ozonizado favorece a cicatrização de feridas induzidas pelo veneno de *Lachesis muta muta* em ratos wistar**

O acidente pela serpente do gênero *Lachesis muta muta* de ocorrência na floresta Amazônica provoca tanto efeito local como sistêmico e a gravidade na hora do atendimento depende do tempo de sua ocorrência. O antiveneno é indispensável, mas tem poucos efeitos locais, desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da dose de 1mg/Kg de veneno laquéutico no local da inoculação, o tratamento tópico com óleo de girassol ozonizado, associado ou não ao antiveneno em ratos. Quatro grupos de ratos (n=10 cada grupo) foram distribuídos em: controle- solução de cloreto de sódio 0,9% (C); veneno + óleo de girassol ozonizado (VOZ); veneno (V); óleo de girassol ozonizado (OZ). Seis horas após aplicação do veneno os animais receberam o antiveneno. O membro inoculado foi avaliado durante 17 dias por meio de avaliação morfológica, termográfica, histológica e pela dimensão fractal (FD). O veneno provocou dor, edema, inflamação, úlcera, crosta e necrose, hipotermia local no segundo dia e redução das áreas de maior temperatura para os grupos V e VOZ. No grupo VOZ houve redução da dor, úlcera, crosta, necrose e menor infiltrado inflamatório; o colágeno na FD foi maior para os grupos V, seguido do VOZ e OZ. Conclui-se que o veneno de *Lachesis muta muta* na dose de 1mg/Kg causa severos efeitos locais no membro inoculado, o óleo de girassol ozonizado favorece a reparação destes efeitos e não causa reação adversa local.

**Palavras chave:** acidente ofídico, cicatrização, dimensão fractal, ferida cutânea, ozonioterapia, termografia.



## ABSTRACT

### Ozonized sunflower oil encourages the healing of wounds induced by *Lachesis muta muta* poison in wistar rats

The accident by the snake of the genus *Lachesis muta muta* occurring in the Amazon rainforest causes both local and systemic effects and the severity at the time of care depends on the time of its occurrence. Antivenom is indispensable, but has little local effects, therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of the dose of 1mg/Kg of laquetic poison at the inoculation site, topical treatment with ozonated sunflower oil, associated or not to antivenom in rats. Four groups of rats (n = 10 each group) were distributed in: control - 0.9% sodium chloride solution (C); poison + ozonized sunflower oil (VOZ); poison (V); ozonized sunflower oil (OZ). Six hours after application of the poison, the animals received the antivenom. The inoculated limb was evaluated for 17 days by means of morphological, thermographic, histological and fractal dimension (FD) evaluation. The poison caused pain, edema, inflammation, ulcer, crust and necrosis, local hypothermia on the second day and reduced areas of higher temperature for groups V and VOZ. In the VOZ group there was a reduction in pain, ulcer, crust, necrosis and less inflammatory infiltrate; collagen in FD was higher for groups V, followed by VOZ and OZ. It is concluded that the poison of *Lachesis muta muta* at a dose of 1mg/Kg causes severe local effects on the inoculated limb, ozonated sunflower oil favors the repair of these effects and does not cause a local adverse reaction.

**Keywords:** ophidic accident, healing, fractal dimension, skin wound, ozone therapy, thermography.

## LISTA DE SIGLAS

C	–Controle
CONCEA	– Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
HE	-Hematoxilina e Eosina
IM	– Intramuscular
IP	- Intraperitoneal
V	-Veneno
VOZ	– Veneno + óleo ozonizado
OZ	– Óleo ozonizado
M	– Momento

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A) Imagem termográfica do membro do rato inoculado com veneno laquétrico, indicando a área branca de maior temperatura, utilizando a câmera termográfica <i>Flir One Pro</i> <sup>®</sup> acoplada ao celular com Aplicativo <i>Flir One</i> . B) Imagem termográfica do membro do rato inoculado com veneno laquétrico com imagem quadriculada, realizada através do programa de edição vetorial CorelDRAW Graphics Suite 2020.....	19
Figura 2 -	A) Printscreen da tela do Software Image J analisando o colágeno em uma lâmina corada em Tricômio de Masson; B) Printscreen da tela do Software Image J da lâmina da imagem “A” após ser submetida ao processo de binarização.....	20
Figura 3 -	Imagens macroscópicas das lesões no membro posterior esquerdo de ratos inoculados com veneno laquétrico na dose de 1mg/Kg nos dias 1, 7 e 17 nos grupos controle (C1, C7, C17); veneno+óleo de girassol ozonizado (VOZ 1, VOZ 7, VOZ 17); grupo veneno (V1, V7, V17); grupo óleo de girassol ozonizado (OZ1, OZ7, OZ17).....	21
Figura 4 -	Análise morfológica da porcentagem de sensibilidade dolorosa no membro de rato inoculado com veneno laquétrico na dose de 1mg/Kg, comparação entre grupos C (controle), VOZ (veneno + óleo ozonizado), V (veneno).....	22
Figura 5 -	Análise morfológica da coloração e edema no membro inoculado, comparação entre grupos C (controle), VOZ (veneno + óleo ozonizado), V (veneno) e OZ (óleo ozonizado) nos momentos 1 ao 7, 10 e 13.....	23
Figura 6-	Análise morfológica da úlcera e necrose no membro inoculado, comparação entre grupos C (controle), VOZ (veneno + óleo ozonizado), V (veneno) e OZ (óleo ozonizado).....	24
Figura 7-	Gráfico das médias da temperatura no exame de termografia, comparação entre momentos nos diferentes grupos C (controle), VOZ (veneno + óleo ozonizado), V (veneno) e OZ (óleo ozonizado), nos dias 1 ao 9, dia 11 e dia 13.....	25
Figura 8-	Fotomicroscopia de algumas alterações encontradas no tecido muscular no membro inoculado dos animais dos diferentes grupos no dia 17. A-Animal do grupo VOZ indicando na seta intenso infiltrado inflamatório mononuclear (Objetiva de 40x); B-grupo V, indicando na seta intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear (Objetiva de 10x).; C-grupo V, indocando na seta presença de fibroblastos (Objetiva de 10x).; D-grupo VOZ, indicando na seta necrose em camada muscular indicado pela seta (Objetiva de 10X)	26
Figura 9-	Análise da dimensão fractal para o colágeno dos grupos C (controle), VOZ (veneno + óleo ozonizado), V (veneno), OZ (óleo ozonizado) no dia 17.....	27

## SUMÁRIO

<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>13</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO ÉTICA.....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO B – NORMAS DA REVISTA.....</b>	<b>41</b>

## ARTIGO CIENTÍFICO

### **Óleo de girassol ozonizado favorece a cicatrização de feridas induzidas pelo veneno de *Lachesis muta muta* em ratos wistar**

Pereira LG<sup>1</sup>; De Melo GH<sup>1</sup>; Souza AM<sup>2</sup>; Yada JNW<sup>2</sup>; Caddeo G<sup>2</sup>; Oliveira BS<sup>2</sup>; Dos Santos MB<sup>3</sup>; Trevisan C<sup>4</sup>; Santarém CL<sup>5</sup>; Floriano RS<sup>5</sup>; Nogueira RMB<sup>5</sup>;

1-Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

2-Discente do Curso de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

3- Discente do Curso de Farmácia, Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

4-Bióloga- Departamento de Patologia Animal, Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

5-Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista-UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. \*E-mail: rosa@unoeste.br

## HIGHLIGHTS

- A dose de 1mg/Kg de veneno *Lachesis muta muta* causa lesão local severa em rato
- Óleo de girassol ozonizado via tópica em rato favorece recuperação da lesão local causada pelo veneno laquétrico
- Óleo de girassol ozonizado via tópica não causa reações adversas locais em rato

## Resumo

Terapias que minimizem os efeitos locais do veneno de *Lachesis muta muta* são escassos na literatura. Neste estudo, o objetivo foi avaliar o efeito da dose de 1mg/Kg de veneno laquétrico no local da inoculação, o tratamento tópico com óleo de girassol ozonizado, associado ou não ao antiveneno em ratos. Quarenta ratos foram distribuídos nos grupos: controle-solução de cloreto de sódio 0,9% (C); veneno + óleo de girassol ozonizado (VOZ); veneno (V); óleo de girassol ozonizado (OZ). Seis horas após o veneno administrou-se o antiveneno e avaliou-se o membro inoculado durante 17 dias pela análise morfológica, termográfica, e ao 17º dia avaliou-se através da histologia e dimensão fractal (FD). O veneno provocou dor, edema, inflamação, úlcera, crosta e necrose, hipotermia local no segundo dia e redução das áreas de maior temperatura para os grupos V e VOZ. No grupo VOZ houve redução da dor, úlcera, crosta, necrose e menor infiltrado inflamatório; o colágeno na FD foi maior para os grupos V, seguido do VOZ e OZ. Conclui-se que na avaliação local do membro inoculado com o veneno de *Lachesis muta muta*, a dose de 1mg/Kg causou severos efeitos locais, o óleo de girassol ozonizado via tópica favoreceu a cicatrização das feridas induzidas pelo veneno e não causou nenhum efeito adverso local.

**Palavras chave:** acidente ofídico, cicatrização, dimensão fractal, ferida cutânea, ozonioterapia, termografia

## Introdução

Com cerca de 5,4 milhões de acidentes ofídicos humanos e mais de 125.000 mortes a cada ano<sup>1,2</sup>, os mesmos foram reinseridos na lista de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OS) em 2017<sup>3,4,5</sup>.

As serpentes do gênero *Lachesis*, família *Viperidae*, classificadas de acordo com sua dentição como solenóglifa, de reprodução ovípara são conhecidas popularmente no Brasil como surucucu, pico de jaca, surucutinga, malha de fogo e habita principalmente a floresta amazônica e mata atlântica<sup>6,7</sup>. A serpente é capaz de injetar grandes quantidades de veneno (acima de 300 mg) e seu acidente é considerado grave com efeitos local e sistêmico com sinais de síndrome vagal, importante no diagnóstico diferencial do acidente botrópico<sup>7</sup>.

Segundo levantamento do Ministério da Saúde, no Brasil durante todo o ano de 2018 houve 28.946 casos de acidentes ofídicos, número maior que o ano anterior, 2017 de 28.736 e menor que 2011 com 31.145 casos. Porém, apesar do grande número, considerado subnotificado, houveram apenas 104 óbitos sendo 40 destes provenientes da região nordeste, no ano de 2018<sup>8</sup>.

Machado<sup>9</sup>, relatou que entre 2007 a 2015 o gênero *Lachesis* foi responsável por 3,13% das notificações, sendo excluídos os casos onde não foi identificado o gênero da serpente (11,77%). Neste mesmo período, o gênero foi responsável por 7.736 notificações, onde a região norte foi a mais acometida, responsável por mais de 90% dos registros.

O acidente pode atingir todas as espécies de animais domésticos<sup>10,11</sup> e a gravidade dos sinais clínicos no atendimento, tanto locais (dor, edema, eritema, hemorragia, equimose, necrose) como sistêmico (alteração do tempo de coagulação, bradicardia, dor abdominal, êmese, diarreia, hipotensão arterial, sonolência, nefrotoxicidade, choque)<sup>12,13,14,6,7</sup> estão relacionados a vários fatores mas principalmente ao tempo da ocorrência do acidente até o atendimento<sup>15</sup>.

As toxinas conhecidas da *Lachesis muta* são as serinoproteínases, L-aminoácido oxidase, fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), hialuronidase e leticina tipo c<sup>16,17</sup>.

Embora a aplicação do antiveneno seja o tratamento convencional, possui pouco efeito local, apresenta problemas como falta de disponibilidade em regiões distantes, possibilidade de reação de hipersensibilidade imediata e tardias, problemas de regionalização das espécies das serpentes, alto custo de produção

com baixa margem de lucro, reduzindo o interesse das indústrias farmacêuticas<sup>18,19,20,3</sup>. Colombini et.al<sup>21</sup>, notaram que o antiveneno polivalente para *Bothrops* e *Lachesis* é insuficiente para neutralizar a ação hemorrágica e os efeitos de incoagulabilidade que o veneno de *Lachesis muta muta* pode ocasionar, e correlacionam este efeito com as diferenças estruturais entre os dois gêneros de serpentes<sup>21</sup>.

No Brasil ano de 2018, por meio da Portaria nº 702/GM/MS, o Ministério da Saúde declarou a ozonioterapia como uma prática de ação integrativa, de baixo custo, comprovada e segura, incluindo-a como tratamento alternativo para usuários da rede pública de saúde, as chamadas de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), que são oferecidas gratuitamente aos usuários quando há recomendação médica e interesse do paciente<sup>22</sup>.

Na literatura, encontramos uma diversidade de estudos que utilizaram diferentes vias de administração do ozônio, via subcutânea<sup>24</sup>, intramuscular<sup>24</sup>, intradiscal<sup>25,26</sup>, intra-articular<sup>27</sup>, intracavitária no espaço peritoneal ou pleural<sup>28</sup>, intravaginal, intra-uretral e vesical<sup>29</sup>, tópica<sup>30,31,32</sup>, odontológica<sup>33</sup> e auto-hemoterapia ozonizada<sup>34,35</sup>. Como formas tópicas têm-se o uso de óleo ozonizado principalmente os de girassol e oliva<sup>36,37</sup> e evidências apoiam seu efeito satisfatório em feridas cutâneas<sup>38</sup>, como fístulas e feridas pós-cirúrgicas, úlceras de pressão, tróficas, isquêmicas e feridas diabéticas. Promove redução da infecção microbiana, tem efeito de desbridamento, modulação da fase inflamatória, estimulação da angiogênese e também reações biológicas e enzimáticas que favorecem o metabolismo do oxigênio melhorando a cicatrização das feridas<sup>39,28</sup>.

Embora haja pesquisas sobre os efeitos terapêuticos do ozônio em vários processos cicatriciais, não há na literatura estudo que demonstre os efeitos do óleo ozonizado em lesões causadas pelos venenos ofídicos e em específico o veneno laquétrico. Com isso, levantamos a hipótese de que o óleo ozonizado via tópica poderia trazer benefício como terapia complementar minimizando os efeitos locais provocados pelo veneno laquétrico, favorecendo a cicatrização e recuperação do paciente.

Considerando a importância deste acidente ofídico, as graves lesões locais provocadas pelo veneno e não ter sido encontrado na literatura nenhum estudo científico utilizando óleo de girassol ozonizado usado via tópica, nosso objetivo foi



avaliar a dose de 1mg/Kg de veneno laquétrico no local da inoculação, o tratamento tópico com óleo de girassol ozonizado, associado ou não ao antiveneno em ratos

## **Material e Métodos**

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade (protocolo nº 5612), desenhado e monitorado de acordo com os princípios éticos preconizados pela Resolução Normativa 33 do CONCEA<sup>40</sup> e as diretrizes ARRIVE<sup>41</sup>.

Quarenta ratos *Wistar*, 90 dias, 250g, machos, foram mantidos em gaiolas individuais, com água e ração à vontade, em ambiente climatizado com temperatura de  $22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo 12 horas claro/escuro e aclimatados com uma semana anterior ao início do experimento. Foi realizado tricotomia no membro posterior esquerdo no dia anterior à inoculação do veneno. Os animais alocados em quatro grupos (n=10 cada grupo) receberam: solução fisiológica (C = controle); veneno + óleo de girassol ozonizado (VOZ); veneno (V); óleo de girassol ozonizado (OZ).

### *Veneno bruto e antiveneno*

Amostras liofilizadas do "Pool" de venenos de *Lachesis muta muta* foram fornecidas pelo Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da PUC de Goiás e mantidas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso. O veneno foi inoculado no membro posterior esquerdo, via intramuscular (IM) na dose de 1,0mg/Kg.

O antiveneno Master Soro Plus<sup>®</sup> (Vencofarma) foi administrado seis horas após a aplicação do veneno via intraperitoneal (IP), na dose preconizada pelo fabricante para neutralizar a quantidade de veneno inoculado.

### *Óleo de girassol ozonizado*

O óleo de girassol ozonizado contendo índice de peróxido equivalente padronizado de 700meq/kg foi adquirido pronto para uso da Ozone&Life<sup>®</sup> - Tecnologia em Geradores de Ozônio, Brasil. Foi instilado duas gotas (cerca de 0,1mL) via tópica no local de inoculação do veneno e por toda a extensão da lesão, com auxílio de hastes de algodão realizando 5 movimentos circulares. Os animais foram tratados a cada 24 horas durante 16 dias.

### *Avaliação morfológica*

Os parâmetros clínicos relacionados à evolução do processo cicatricial utilizados neste estudo foram baseados no estudo de Abegão et al., (2015)<sup>42</sup> e Barrionuevo et al., (2015)<sup>43</sup>, com os seguintes escores: sensibilidade dolorosa (0-ausente; 1- presente (considerada quando havia uma ou mais mudanças no comportamento do animal, tais como: inquietude, agitação, vocalização e movimento de virar a cabeça com intenção de morder após contato com a lesão), cor do membro (1- rósea; 2- amarelada; 3- pálida; 4- cianótica), edema, necrose úlcera sendo (0-ausente; 1-presente). Os animais foram avaliados nos momentos 1(dia 1), 2(dia 2), 3(dia 3), 4(dia 4), 5(dia 5), 6(dia 6), 7(dia 7), 10(dia 10), 13(dia 13), 17(dia 17)

As lesões foram fotografadas por câmera digital modelo Coolpix P510 (Nikon®) em todos os momentos de avaliação.

### *Avaliação termográfica*

Foi utilizada técnica de imagem por meio de emissão infravermelha de calor da superfície corporal, não invasiva, onde foi gerado uma imagem que expressou um gradiente térmico em um padrão de cores, sendo a cor branca de maior temperatura e a cor azul escuro de menor temperatura, utilizando câmera termográfica *Flir One Pro*<sup>®</sup> acoplada ao celular com Aplicativo *Flir One* para avaliação da temperatura da imagem (Figura 1A). As imagens foram realizadas sempre no mesmo horário em ambiente controlado com temperatura ambiente de 22°C±2°C.

Para determinar a área de lesão do membro inoculado foram usadas fotos termográficas na resolução padronizada de 17,5 x 23,5 cm, dessa maneira utilizando a fórmula  $A = b \cdot h$ <sup>44</sup> totalizam uma área de 411,25 cm<sup>2</sup> de imagem a uma distância também padronizada de 34cm. Através do programa de edição vetorial CorelDRAW Graphics Suite 2020 foi aplicado uma máscara quadriculada de 30x30 medindo cada um 11,3 mm<sup>2</sup>, resultado esse obtido através da equação de determinação de área do quadrado:  $A = L^2$ <sup>44</sup>. Foram contados quantos quadrados representam a área mais quente (representada pela cor branca) e todos os seus arredores (representada pela cor vermelha) (Figura 1B). A avaliação

termográfica foi realizada nos momentos 1(dia 1), 2(dia 2), 3(dia 3), 4(dia 4), 5(dia 5), 6(dia 6), 7(dia 7), 10(dia 10), 13(dia 13).

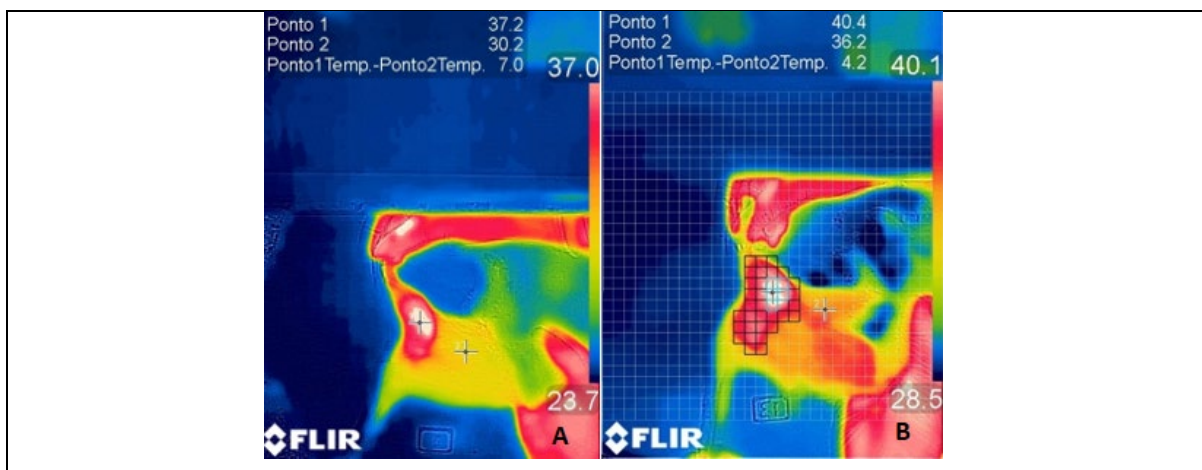


Figura 1. A) Imagem termográfica do membro do rato inoculado com veneno laquétrico, indicando a área branca de maior temperatura, utilizando a câmera termográfica *Flir One Pro*<sup>®</sup> acoplada ao celular com Aplicativo *Flir One*. B) Imagem termográfica do membro do rato inoculado com veneno laquétrico com imagem quadriculada, realizada através do programa de edição vetorial *CorelDRAW Graphics Suite 2020*.

### *Análise histológica*

No dia 17 (último dia de experimento), após a eutanásia dos animais com cloridrato de xilazina 2% (*Xilazin*<sup>®</sup> 2%) 7,5mg/Kg intraperitoneal (IP) e cetamina (*Ketamina*<sup>®</sup>) 60mg/Kg IP<sup>46</sup> foi realizada a extração do membro posterior inteiro, tanto direito quanto o esquerdo, e fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas e posteriormente realizados corte perpendicular a ferida, armazenado em cacetes histológicos e obtidos cortes de 5 µm de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise de neovascularização, infiltrado inflamatório mononuclear, infiltrado inflamatório polimorfonuclear, fibroblastos, necrose, edema, e tipo de tecido conjuntivo. As alterações foram classificadas em 0-ausente, 1-discreto (1% a 25%), 2-moderado (26% a 50%) e 3-acentuado (51% a 100%) e o tecido conjuntivo classificado em denso ou frouxo.

### *Análise Fractal*

A dimensão fractal (FD) para o colágeno foi realizada em amostras preparadas de acordo com a análise histológica, porém as lâminas foram coradas com Tricômio de Masson, e o cálculo baseado em 4 imagens de cada animal, de cada grupo. As imagens foram submetidas ao processo de binarização para leitura, tornando-as pretas e brancas, onde as fibras colágenas se apresentaram brancas. Sequencialmente a análise ocorreu utilizando o método de contagem de caixas (box-counting), com quantificação da distribuição em pixels, para isso foi utilizado o software Image J (Instituto Nacional de Saúde, Estados Unidos – NIH), disponível gratuitamente na internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Os tamanhos das caixas analisadas foram calculados pelo software (2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 32 and 64) (Figura 2). O gráfico log/log foi realizado de acordo com o método descrito por Garcia, et al. (46), onde foi verificada a média de números na caixa de cada grupo e seu tamanho, ficando sempre entre 0 e 2.

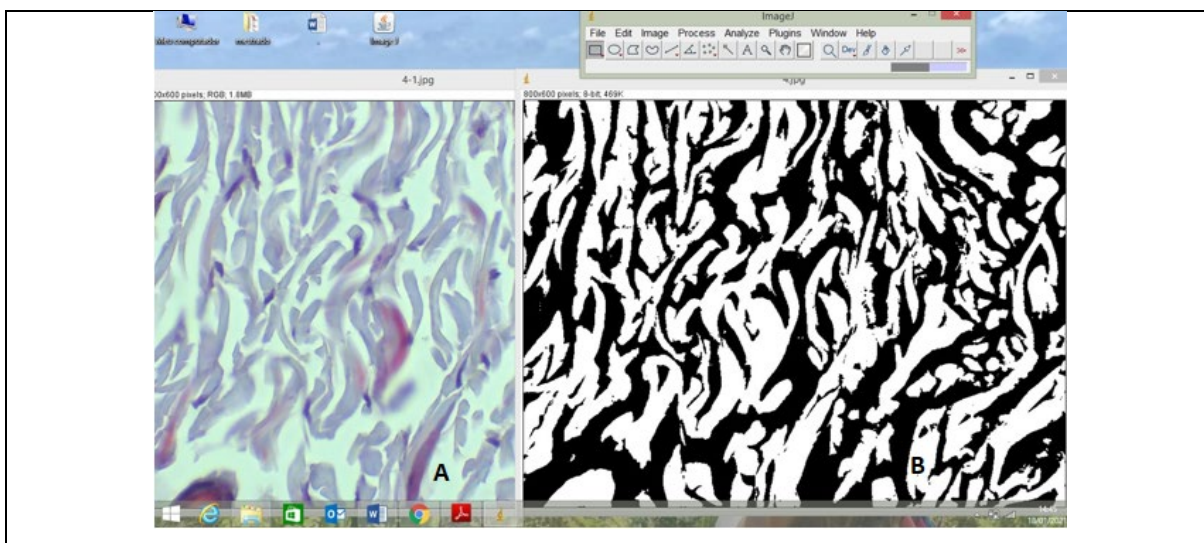


Figura 2. A) Printscren da tela do Software Image J analisando o colágeno em uma lâmina corada em Tricômio de Masson; B) Printscren da tela do Software Image J da lâmina da imagem “A” após ser submetida ao processo de binarização.

### *Análise estatística*

Para análise dos dados foi utilizado o software Action Stat, um sistema estatístico que utiliza a linguagem R e trabalha de forma integrada ao Excel. Para todos os testes foi adotado nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Para verificar a existência de associação entre variáveis qualitativas foi aplicado o Teste Qui-Quadrado ou, em algumas situações, o Teste Exato de Fisher. Os testes aplicados para a termografia foram o teste de normalidade nos dados (Shapiro Wilk), nos casos onde os dados não seguem uma distribuição normal foi aplicado um teste não-paramétrico de comparação, o teste de Kruskal-Wallis. E nos dados onde os dados seguem uma distribuição normal, foi utilizado o teste Tukey, também foram aplicados testes de comparação múltipla (Kruskal-Wallis) para verificar se os resultados das variáveis Área Branca e Área Vermelha podem ser considerados diferentes por grupos e por momentos. Para análise da dimensão fractal foi aplicado o teste de normalidade dos dados (Shapiro Wilk), que obteve p-value menor que 0,01, portanto, foi constatado que os dados não seguem uma distribuição normal. Sendo assim, foi necessário aplicar um teste não-paramétrico para comparar os 4 grupos, o teste de Kruskal-Wallis.

## Resultados

Na avaliação morfológica, as variáveis sensibilidade dolorosa, cor, edema e úlcera se comportaram de forma diferente ( $p < 0,01$ ) entre os grupos e entre momentos. A evolução do processo de cicatrização das feridas nos diferentes grupos pode ser observada na Figura 3.

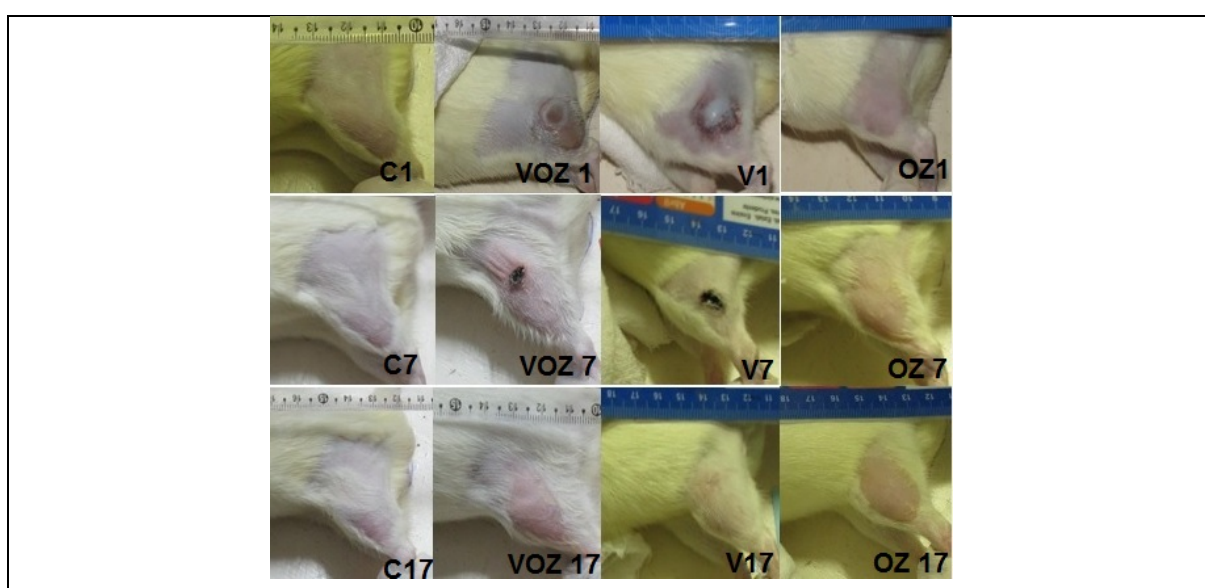


Figura 3. Imagens macroscópicas das lesões no membro posterior esquerdo de ratos inoculados com veneno laquéutico na dose de 1mg/Kg nos dias 1, 7 e 17 nos

grupos controle (C1, C7, C17); veneno+óleo de girassol ozonizado (VOZ 1, VOZ 7, VOZ 17); grupo veneno (V1, V7, V17); grupo óleo de girassol ozonizado (OZ1, OZ7, OZ17).

O grupo V foi o que apresentou maior sensibilidade dolorosa entre os grupos (50%), seguido do VOZ (23%) e OZ (7,8%), já o grupo C foi o único a apresentar 100% de ausência de sensibilidade dolorosa. Avaliando por momentos, observou-se no primeiro dia 50% de sensibilidade dolorosa, chegando a quase 0% no dia 13 (Figura 4).

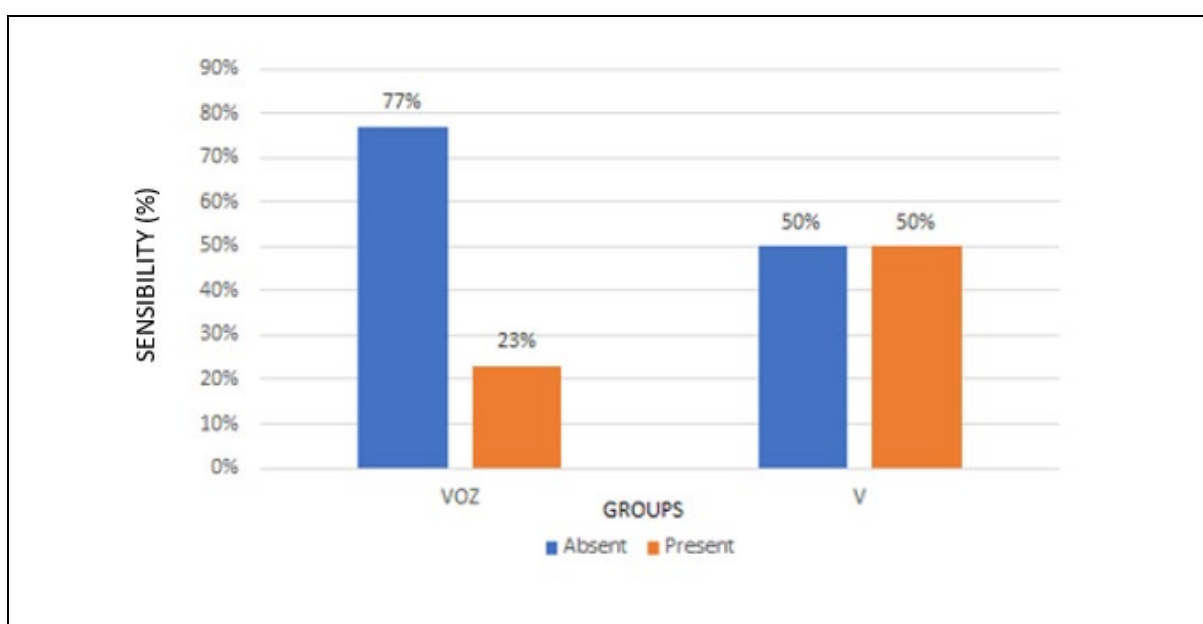


Figura 4. Análise morfológica da porcentagem de sensibilidade dolorosa no membro de rato inoculado com veneno laquétrico na dose de 1mg/Kg, comparação entre grupos C (controle), VOZ (veneno + óleo ozonizado), V (veneno).

A coloração rósea do membro no local da inoculação do veneno predominou nos animais de todos os grupos, no entanto, coloração cianótica foi observada em maior porcentagem dos animais do grupo V (22%) seguido do VOZ (17%), além de palidez em 8% dos animais do grupo V. A coloração cianótica foi presente nos três primeiros dias com 48%, 28% e 13% dia respectivamente, enquanto que a coloração pálida foi presente nos dias 2 (5%) e 3 (13%) (Figura 5).

A presença de edema se deu em 28% dos animais no grupo VOZ, 19% do grupo V e ausente nos demais com presença de 50% nos primeiros sete dias, seguido de redução significativa ( $p < 0,01$ ) no M10 (Figura 5).

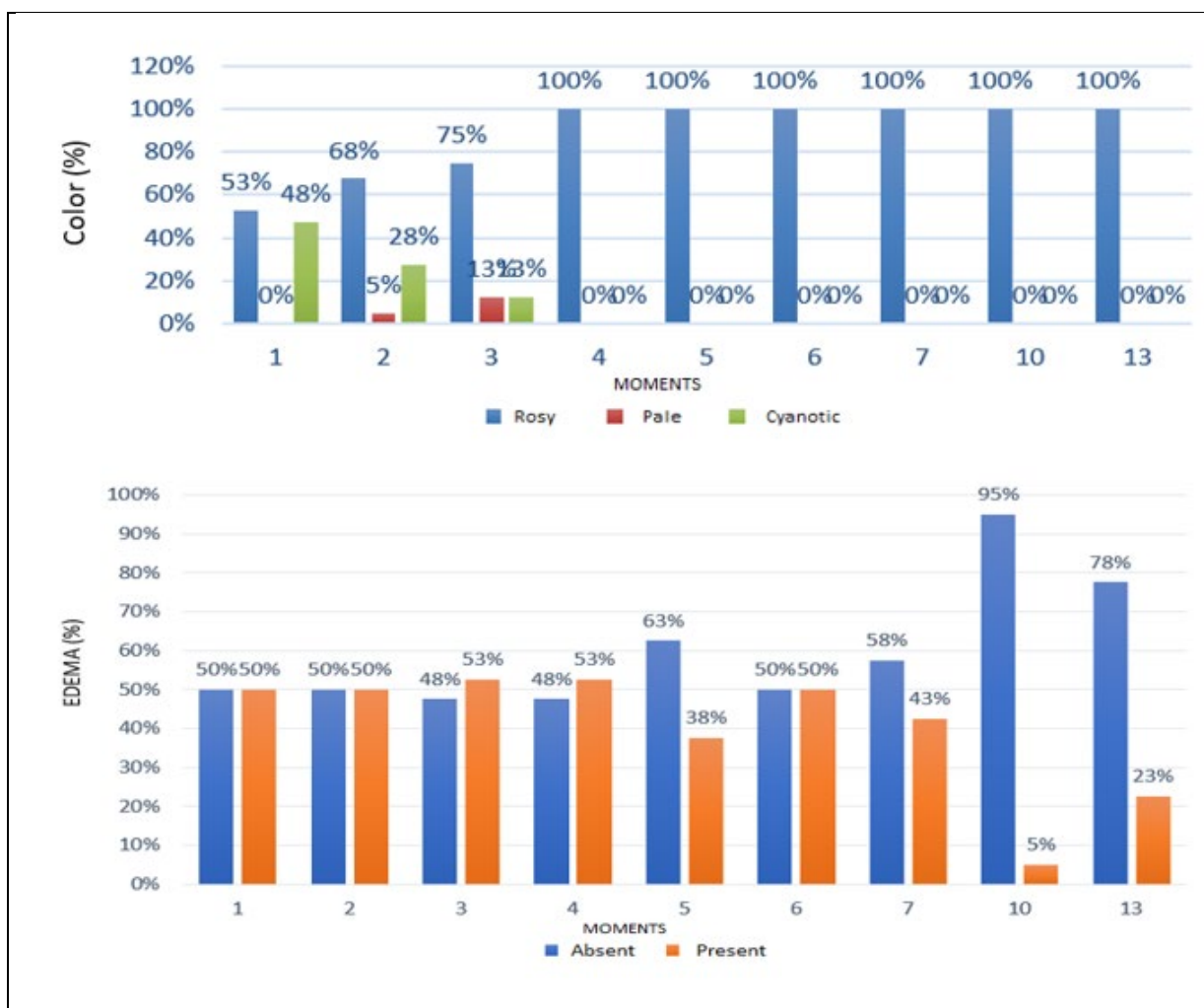


Figura 5. Análise morfológica da coloração e edema no membro inoculado, comparação entre grupos C (controle), VOZ (veneno + óleo ozonizado), V (veneno) e OZ (óleo ozonizado) nos momentos 1 ao 7, 10 e 13.

A formação de úlceras no membro inoculado foi presente em 60% no grupo V, 50% no VOZ, e 1% OZ. Porém quando avaliadas por momentos a ulceração esteve presente em todos os momentos de avaliação com maior porcentagem (45%) nos dias 6 e 7 (Figura 6).

Na análise morfológica, os animais do grupo V apresentaram a maior incidência de necrose (70%), seguido do grupo VOZ (30%), desde o primeiro dia até o quarto dia de avaliação (Figura 6).

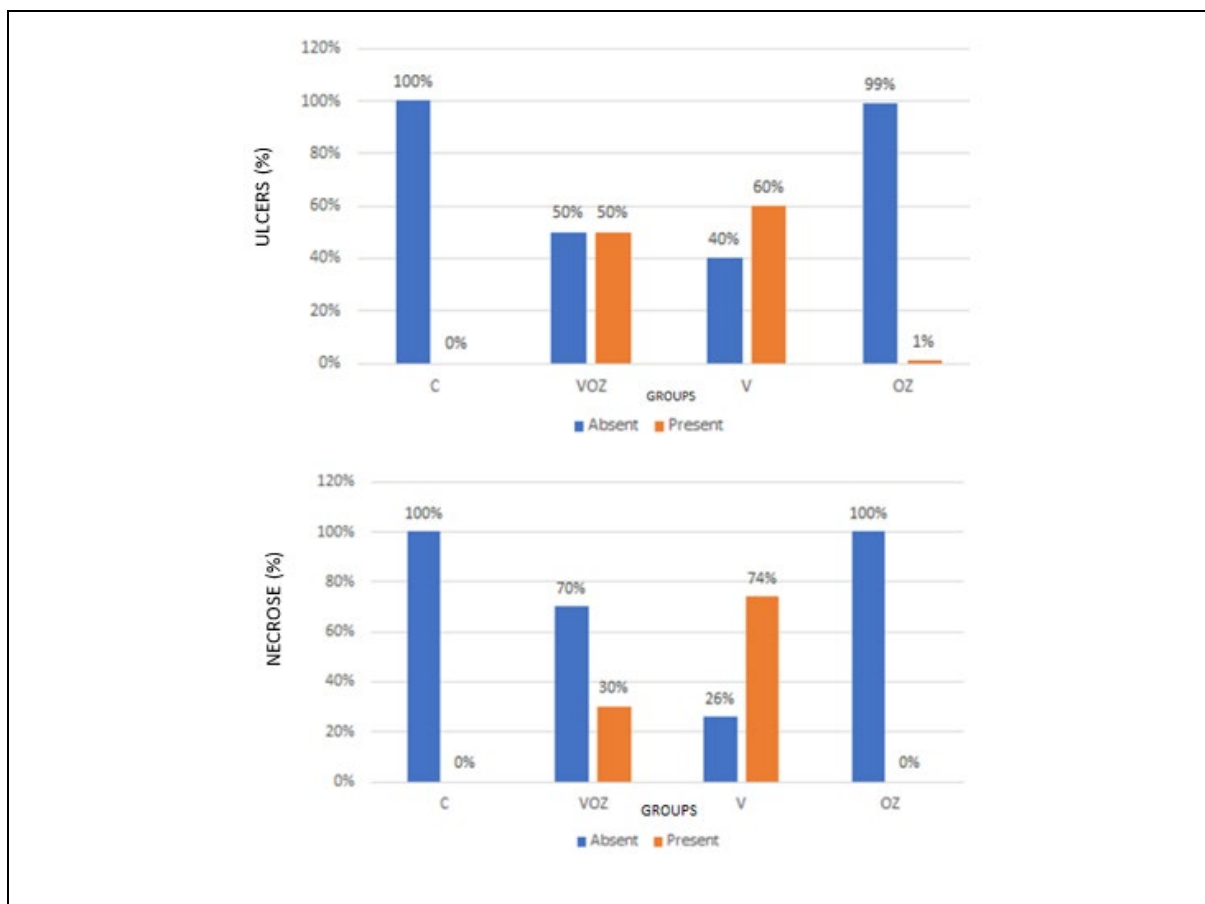


Figura 6. Análise morfológica da úlcera e necrose no membro inoculado, comparação entre grupos C (controle), VOZ (veneno + óleo ozonizado), V (veneno) e OZ (óleo ozonizado).

Na avaliação termográfica no dia 2 houve queda significativa ( $p < 0,01$ ) na média da temperatura local do membro inoculado (Figura 7) e na área branca e vermelha dos animais dos grupos V ( $34,9^{\circ}\text{C}$ ) e VOZ ( $34,8^{\circ}\text{C}$ ) sendo a média mais baixa de todos os momentos (Figura 7). A área da lesão foi menor



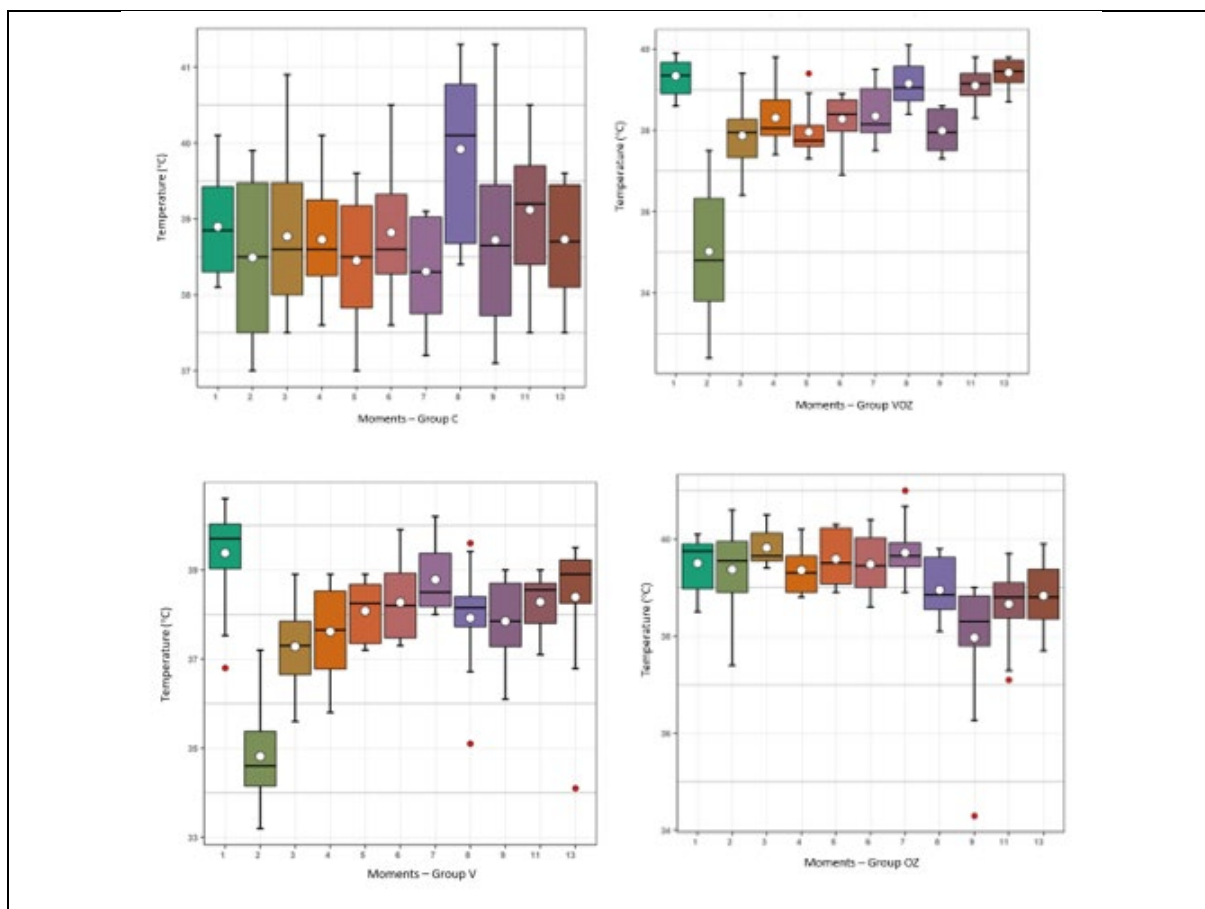


Figura 7. Gráfico das médias da temperatura no exame de termografia, comparação entre momentos nos diferentes grupos C (controle), VOZ (veneno + óleo ozonizado), V (veneno) e OZ (óleo ozonizado), nos dias 1 ao 9, dia 11 e dia 13.

Na análise histológica as variáveis, infiltrado mononuclear, infiltrado polimorfonuclear, fibroblastos e necrose diferiram de maneira significativa ( $p < 0,01$ ). As demais variáveis, neovascularização, tecido conjuntivo e edema não diferiram entre grupos.

No grupo VOZ foi presente 70% de infiltrado mononuclear moderado, e 20% acentuado e 10% discreto; grupo V 40% moderado, 30% acentuado e 30% discreto; grupos C e OZ foi de ausente a discreto. O infiltrado polimorfonuclear no grupo VOZ foi 60% discreto, 20% moderado e 10% acentuado; no grupo V 40% acentuado, 30% moderado e 20% discreto. A presença de fibroblastos foi de 70% moderado, 20% discreto e 10% acentuado no VOZ e no V 30% moderado e 70% acentuado. Para necrose no VOZ foi 40% moderado, 30% discreto e 20% acentuado; no V 60% moderado, 20% acentuado e 20% discreto (Figura 8).

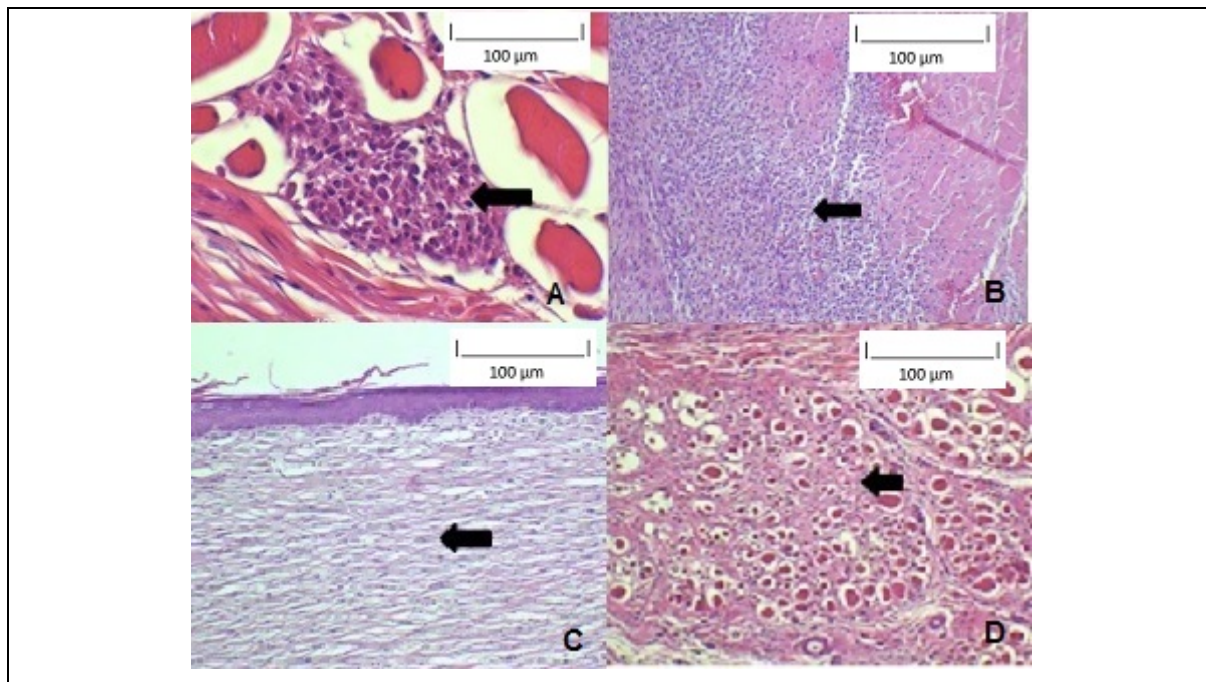


Figura 8. Fotomicroscopia de algumas alterações encontradas no tecido muscular no membro inoculado dos animais dos diferentes grupos no dia 17. A-Animal do grupo VOZ indicando na seta intenso infiltrado inflamatório mononuclear (Objetiva de 40x); B-grupo V, indicando na seta intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear (Objetiva de 10x).; C-grupo V, indocando na seta presença de fibroblastos (Objetiva de 10x).; D-grupo VOZ, indicando na seta necrose em camada muscular indicado pela seta (Objetiva de 10X).

Os resultados da dimensão fractal para o colágeno analisadas pela coloração de Tricômio de Masson, indicaram que o grupo controle diferiu ( $p < 0,01$ ) dos demais grupos e houve semelhança estatística entre os grupos V e OZ, já os grupos C e VOZ são diferentes entre si, e entre os grupos V e OZ, sendo o V com maior média entre os grupos (Figura 9).

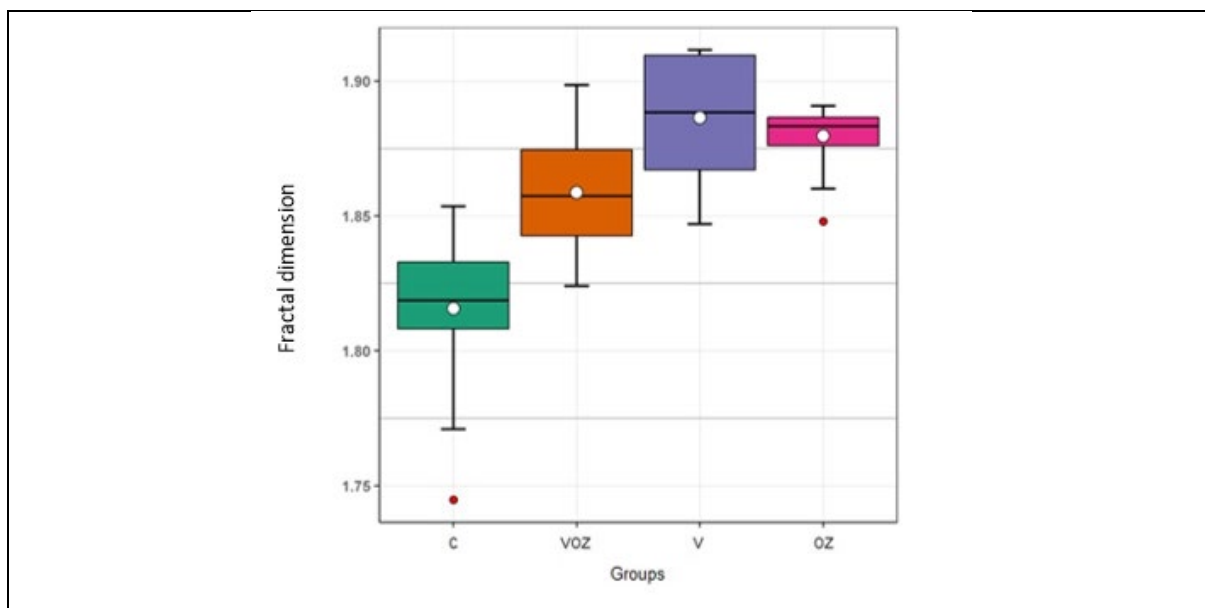


Figura 9. Análise da dimensão fractal para o colágeno dos grupos C (controle), VOZ (veneno + óleo ozonizado), V (veneno), OZ (óleo ozonizado) no dia 17.

## Discussão

Embora a reação inflamatória seja importante para o organismo quando se trata de proteção a patógenos e a reparação do tecido danificado, ela apresenta mecanismos que causam desconfortos físicos, conhecidos também como sinais cardinais do processo inflamatório como o aumento da temperatura, rubor, dor e edema<sup>47,48</sup>. O veneno da *Lachesis muta muta* tem grave efeito local e sistêmico e a maioria dos autores utilizam a dose de 1,5 mg/Kg nos estudos experimentais<sup>7</sup>, diferente da dose usada no atual estudo de 1mg/Kg, mas que induziu efeitos locais severos de dor, edema e necrose e sem ocorrência de óbito o que favoreceu o estudo a longo prazo (17 dias). O antiveneno é a única terapia eficaz para o acidente ofídico, no entanto ele possui uma fraca ação sobre os efeitos locais<sup>1</sup> e na literatura, não há estudos sobre os efeitos do óleo ozonizado em feridas dessa natureza.

De acordo com alguns autores, o ozônio pode reagir com os componentes do sangue afetando o metabolismo do oxigênio, o sistema de defesa antioxidante, a energia celular e a microcirculação, ativar a expressão de citocinas importantes para a cicatrização de feridas, aumentar a perfusão sanguínea, induzir a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)<sup>49</sup>.

Nos animais do grupo VOZ a diminuição da sensibilidade dolorosa no membro pode ser atribuída ao óleo de girassol ozonizado uma vez que os animais tratados somente com veneno e antiveneno manifestaram maior porcentagem de dor. Esta ação atribuída ao óleo ozonizado foi descrita em pacientes com herpes zoster<sup>50</sup> e na estomatite aftosa recorrente<sup>51</sup>, no entanto, Travagli et al (2009) é quem descreve que semelhante a ação do ácido hialurônico, muito provavelmente quando ozônio entra em contato com a ferida ele se dissocia lentamente em vários peróxidos produzindo peróxido de hidrogênio explicando esta atividade específica do óleo ozonizado<sup>52</sup>.

De acordo com os achados morfológicos houve predominância de coloração rósea, menor formação de úlceras e menor porcentagem de necrose nos animais do grupo VOZ comparado aos do grupo V. A presença significativa de edema nos grupos VOZ e V só pôde ser observada na análise morfométrica e se justifica pela ação direta do veneno<sup>16</sup>.

Aos 17 dias, houve menor infiltrado inflamatório para o VOZ comparado ao V e predominou infiltrado inflamatório mononuclear para o VOZ e infiltrado inflamatório polimorfonuclear para o grupo V. O processo inflamatório se inicia com células polimorfonucleares e posteriormente se torna mononuclear, sendo importante para o processo cicatricial, porém quando ocorre uma inflamação contínua isso pode prejudicar a cicatrização<sup>47,53</sup>. A necrose local é um dos sinais clínicos conhecido no acidente laquéico<sup>12,13,14,6,7</sup> e ela ocorre pela ação direta das suas toxinas nos tecidos por ação das serinoproteinases (SVSP), metaloproteinases (SVMP), L-aminoácido oxidase (LAAO), fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e hialuronidase<sup>16,54</sup>. Recentemente um estudo demonstra que o veneno de *L. muta muta* induz a morte dos queratinócitos por apoptose e necrose, que não podem ser separadas temporalmente. No entanto, a proporção de células apoptóticas é maior do que de células necróticas, sugerindo que a apoptose pode ser a forma predominante de morte celular<sup>54</sup>.

Nossos dados corroboram com os achados de alguns autores, onde os pesquisadores observaram que o óleo ozonizado contribui para reduzir a resposta inflamatória, podendo assim reduzir a ulceração e necrose, o que ocorre devido a ação bactericida, fungicida, e antiviral do ozônio, e seus efeitos de modulação da fase inflamatória, estimulação da angiogênese e reações biológicas e enzimáticas que auxiliam no metabolismo do oxigênio<sup>39,28,53,57,48</sup>.

O processo de cicatrização tem diferentes fases e nos primeiros dois dias, fase inflamatória, diferentes células, neutrófilos, monócitos e linfócitos regulam o

processo inflamatório. Após a fase inflamatória, ou seja, nas próximas duas a três semanas, na fase da reparação do tecido conjuntivo e epitélio ocorre a fase proliferativa com uma desaceleração dos processos ativados e proliferação de fibroblastos. Nesta fase de fibroplasia os fibroblastos iniciam a síntese de glicosaminoglicanos e fibras colágenas tipos III e I, em seguida os fibroblastos ativados e diferenciados em miofibroblastos promovem a contração da lesão e o colágeno tipo I se intensifica, os feixes de fibras colágenas ficam mais espessas, a maioria das células desaparece e ocorre a apoptose de fibroblastos (fase de remodelação)<sup>39,56</sup>.

No estudo de Xiao, et al. (2017), os pesquisadores observaram que o óleo ozonizado promoveu supressão da inflamação e acelerou a cicatrização por ativação e migração de fibroblastos gradualmente ao longo do tempo durante a fase inicial da cicatrização através da transição epitélio-mesenquimal (epitelial-mesenchymal transition-EMT) , ou seja o óleo ozonizado acelerou o processo de fibroblasto EMT por meio da regulação positiva das proteínas mesenquimais e diminuição das proteínas epiteliais<sup>53</sup>.

No atual estudo, na análise de colágeno realizada pela dimensão fractal, com a coloração de Tricômio de Masson no dia 17 observou-se maior FD para o grupo V, seguido do VOZ e OZ, ordem que também aparece na avaliação de fibroblastos. De acordo com os achados, podemos dizer na comparação entre os grupos que em ordem decrescente de cicatrização o grupo OZ, por apresentar menor porcentagem de presença de fibroblastos e colágeno se encontrava aos 17 dias em fase mais adiantada no processo de cicatrização, seguido do grupo VOZ e V.

Kim et al., 2009 observaram em porquinho da índia elevado número de fibras colágenas no grupo óleo de oliva ozonizado quando comparado com outros grupos<sup>39</sup>. Autores relataram que em camundongos tratados com óleo de gergelim ozonizado, apresentaram cicatrização mais rápida, e que através da coloração de picosirius pode quantificar as fibras colágenas tipo I e III predominando aos 14 dias o colágeno tipo III <sup>57,58</sup>. Estudo em ratos, onde foi induzido queimaduras com laser de CO<sub>2</sub> relatam que as lesões tratadas com o óleo de girassol ozonizado reduziram tiveram maior redução na análise macroscópica<sup>59</sup>. O atual estudo apresenta como limitação a não avaliação dos tipos e qualidade das fibras colágenas pela coloração de picosirius o que seria de fundamental importância.

A injúria tecidual inicialmente causa vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo e causando hiperemia, porém como consequência o sangue se torna mais viscoso e a circulação mais lenta, levando a uma hipóxia local que pode ocasionar aparecimento de trombos, diminuindo assim a temperatura local<sup>47</sup>. Este efeito fisiológico associado a ação necrosante direta local do veneno laquétrico fez com que houvesse uma diminuição significativa da temperatura observada por meio da termografia no membro inoculado no dia 2 para os animais dos grupos V e VOZ e uma redução da área (mm<sup>2</sup>) tanto da área branca quanto da vermelha, no grupo V. Lembramos que os animais foram aclimatados com 5 dias de antecedência e a sala se manteve em todas as avaliações na mesma temperatura (22°C ±2). Silva et al, (2020) relataram em equinos que o uso da ozonioterapia injetável reduziu a temperatura em aproximadamente 2 graus após o tratamento completo<sup>60</sup>. No atual estudo, utilizamos o ozônio via tópica e observamos queda na temperatura de ambos os grupos com o veneno e não observamos no grupo OZ, acreditamos que a procedência deste achado seja o efeito do veneno, já que conhecidamente ele causa graves efeitos locais<sup>7</sup>.

Autores relatam que a tecnologia de termografia infravermelha prospectiva (FLIR) é um método promissor como um complemento às modalidades de imagem atuais, mas requer mais estudos para comparação<sup>61</sup>. Outros autores relatam que seu uso na medicina veterinária deve ser mais explorado para acompanhamento de processos inflamatórios<sup>62</sup> e por ser um método não invasivo, indolor, não necessitando do uso de sedativos e por não emitir radiação ionizante<sup>63,64</sup>. As limitações do estudo atual com relação a avaliação termográfica incluem o tamanho pequeno da amostra e a falta de comparação com outra metodologia como por exemplo o ultrassom com doppler, desta forma, sugerimos que outros estudos sejam realizados com maior número de animais, comparando os dados da termografia com outra metodologia.

Conclui-se que na avaliação local do membro inoculado com o veneno de *Lachesis muta muta*, a dose de 1mg/Kg causou severos efeitos locais, o óleo de girassol ozonizado favoreceu a cicatrização das feridas induzidas pelo veneno e o mesmo não causou nenhum efeito adverso local.

#### **Declaração de conflito de interesse**

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

**Aprovação Ética**

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade (protocolo nº 5612)

**Agradecimentos**

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001”.

## Referências

1. Gutiérrez JM, Burnouf T, Harrison RA, et al. A multicomponent strategy to improve the availability of antivenom for treating snakebite envenoming. *Bull World Health Organ.* 2014;92(7):526–32.
2. Arnold C. Vipers, mambas e taipans: a escalada da crise de saúde por causa das picadas de cobra. *Nature.* 2016;537(7618):26–8.
3. Chippaux JP. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(6):e0005662.
4. Mediavilla, D. O mundo se une contra as picadas de cobra, outra grande doença mortal. *El País Brasil*, 29 mai 2018. Disponível em: <[https://brasil.elpais.com/brasil/2018/05/24/politica/1527179251\\_016445.html](https://brasil.elpais.com/brasil/2018/05/24/politica/1527179251_016445.html)> Acesso em: 01 out. 2018.
5. WHO. Neglected tropical diseases. World Health Organization. Disponível em: < [www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en)> Acesso em: 05 de novembro de 2020.
6. Blanco BS; Melo MM; Cadernos Técnicos de Medicina Veterinária e Zootecnia-Animais peçonhentos. Vol. 75, Centro de extensão de escola de veterinária da UFMG. 2014. 9–12 p.
7. De Lima PHS, Junior VH. A snakebite caused by a bushmaster (*Lachesis muta*): Report of a confirmed case in state of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(5):636–7.
8. Ministério da Saúde (Distrito Federal - Brasil). Óbitos por Animais Peçonhentos Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas. 2000 a 2017. 2018.
9. Machado C. Acidentes ofídicos no Brasil: da assistência no município do Rio de Janeiro ao controle da saúde animal em instituto produtor de soro antiofídico. 2018; Available from: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/27452>
10. Estrada-Gómez S, Quintana Castillo JC, Vargas Muñoz LJ. Accidente ofídico en animales de pastoreo: acercamiento epidemiológico, clínico y de manejo. *Rev Med Vet (Bogotá).* 2014;(27):149.



11. Cintra CA, Júnior DP, Dias LGGG, et al. Acidentes ofídicos em animais domésticos. Enciclopédia Biosf [Internet]. 2014;10(18):58–71. Available from: [https://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/AGRARIAS/Acidentes\\_ofidicos.pdf](https://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/AGRARIAS/Acidentes_ofidicos.pdf)
12. Moreno E, Queiroz-andrade M, Lira-da-silva RM, et al. Características clínicoepidemiológicas dos acidentes ofídicos em Rio Branco , Acre Clinical and epidemiological characteristics of snakebites in Rio Branco , Acre. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(1):15–21.
13. Damico DCS, Bueno LGF, Rodrigues-Simioni L, et al. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. *Toxicon*. 2005;46(2):222–9.
14. Pardal PPDO, Bezerra IS, Rodrigues LDS, et al. Acidentes por surucucu em Belém-Pará: Relato de caso. *Rev Para Med*. 2007;21(1):37–42.
15. Mise YF, Lira-da-Silva RM, Carvalho FM. Time to treatment and severity of snake envenoming in Brazil. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal*. 2018;42:1–6.
16. Libia Sanz, José Escolano, Massimo Ferretti, et al. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. *J Proteomics*. 2008;71(1):46–60.
17. Wiezel GA, Bordon KCF, Silva RR, et al. Subproteome of *Lachesis muta rhombeata* venom and preliminary studies on LmrSP-4, a novel snake venom serine proteinase. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2019;25(October 2018):1–15.
18. Waldez F, Vogt RC. Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio. *Acta Amaz*. 2009;39(3):681–92.
19. Domingos TFS, Ortiz-Ramírez FA, Villaça RC, et al. Inhibitory effect of a Brazilian marine brown alga *Spatoglossum schröderi* on biological activities of *Lachesis muta* snake venom. *Brazilian J Pharmacogn*. 2012;22(4):741–7.
20. Albuquerque PLMM, Silva Junior GB, Jacinto CN, et al. Perfil epidemiológico dos acidentes por picada de cobra em região metropolitana do nordeste do Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55(5):347–51.
21. Colombini M, Fernandes I, Cardoso DF. *Lachesis muta muta* venom:

- immunological differences compared with Bothrops atrox venom and importance of specific antivenom therapy. *Toxicon*. 2001;39:711–9.
22. Ministério da Saúde (Distrito Federal - Brasil). Portaria nº 702, de 21 de março de 2018 Portaria de Consolidação nº 2/GM/MS. Diário Oficial da União. 2018;
23. Franzini M, Bignamini A, Micheletti P, et al. Terapia de oxigênio-ozônio subcutânea em hipodermatite indurativa e em lipodistrofias localizadas: Um estudo clínico de eficácia e tolerabilidade. *Acta Toxicol Ther*. 1993;14:273–88.
24. Wu Z, Wei LX, Li J, et al. Tratamento percutâneo de hérnia de disco lombar não contida por injeção de oxigênio-ozônio combinado com colagenase. *Eur J Radiol*. 2009;72:499–504.
25. Murphy K, Elias G, Steppan J, et al. Percutaneous treatment of herniated lumbar discs with ozone: Investigation of the mechanisms of action. *J Vasc Interv Radiol*. 2016;27:1242-50.
26. Barbosa DC; Ângelos JS dos; Macena GMJ de; et al. Effects of ozone on the pain and disability in patients with failed back surgery syndrome. *Rev Assoc Médica Bras*. 2017;63(4):355–60.
27. Anzolin AP, Bertol CD. Ozone therapy as an integrating therapeutic in osteoarthritis treatment: a systematic review. *Brazilian J Pain*. 2018;1(2):171–5.
28. Bocci V, Zanardi I T V. Oxygen / ozone as a medical gas mix. Uma avaliação crítica dos vários métodos esclarece os aspectos positivos e negativos. *Med Gas Res*. 2011;1:1–15.
29. Schwartz A. Ozonoterapia na infecção recorrente por Candida Albicans vulvo-vaginal. 1º Congr Nac e Int Ozônio Ter Istanbul- Turquia. 2009;
30. Cardoso CC, Dias Filho E, Pichara NL, et al. Ozonoterapia como tratamento adjuvante na ferida de pé diabético. *Rev Assoc Med Minas Gerais*. 2010; 20: 442-445.
31. Song M, Zeng Q, Xiang Y, et al. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. *Molecular Medicine Reports*. 2018;17: 2449–55.
32. Chagas NTC, Rocha CLR, Silva RBT, et al. Tratamento de ferida em Coendou prehensilis (Rodentia: Erethizontidae) com laserterapia e ozonioterapia: relato de caso. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec*. 2019;71(3):953–8.
33. Smith C, Lynch E, Baysan A, et al. Consumo oxidativo de biomoléculas de

- cárie radicular por um novo sistema de distribuição de ozônio antibacteriano. *J Dent Res*. 2001;80:1178.
34. Di Paolo N, Bocci V, Salvo DP, et al. Oxigenação e ozonização do sangue extracorpóreo (EBOO): um ensaio controlado em pacientes com doença arterial periférica. *Int J Artif Organs*. 2005;28:1039–50.
35. Tasdoven GE; Derin AT; Yaprak N; et al; The place of hyperbaric oxygen therapy and ozone therapy in sudden hearing loss. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2016;83(4): 457-63.
36. OLIVEIRA JTCD. Revisão sistemática de literatura sobre o uso terapêutico do ozônio em feridas. PROESA- São Paulo; 2007.
37. TERESA, B.; WOLANSKA, E.; CIESZKO-BUK, et al. Practical use of ozone in dentistry-comments. *Ann Univ Maria Curie-Sklodowska Lubin-Polonia*. 2008;63(28).
38. Martinez-Sanchez G, Al-Dalain SM, Menendez S, et al. Eficácia terapêutica do ozônio em pacientes com pé diabético. *Eur J Pharmacol*. 2005; 523: 151- 61.
39. Kim HS, Noh SU, Han YW, et al. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J Korean Med Sci*. 2009;24(3):368–74.
40. BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa 33 de 18 de novembro de 2016. Baixa o Capítulo "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. *Diário Oficial da União* de 21/11/2016, Seção I, Pág.05. Disponível em:  
[http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes\\_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-33-de-18.11.2016-D.O.U.-de-21.11.2016-Secao-I-Pag.-05.pdf](http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-CONCEA-n-33-de-18.11.2016-D.O.U.-de-21.11.2016-Secao-I-Pag.-05.pdf). Acesso em: 06/11/2020.
41. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*. 2010;8(6):1-5.

42. Abegão KGB, Bracale BN, Delfim IG, et al. Effects of heterologous platelet-rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2015;30(3):209-15.
43. Barrionuevo DV, Laposy CB, Abegão KGB, et al. Comparison of experimentally-induced wounds in rabbits treated with diferente sources of platelet-rich plasma. *Laboratory Animals*. 2015;49(3):209-14.
44. BIANCHINI E. Matemática, obra em 4 v. para alunos de 6° ao 9° ano. 6 ed. 2006.
45. Remie, R. Anesthesia in Laboratory Animals. In\_\_ANDERSEN, M.L.; TUFIK, S. Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research. 2010:417-27.
46. Garcia TA, Tamura Ozaki GA, Castoldi RC, et al. Fractal dimension in the evaluation of different treatments of muscular injury in rats. *Tissue Cell*. 2018;54:120–6.
47. Pereira FEL. Inflamações. In: Bogliolo, Patologia Geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p. 82–95.
48. Anzolin A, Da Silveira-Kaross N, Bertol C. Ozonated oil in wound healing: What has already been proven? *Med Gas Res*. 2020;10(1):54–9.
49. Bialoszewski D, Kowalewski M. Superficially, longer, intermittent ozone therapy in the treatment of the chronic, infected wounds. *Ortop Traumatol Rehabil*. 2003;5:652-658
50. Huang J, Huang J, Xiang Y, et al. Topical ozone therapy: na innovative solution to patients with herpes zoster. *J Cent South Univ*. 2018;43(2):168-72.
51. DHARMAVARAM AT, REDDY RS, NALLAKUNTA R. “Ozone”-Yhe new Nemesis of Canker sore. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(3):1-4.
52. Travagli V, Zanardi I, Bocci V. Topical applications of ozone and ozonated oils as anti-infective agents: an insight into the patent claims. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2009;4:130-142
53. Xiao W, Tang H, Wu M, et al. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Biosci Rep*. 2017;37(6):1–11.
54. Stransky S, Costal-oliveira F, Lopes de souza L, et al. In vitro assessment of cytotoxic activities of Lachesis muta muta snake venom. *PloS Negl Trop Dis*. 2018,12(4):1-17.
55. Zeng J, Lu J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin

- diseases. *Int Immunopharmacol*. 2018;56(138):235–41.
56. Oliveira e Dias. Wound healing: stages and influencing factors. *Acta Veterinaria Brasilica*. 2012;6(4):267-271.
57. Valacchi G, Zanardi I, Lim Y, et al. Ozonated oils as functional dermatological matrices: Effects on the wound healing process using SKH1 mice. *Int J Pharm*. 2013;458(1):65–73.
58. Costa GM, Araujo SL, Xavier FAF, et al. Picrosirius red and Masson's trichrome staining techniques as tools for detection of collagen fibers in the skin of dogs with endocrine dermatopathologies. *Cienc Anim Bras*. 2019;20:1–10.
59. Melo MS, Alves LP, Carvalho HC, et al. Ozonioterapia Em Queimaduras Induzidas Por Laser De Co2 Em Pele De Ratos. *XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica* . 2014
60. Silva LKX, Martorano LG, Silva WC da, et al. Uso associado da termografia por infravermelho e ozonioterapia para diagnóstico e tratamento de um processo inflamatório em equino: relato de caso. *Pubvet*. 2020;14(3):1–9.
61. Xue EY, Chandler LK, Viviano SL, et al. Use of FLIR ONE smartphone thermography in burn wound assesement. *Ann Plast Surg*, 2018,80(4):236-8.
62. Meireles A, Cruz T, Pereira L, et al. Termografia Infravermelha E Sua Possibilidade De Uso Como Ferramenta Auxiliar Na Avaliação Do Processo Inflamatório Em Modelo Animal. 14<sup>o</sup> Congr Soc Lat Am Biomateriais, Órgãos Artif e Eng Tecidos- SLABO. 2017;905–12.
63. Roberto JVB, Souza BB. Utilização da Termografia de Infravermelho na Medicina Veterinária e na Produção Animal. *J Anim Behav Biometeorol*. 2014;2(3):73–84.
64. Ferreira KD, Filho SHA, Bertolino JF, et al. Termografia por infravermelho em medicina veterinária. *Enciclopédia Biosfera*. 2016;13(23):1299-1313.

## ANEXO A – APROVAÇÃO ÉTICA

17/11/2020

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 "OZONOTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO DE FERIDAS INDUZIDAS PELO VENENO DE LACHESIS MUTA EM RATOS WISTAR", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 2487 e tendo como participante(s) GABRIELA HARO DE MELO (discente), LUARA EVANGELISTA SILVA (discente), CARINA VIVIAN PIRES (discente), LAIS MAYUMI OSHIRO (discente), DIOGO SANTOS DA SILVA (participante externo), CECILIA LAPOSY SANTAREM (discente), ELISANGELA OLEGÁRIO DA SILVA (discente), RAFAEL STUANI FLORIANO (discente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO 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 de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 07/08/2019.

Vigência do projeto: 05/2019 a 06/2021.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	ANIMAL VIVO				Origem
		Peso	Idade	Sexo		
rato	140	250 gramas	60 dias	M	Biotério Unoeste	

Presidente Prudente, 8 de Agosto de 2019.

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

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - CPDI - 18 3208-2078 - cpdi@unoeste.br  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 18 3208-2078 - cep@unoeste.br  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - 18 3229-2079 - ceua@unoeste.br

validar este documento em [www.anoeste.br/peic](http://www.anoeste.br/peic) informando o código de segurança 44820818176207646881519179717c

## ANEXO B - NORMAS DA REVISTA

Manuscript Submission Guidelines:

### Manuscript Submission Guidelines: *Human and Experimental Toxicology*

This Journal is a member of the [Committee on Publication Ethics](#).

This Journal recommends that authors follow the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) formulated by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

**Please read the guidelines below then visit the Journal's submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/het> to upload your manuscript. Please note that manuscripts not conforming to these guidelines may be returned.**

Only manuscripts of sufficient quality that meet the aims and scope of *Human and Experimental Toxicology* will be reviewed.

There are no fees payable to submit or publish in this journal.

As part of the submission process you will be required to warrant that you are submitting your original work, that you have the rights in the work, that you are submitting the work for first publication in the Journal and that it is not being considered for publication elsewhere and has not already been published elsewhere, and that you have obtained and can supply all necessary permissions for the reproduction of any copyright works not owned by you.

If you have any questions about publishing with SAGE, please visit the [SAGE Journal Solutions Portal](#)

1. [What do we publish?](#)
  - 1.1 [Aims & Scope](#)
  - 1.2 [Article types](#)
  - 1.3 [Writing your paper](#)
2. [Editorial policies](#)
  - 2.1 [Peer review policy](#)
  - 2.2 [Authorship](#)

- 2.3 [Acknowledgements](#)
- 2.4 [Funding](#)
- 2.5 [Declaration of conflicting interests](#)
- 2.6 [Research ethics and patient consent](#)
- 2.7 [Clinical trials](#)
- 2.8 [Reporting guidelines](#)
- 2.9 [Data](#)
- 3. [Publishing policies](#)
  - 3.1 [Publication ethics](#)
  - 3.2 [Contributor's publishing agreement](#)
  - 3.3 [Open access and author archiving](#)
- 4. [Preparing your manuscript](#)
  - 4.1 [Formatting](#)
  - 4.2 [Artwork, figures and other graphics](#)
  - 4.3 [Supplementary material](#)
  - 4.4 [Reference style](#)
  - 4.5 [English language editing services](#)
- 5. [Submitting your manuscript](#)
  - 5.1 [ORCID](#)
  - 5.2 [Information required for completing your submission](#)
  - 5.3 [Permissions](#)
- 6. [On acceptance and publication](#)
  - 6.1 [SAGE Production](#)
  - 6.2 [Online First publication](#)
  - 6.3 [Access to your published article](#)
  - 6.4 [Promoting your article](#)
- 7. [Further information](#)

## **1. What do we publish?**

### **1.1 Aims & Scope**

Before submitting your manuscript to *Human and Experimental Toxicology*, please ensure you have read the [Aims & Scope](#).

### **1.2 Article Types**



The journal is keen to publish original research and review articles on experimental, clinical and epidemiological studies of functional, biochemical and structural disorders induced by exposure to chemicals or drugs, materials, or for example airborne particles. The journal also publishes papers dealing with exposure of human in e.g. occupational environments, and papers dealing with risk assessment of chemicals or materials.

Please note that reports involving human participants or animals must adhere to the respective legal and ethical guidelines.

HET will not accept papers on herbal extracts unless the chemical composition of the extract has been sufficiently characterized to allow others to reproduce the work reported. The method section of the paper must clearly describe, in sufficient details, the experimental methods to allow others to reproduce the work reported in the paper. HET no longer accepts case studies/reports.

Summary of manuscript structure:

Manuscripts should be typed, double-spaced, on one side of the paper only, and should be structured into sections as follows:

Title page; Summary (abstract) and keywords; Introduction; Methods; Results; Discussion; Acknowledgements (details of supporting grants, permission for reproduction of copyright materials, etc.); References. Each section should begin on a new sheet. Other subsection headings within these main sections may be used but should be limited.

The main title should be explicit and specific (80 character limit) and an abbreviated (running) title (40-50 character limit) should be given.

The summary (abstract) should form a synopsis of the work, at the same time underlining the contribution of the research to the understanding of toxicology; it should be no more than 200 words in length.

Keywords (3-6) must be supplied otherwise the paper cannot be included in the annual index.

Review articles

The editors invite review articles on relevant and current topics in toxicology. Each review should contain a summary, an introduction to the topic, a careful review of the relevant and current literature, conclusions of the reviewed literature and recommendations, if applicable. Both invited and solicited review can be published.

The journal will publish both mini-reviews (about 10 typewritten, double-spaced pages) and full-length, more thorough reviews (not to exceed 50 typewritten, double-spaced pages).

The reviews, either mini-reviews or full-length reviews, should provide a timely view on the topic covered. Figures, figure legends, tables and references are included within the allotted pages. These reviews should follow the reference, figure, figure legend and table system used for original articles published in *Human and Experimental Toxicology*.

### **1.3 Writing your paper**

The SAGE Author Gateway has some general advice and on [how to get published](#), plus links to further resources.

#### **1.3.1 Make your article discoverable**

When writing up your paper, think about how you can make it discoverable. The title, keywords and abstract are key to ensuring readers find your article through search engines such as Google. For information and guidance on how best to title your article, write your abstract and select your keywords, have a look at this page on the Gateway: [How to Help Readers Find Your Article Online](#)

[Back to top](#)

## **2. Editorial policies**

### **2.1 Peer review policy**

*Human and Experimental Toxicology* adheres to a blinded peer review process in which the reviewer's name is withheld from the author unless the reviewer requests a preference for their identity to be revealed.

The Editors' decision in the acceptance of a given paper is final.

As part of the submission process you will be asked to provide the names of peers who could be called upon to review your manuscript. Recommended reviewers should be experts in their fields and should be able to provide an objective assessment of the manuscript. Please be aware of any conflicts of interest when recommending reviewers. Examples of conflicts of interest include (but are not limited to) the below:

- - The reviewer should have no prior knowledge of your submission
  - The reviewer should not have recently collaborated with any of the authors
  - Reviewer nominees from the same institution as any of the authors are not permitted

Please note that the Editors are not obliged to invite/reject any recommended/opposed reviewers to assess your manuscript. **Authors must include 2-3 potential reviewers with current email address or the manuscript will be returned to the authors until such are added.**

## 2.2 Authorship

Papers should only be submitted for consideration once consent is given by all contributing authors. Those submitting papers should carefully check that all those whose work contributed to the paper are acknowledged as contributing authors.

The list of authors should include all those who can legitimately claim authorship. This is all those who:

1.
  1. Made a substantial contribution to the concept or design of the work; or acquisition, analysis or interpretation of data,
  2. Drafted the article or revised it critically for important intellectual content,
  3. Approved the version to be published,
  4. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content.

Authors should meet the conditions of all of the points above. When a large, multicentre group has conducted the work, the group should identify the individuals

who accept direct responsibility for the manuscript. These individuals should fully meet the criteria for authorship.

Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group alone does not constitute authorship, although all contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in the Acknowledgments section. Please refer to the [International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\) authorship guidelines](#) for more information on authorship.

## **2.3 Acknowledgements**

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an Acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, or a department chair who provided only general support.

### **2.3.1 Third party submissions**

Where an individual who is not listed as an author submits a manuscript on behalf of the author(s), a statement must be included in the Acknowledgements section of the manuscript and in the accompanying cover letter. The statements must:

- Disclose this type of editorial assistance – including the individual's name, company and level of input
- Identify any entities that paid for this assistance
- Confirm that the listed authors have authorized the submission of their manuscript via third party and approved any statements or declarations, e.g. conflicting interests, funding, etc.

Where appropriate, SAGE reserves the right to deny consideration to manuscripts submitted by a third party rather than by the authors themselves.

Any acknowledgements should appear first at the end of your article prior to your Declaration of Conflicting Interests (if applicable), any notes and your References.

### **2.3.2 Writing assistance**

Individuals who provided writing assistance, e.g. from a specialist communications company, do not qualify as authors and so should be included in the

Acknowledgements section. Authors must disclose any writing assistance – including the individual's name, company and level of input – and identify the entity that paid for this assistance. It is not necessary to disclose use of language polishing services.

## **2.4 Funding**

*Human and Experimental Toxicology* requires all authors to acknowledge their funding in a consistent fashion under a separate heading. Please visit the [Funding Acknowledgements](#) page on the SAGE Journal Author Gateway to confirm the format of the acknowledgment text in the event of funding, or state that: This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## **2.5 Declaration of conflicting interests**

It is the policy of *Human and Experimental Toxicology* to require a declaration of conflicting interests from all authors enabling a statement to be carried within the paginated pages of all published articles.

Please ensure that a 'Declaration of Conflicting Interests' statement is included at the end of your manuscript, after any acknowledgements and prior to the references. If no conflict exists, please state that 'The Author(s) declare(s) that there is no conflict of interest'. For guidance on conflict of interest statements, please see the ICMJE recommendations [here](#).

## **2.6 Research ethics and patient consent**

Medical research involving human subjects must be conducted according to the [World Medical Association Declaration of Helsinki](#).

Submitted manuscripts should conform to the [ICMJE Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#), and all papers reporting animal and/or human studies must state in the methods section that the relevant Ethics Committee or Institutional Review Board provided (or waived) approval. Please ensure that you have provided the full name and institution of the review committee, in addition to the approval number.

For research articles, authors are also required to state in the methods section whether participants provided informed consent and whether the consent was written or verbal.

Information on informed consent to report individual cases or case series should be included in the manuscript text. A statement is required regarding whether written informed consent for patient information and images to be published was provided by the patient(s) or a legally authorized representative.

Please also refer to the [ICMJE Recommendations for the Protection of Research Participants](#)

All research involving animals submitted for publication must be approved by an ethics committee with oversight of the facility in which the studies were conducted. The journal has adopted the [Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare for Veterinary Journals](#) published by the International Association of Veterinary Editors.

## 2.7 Clinical trials

*Human and Experimental Toxicology* conforms to the [ICMJE requirement](#) that clinical trials are registered in a WHO-approved public trials registry at or before the time of first patient enrolment as a condition of consideration for publication. The trial registry name and URL, and registration number must be included at the end of the abstract.

## 2.8 Reporting guidelines

The relevant [EQUATOR Network](#) reporting guidelines should be followed depending on the type of study. For example, all randomized controlled trials submitted for publication should include a completed [CONSORT](#) flow chart as a cited figure and the completed CONSORT checklist should be uploaded with your submission as a supplementary file. Systematic reviews and meta-analyses should include the completed [PRISMA](#) flow chart as a cited figure and the completed PRISMA checklist should be uploaded with your submission as a supplementary file. The [EQUATOR wizard](#) can help you identify the appropriate guideline.

Other resources can be found at [NLM's Research Reporting Guidelines and Initiatives](#).

## 2.9 Data

SAGE acknowledges the importance of research data availability as an integral part of the research and verification process for academic journal articles.

*Human and Experimental Toxicology* requests all authors submitting any primary data used in their research articles to be published in the online version of the journal, or provide detailed information in their articles on how the data can be obtained. This information should include links to third-party data repositories or detailed contact information for third-party data sources. Data available only on an author-maintained website will need to be loaded onto either the journal's platform or a third-party platform to ensure continuing accessibility.

Examples of data types include but are not limited to statistical data files, replication code, text files, audio files, images, videos, appendices, and additional charts and graphs necessary to understand the original research. The editor(s) may consider limited embargoes on proprietary data. The editor(s) can also grant exceptions for data that cannot legally or ethically be released. All data submitted should comply with Institutional or Ethical Review Board requirements and applicable government regulations. For further information, please contact the editorial office.

[Back to top](#)

### **3. Publishing Policies**

#### **3.1 Publication ethics**

SAGE is committed to upholding the integrity of the academic record. We encourage authors to refer to the Committee on Publication Ethics' [International Standards for Authors](#) and view the Publication Ethics page on the [SAGE Author Gateway](#).

##### **3.1.1 Plagiarism**

*Human and Experimental Toxicology* and SAGE take issues of copyright infringement, plagiarism or other breaches of best practice in publication very seriously. We seek to protect the rights of our authors and we always investigate claims of plagiarism or misuse of published articles. Equally, we seek to protect the reputation of the journal against malpractice. Submitted articles may be checked with duplication-checking software. Where an article, for example, is found to have plagiarised other work or included third-party copyright material without permission or

with insufficient acknowledgement, or where the authorship of the article is contested, we reserve the right to take action including, but not limited to: publishing an erratum or corrigendum (correction); retracting the article; taking up the matter with the head of department or dean of the author's institution and/or relevant academic bodies or societies; or taking appropriate legal action.

### **3.1.2 Prior publication**

If material has been previously published it is not generally acceptable for publication in a SAGE journal. However, there are certain circumstances where previously published material can be considered for publication. Please refer to the guidance on the [SAGE Author Gateway](#) or if in doubt, contact the Editor at the address given below.

### **3.2 Contributor's publishing agreement**

Before publication, SAGE requires the author as the rights holder to sign a Journal Contributor's Publishing Agreement. SAGE's Journal Contributor's Publishing Agreement is an exclusive licence agreement which means that the author retains copyright in the work but grants SAGE the sole and exclusive right and licence to publish for the full legal term of copyright. Exceptions may exist where an assignment of copyright is required or preferred by a proprietor other than SAGE. In this case copyright in the work will be assigned from the author to the society. For more information please visit the [SAGE Author Gateway](#).

### **3.3 Open access and author archiving**

*Human and Experimental Toxicology* offers optional open access publishing via the SAGE Choice programme. For more information please visit the [SAGE Choice website](#). For information on funding body compliance, and depositing your article in repositories, please visit [SAGE Publishing Policies](#) on our Journal Author Gateway.

[Back to top](#)

## **4. Preparing your manuscript for submission**

### **4.1 Formatting**



The preferred format for your manuscript is Word. LaTeX files are also accepted. Word and (La)Tex templates are available on the [Manuscript Submission Guidelines](#) page of our Author Gateway.

## **4.2 Artwork, figures and other graphics**

For guidance on the preparation of illustrations, pictures and graphs in electronic format, please visit SAGE's [Manuscript Submission Guidelines](#).

Figures supplied in colour will appear in colour online regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For specifically requested colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from SAGE after receipt of your accepted article.

## **4.3 Supplementary material**

This journal is able to host additional materials online (e.g. datasets, podcasts, videos, images etc) alongside the full-text of the article. For more information please refer to our [guidelines on submitting supplementary files](#).

## **4.4 Reference style**

*Human and Experimental Toxicology* adheres to the [SAGE Vancouver](#) reference style. View the [SAGE Vancouver](#) guidelines to ensure your manuscript conforms to this reference style.

If you use [EndNote](#) to manage references, you can download the [SAGE Vancouver EndNote output file](#).

## **4.5 English language editing services**

Authors seeking assistance with English language editing, translation, or figure and manuscript formatting to fit the journal's specifications should consider using SAGE Language Services. Visit [SAGE Language Services](#) on our Journal Author Gateway for further information.

[Back to top](#)

## **5. Submitting your manuscript**

*Human and Experimental Toxicology* is hosted on SAGE Track, a web based online submission and peer review system powered by ScholarOne™ Manuscripts. Visit <http://mc.manuscriptcentral.com/het> to login and submit your article online.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the journal in the past year it is likely that you will have had an account created. For further guidance on submitting your manuscript online please visit ScholarOne Online Help.

## 5.1 ORCID

As part of our commitment to ensuring an ethical, transparent and fair peer review process SAGE is a supporting member of [ORCID, the Open Researcher and Contributor ID](#). ORCID provides a unique and persistent digital identifier that distinguishes researchers from every other researcher, even those who share the same name, and, through integration in key research workflows such as manuscript and grant submission, supports automated linkages between researchers and their professional activities, ensuring that their work is recognized.

The collection of ORCID iDs from corresponding authors is now part of the submission process of this journal. If you already have an ORCID iD you will be asked to associate that to your submission during the online submission process. We also strongly encourage all co-authors to link their ORCID ID to their accounts in our online peer review platforms. It takes seconds to do: click the link when prompted, sign into your ORCID account and our systems are automatically updated. Your ORCID iD will become part of your accepted publication's metadata, making your work attributable to you and only you. Your ORCID iD is published with your article so that fellow researchers reading your work can link to your ORCID profile and from there link to your other publications.

If you do not already have an ORCID iD please follow this [link](#) to create one or visit our [ORCID homepage](#) to learn more.

## 5.2 Information required for completing your submission

You will be asked to provide contact details and academic affiliations for all co-authors via the submission system and identify who is to be the corresponding

author. These details must match what appears on your manuscript. At this stage please ensure you have included all the required statements and declarations and uploaded any additional supplementary files (including reporting guidelines where relevant).

### **5.3 Permissions**

**Please also ensure that you have obtained any necessary permission** from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures or lengthy quotations previously published elsewhere. For further information including guidance on fair dealing for criticism and review, please see the Copyright and Permissions page on the [SAGE Author Gateway](#)

[Back to top](#)

## **6. On acceptance and publication**

### **6.1 SAGE Production**

Your SAGE Production Editor will keep you informed as to your article's progress throughout the production process. Proofs will be sent by PDF to the corresponding author and should be returned promptly. Authors are reminded to check their proofs carefully to confirm that all author information, including names, affiliations, sequence and contact details are correct, and that Funding and Conflict of Interest statements, if any, are accurate. Please note that if there are any changes to the author list at this stage all authors will be required to complete and sign a form authorising the change.

### **6.2 Online First publication**

Online First allows final articles (completed and approved articles awaiting assignment to a future issue) to be published online prior to their inclusion in a journal issue, which significantly reduces the lead time between submission and publication. Visit the [SAGE Journals help page](#) for more details, including how to cite Online First articles.

### **6.3 Access to your published article**

SAGE provides authors with online access to their final article.

## 6.4 Promoting your article

Publication is not the end of the process! You can help disseminate your paper and ensure it is as widely read and cited as possible. The SAGE Author Gateway has numerous resources to help you promote your work. Visit the [Promote Your Article](#) page on the Gateway for tips and advice.

[Back to top](#)

## 7. Further information

Any correspondence, queries or additional requests for information on the manuscript submission process should be sent to the *Human and Experimental Toxicology* editorial office as follows:

Editor-in-Chief, Kai Savolainen at [kai.m.savolainen@gmail.com](mailto:kai.m.savolainen@gmail.com)