

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E DA HEPATOTOXICIDADE DO VENENO DE *CROTALUS*
DURISSUS TERRIFICUS E DO SORO ANTIOFÍDICO EM RATOS *WISTAR***

CRISTIANE DE PAULI PEREIRA

Presidente Prudente – SP

2012

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E DA HEPATOTOXICIDADE DO VENENO DE *CROTALUS*
DURISSUS TERRIFICUS E DO SORO ANTIOFÍDICO EM RATOS *WISTAR***

CRISTIANE DE PAULI PEREIRA

Dissertação 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. Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosa Maria Barilli Nogueira

Presidente Prudente – SP

2012

591.65 P436a	Pereira, Cristiane de Pauli. Avaliação clínica e da hepatotoxicidade do veneno de <i>Crotalus Durissus Terrificus</i> e do soro antiofídico em ratos Wistar / Cristiane de Pauli Pereira. – Presidente Prudente, 2012. 53 f.: il. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2012. Bibliografia. Orientador: Rosa Maria Barilli Nogueira. 1. <i>Crotalus Durissus Terrificus</i>. 2. Veneno crotálico. 3. Soro antiofídico. 4. Hepatotoxicidade. I. Título.
-----------------	---

CRISTIANE DE PAULI PEREIRA

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E DA HEPATOTOXICIDADE DO VENENO DE *CROTALUS*
DURISSUS TERRIFICUS E DO SORO ANTIOFÍDICO EM RATOS *WISTAR***

Dissertação 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. Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 20 de março, 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Prof.^a Dr.^a Alessandra Melchert
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Prof. Dr. Yudney Pereira da Motta
Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Brasil.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, Fernando, meu grande amor, companheiro fiel, pela paciência nos momentos difíceis, por entender minhas angústias e vibrar comigo diante de cada conquista. Ao fruto desta união, Ana Luiza, muito desejada e esperada, nos presenteando neste momento especial.

Aos meus pais, Iloir e Dulce, por todo o incentivo, carinho, exemplo de vida e por entenderem a minha ausência. Às minhas queridas irmãs, Carine e Marcele, por deixarem que o significado “irmã” fosse símbolo em nossas vidas de amor incondicional.

À minha querida sogra Zélia, única, exemplo de dinamismo e coragem, pelo carinho e auxílio nos momentos difíceis, também por ceder sua casa e seu esposo por vários finais de semana para a conclusão deste trabalho.

Ao grande incentivador deste estudo, Antônio Plácido Pereira, exemplo de dedicação à medicina, pela realização da análise histológica e por incentivar minha qualificação profissional. Não há palavras que possam transmitir o meu agradecimento.

À Profa. Dra. Rosa, exemplo de profissionalismo, pelo incentivo à pesquisa e por tornar agradável esta jornada. Devo-lhe esta orientação e agradeço o privilégio de ter sido sua aluna.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Oeste Paulista, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

Ao corpo docente da pós-graduação em Ciência Animal pelos ensinamentos e incentivos à pesquisa. Em especial: Prof^a. Dr^a. Alessandra Melchert, Prof^a. Dr^a. Inês Cristina Giacometti, Prof. Dr. Luís Roberto Gabriel, Prof. Dr. Paulo Eduardo Pardo, Prof^a. Dr^a. Renata Navarro Cassu, Prof^a. Dr^a. Silvia Franco Andrade e ao Prof. Dr. Vamilton Álvares Santarém.

À Prof^a. Dr^a. Gisele Alborghetti Nai pelo exemplo de profissionalismo, pela leitura das lâminas e por transmitir segurança e tranquilidade em momentos importantes do trabalho.

Ao Prof. Dr. Rogério Giuffrida pelos ensinamentos e análise estatística.

À Adriana Martinez pelo auxílio nas referências bibliográficas e na verificação quanto à normalização.

Aos colaboradores do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia (LAPC), pelo tempo dedicado à produção das lâminas deste trabalho.

Aos colaboradores do Biotério Central pelo auxílio no manuseio com os animais, por garantirem os materiais necessários para a execução do trabalho e pelo tratamento dispensado.

Aos colaboradores do Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da Universidade do Oeste Paulista, pela realização dos exames laboratoriais e à Cecília Braga Laposy e Ana Maria Silveira pela orientação quanto à colheita do material.

Aos alunos Mariana Bloch Uliam e Leandro Nichio G. de Souza pelo auxílio no experimento e por toda dedicação na realização deste trabalho. À aluna Vanessa pela colaboração em momentos importantes.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

Avaliação clínica e da hepatotoxicidade do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e do soro antiofídico em ratos *Wistar*

Este estudo avaliou os efeitos hepatotóxicos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e soro antiofídico em 120 ratos *Wistar*, através da realização de exames físico, laboratorial e histopatológico. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, com trinta animais em cada grupo, sendo: grupo controle (C) - recebeu solução de cloreto de sódio 0,9%; grupo veneno (V) - recebeu veneno crotálico 1mg/Kg; grupo soro antiofídico (S) - recebeu soro antiofídico na dose indicada para neutralizar o veneno; grupo veneno e soro (VS) - recebeu veneno crotálico e após 6 horas o soro antiofídico. A avaliação clínica e a colheita de material para exames laboratorial e histopatológico do fígado foram realizadas nos momentos 2 horas (n=10), 8 horas (n=10) e 24 horas (n=10) para todos os grupos. Observou-se para o grupo S elevação sérica da enzima fosfatase alcalina (FA), infiltrado inflamatório, alterações nas células de Kupffer, necrose e degeneração de hialina; Grupo V diminuição da frequência cardíaca no decorrer do tempo, aumento na temperatura retal (TR), elevação da FA, elevação sérica da aspartato aminotransferase (AST), infiltrado inflamatório, alterações nas células de Kupffer, necrose e degeneração de hialina; Grupo VS aumento da TR e na frequência respiratória, elevação sérica da FA, elevação sérica da AST, elevação sérica da alanina aminotransferase (ALT), infiltrado inflamatório, alterações nas células de Kupffer, necrose e degeneração de hialina. Os resultados encontrados indicam que o veneno crotálico e o soro antiofídico, associados ou não, alteram os parâmetros clínicos e provocam danos hepáticos nas doses e momentos estudados. No entanto, são necessários novos estudos com o veneno crotálico e a soroterapia para que se possa entender o efeito do tempo nas alterações e a porcentagem de contribuição do soro isolado na hepatotoxicidade. Além disso, investigar a necessidade de tratamentos complementares para a proteção hepática.

Palavras chave: *Crotalus durissus terrificus*. Hepatotoxicidade. Veneno crotálico. Soro antiofídico.

ABSTRACT

Clinical and hepatotoxicity of the venom of *Crotalus durissus terrificus* and snakebite serum in *Wistar* rats

This study evaluated the effects of the venom from *Crotalus durissus terrificus* and snakebite serum on the clinical signs and liver function in 120 Wistar rats by performing physical examinations, laboratory and histopathology tests. The animals were divided into four experimental groups of thirty animals in each group. The control group (C) - received only solution of sodium chloride 0.9%; Group venom (V) - received 1mg/kg venom; Group snakebite serum (S) - received the indicated dose snakebite serum to neutralize the poison; Poison and serum group (VS) - received venom and the snakebite serum six hours later. The clinical evaluation and specimen obtained for laboratory and histological examinations were performed at time 2 hours, 8 hours and 24 hours in all groups. It was observed for the S Group elevation of serum enzyme alkaline phosphatase (FA), inflammatory reaction, changes in Kupffer cells, necrosis and hyaline degeneration; Group V heart rate decrease over time, increase in rectal temperature (TR), increased FA, increase of serum aspartate aminotransferase (AST), inflammatory infiltrate, changes in Kupffer cells, necrosis and hyaline degeneration; Group VS increased TR and also respiratory rate, elevated serum FA, AST and alanine aminotransferase (ALT), inflammatory reaction, changes in Kupffer cells, necrosis and hyaline degeneration. The results indicate that the venom and snakebite serum alter the clinical parameters and cause liver damage at the doses and times studied. However, further studies with the venom and antivenom to be able to understand the effect of time and changes in the percentage contribution of hepatotoxicity in serum isolated. In addition, to investigate the need for additional treatments to protect the liver.

Keywords: *Crotalus durissus terrificus*. Hepatotoxicity. Crotalus Venom. Snakebite serum.

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 - Serpente Peçonhenta.....	11
FIGURA 2 - Dentição Tipo Solenóglifa.....	13
FIGURA 3 - Língua Bífida da Serpente.....	14
FIGURA 4 - Serpentes Peçonhentas - Fosseta Loreal.....	15
FIGURA 5 - Chocalho ou Guizo na Extremidade da Cauda.....	17

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVO	11
1.1 Serpentes	11
1.2 Serpente Crotalus Durissus	16
1.3 Intoxicação Crotálica	17
1.3.1 Ação miotóxica	18
1.3.2 Ação neurotóxica	19
1.3.3 Ação nefrotóxica	21
1.3.4 Ação hematológica	21
1.3.5 Ação hepatotóxica	22
1.4 Tratamento na Intoxicação Crotálica	23
REFERÊNCIAS	24
2 ARTIGO CIENTÍFICO	27

1 INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVO

A Organização Mundial de Saúde (1981) reconhece que há pouca informação científica sobre os danos causados por acidentes provocados por animais peçonhentos. Romano-Hoge (1990) destaca que esse tipo de acidente constitui causa importante de agravo à saúde em nosso país e, segundo Barraviera e Ferreira Júnior (2007), as serpentes (Figura 1) são as principais causadoras destas intoxicações.

Existem cerca de três mil espécies de serpentes no mundo e quatrocentas e dez delas são consideradas peçonhentas. Considerando os prejuízos na área veterinária e os investimentos no tratamento destes acidentes em animais e humanos é que a atualização dos profissionais de saúde torna-se fundamental (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

FIGURA 1 – Serpente Peçonhenta



Fonte: (ARAGUAIA, 2012).

1.1 Serpentes

No Brasil as serpentes são conhecidas pelo termo popular cobra, do latim *colubra*, e designa qualquer serpente, peçonhenta ou não. O termo mais incomum é ofídio, do grego *ophidion* diminutivo de *ophis*, que significa serpente (ROMANO-HOGE, 1990). Pertencem a Ordem Squamata, Classe Reptila. Duzentas e cinquenta e seis estão catalogadas, sendo sessenta e nove peçonhentas. A distribuição das espécies peçonhentas encontradas é a seguinte: trinta e duas do

gênero *Bothrops*, seis do gênero *Crotalus*, duas do gênero *Lachesis* e vinte e nove do gênero *Micrurus* (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

No período de janeiro de 2005 a dezembro de 2009, foram registrados 142.882 acidentes ofídicos, o que representa uma média de 28.576 casos/ano (BRASIL, 2011).

Os índices de letalidade variam de acordo com o período estudado e parecem reduzir com o passar dos anos. Em 1949, o índice registrado foi de 2,45% para ofidismo no Brasil, enquanto em 1971 este índice chegou a 1,75% e em 1985 em 0,89% (SOERENSEN, 1990). Em 1998 o índice foi de 0,43% (BRASIL, 1998b) e no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2009 o índice de letalidade para estes acidentes foi de 0,39% (BRASIL, 2011).

O índice varia também entre os gêneros das serpentes, sendo 0,31% para o gênero *Bothrops* (jararaca), 0,36% para o gênero *Micrurus* (coral), 0,95% para o gênero *Lachesis* (surucucu) e 1,85% para o gênero *Crotalus* (cascavel). Em aproximadamente 19% dos óbitos não são informados os gêneros das serpentes envolvidas nos acidentes (BRASIL, 1998b).

A característica mais marcante de uma serpente é a ausência de membros/patas, a flexibilidade e os movimentos serpentiformes característicos que são possibilitados por numerosas vértebras interligadas (PUORTO, 1992). O corpo é alongado, recoberto por escamas epidérmicas que as protegem nos terrenos irregulares, vegetação, água e etc. A pele é maleável, se distende e retrai conforme a necessidade e situação (SOERENSEN, 1990). A temperatura corporal é variável entre espécies, ficando entre 28°C e 34°C. A termorregulação é realizada na troca entre ambientes e também pelo enrolamento ou extensão do corpo (JIM; SAKATE, 1994).

Constituem um grupo altamente especializado. Não possuem tímpano ou abertura externa do ouvido nem pálpebras móveis. Possuem 11 tipos de glândulas associadas à alimentação na cabeça que envolve abundante salivação (JIM; SAKATE, 1994) e, na maioria delas, glândulas de veneno situadas em ambos os lados da cabeça ao longo do maxilar que ultrapassam a região nugal. A peçonha é inoculada no ato da apreensão da vítima através da contração dos músculos no momento da picada, que espreme a glândula e provoca a saída do veneno (SOERENSEN, 1990).

Normalmente são divididas quanto à dentição e a capacidade de injetar a peçonha em quatro grupos: áglifa (dentes maciços, sem sulco ou canal central), opistóglifa (par de dentes maiores implantados na extremidade posterior do maxilar superior, providos de sulco, porém com dificuldade de introduzir a peçonha), proteróglifa (um par de dentes mais longos e fortes que os restantes, providos de profunda chanfradura) e solenóglifa (um par de dentes móveis e muito desenvolvidos, providos de canal central que se comunica com o canal excretor da glândula de veneno) (SOERENSEN, 1990; JIM; SAKATE, 1994).

As serpentes que apresentam dentição do tipo áglifa são consideradas serpentes não peçonhentas (*Boa constrictor*, *Eunectes murinus*, *Corallus caninus*). A posição das presas das serpentes com dentição do tipo opistóglifa dificulta a inoculação do veneno, porém, eventualmente, podem causar intoxicações ou envenenamentos (*Oxyrhopus guibei*, *Pseudoboa Clélia*, *Philodryas olfersii*). As serpentes com dentição proteróglifa inoculam veneno, mas são responsáveis por menos de 1% das intoxicações no Brasil (*Micrurus corallinus*). O tipo mais perfeito de aparelho venenífero que se conhece, dentre as serpentes, é a dentição do tipo solenóglifa (Figura 2) (*Bothrops jararaca*, *Crotalus durissus*, *Lachesis muta*) (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

FIGURA 2 - Dentição Tipo Solenóglifa



Fonte: (ARAGUAIA, 2012).

A língua é delgada e bífida, capaz de captar estímulos e pode sair mesmo quando a boca está fechada, através da chanfradura da mandíbula (Figura 3). O olfato é realizado por movimentos vibratórios da língua e este processo permite à serpente encontrar e apanhar suas presas. A mandíbula é composta de duas partes ligadas por um frouxo ligamento, as articulações também são frouxas, o que contribui para melhor distensão da boca ao apanhar e engolir presas grandes (SOERENSEN, 1990).

FIGURA 3 - Língua Bífida da Serpente.



Fonte: (KOCH, 2012).

As serpentes podem sobreviver um ano ou mais sem alimento ou se alimentar de vários animais em um mesmo dia. São facilmente irritáveis, principalmente após a alimentação e regurgitam o animal ingerido quando ameaçadas. A maioria delas é carnívora, se alimentam de roedores, pássaros, moluscos, lagartixas, rãs, ovos, peixes e de outras serpentes. A presa é engolida inteira, a digestão é lenta, podendo durar vários dias (SOERENSEN, 1990).

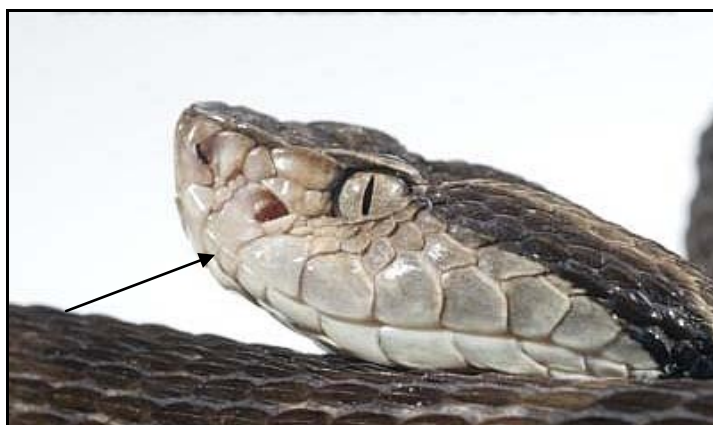
A pele é constituída por três camadas: a derme é a mais profunda e espessa, a epiderme forma a camada acima da derme e produz a camada externa cornificada (JIM; SAKATE, 1994). Toda a camada córnea da serpente é renovada, em um processo chamado de muda ou ecdise (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007), surgindo uma pele nova, lisa, brilhante e colorida. O processo inicia-se pela cabeça e durante este período a serpente não se alimenta. O número de mudas por ano é variável de acordo com as espécies e condições físicas do animal, no geral mudam de pele uma a quatro vezes no ano (SOERENSEN, 1990).

As serpentes são desprovidas de tímpano e da cavidade do ouvido médio, a capacidade auditiva é pouca para os sons perceptíveis ao homem (SOERENSEN, 1990). São chamadas de ovíparas quando põe ovos (*Micrurus* e *Lachesis*) e de vivíparas quando parem filhotes prontos (*Bothrops* e *Crotalus*). As serpentes vivíparas apresentam um período de gestação variável em torno de quatro a cinco meses. Os filhotes nascem com seu aparelho secretor e inoculador de veneno funcionando e podem provocar graves acidentes (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

Reconhecer o gênero da serpente agressora é um dos meios para a definição do diagnóstico etiológico, permitindo, conseqüentemente, a utilização correta e imediata do soro adequado. As serpentes peçonhentas possuem presas anteriores, com orifício central ou sulco, cabeça destacada do corpo, a cauda afina abruptamente, um par de fossetas loreais (exceto no gênero *Micrurus*) e pupilas em fenda. Possuem hábitos noturnos e costumam ser vagarosas (BRASIL, 1998a).

A fosseta loreal (Figura 4) é uma abertura situada entre a boca e a narina que realiza a termorrecepção (capta vibrações do ar e detecta ondas térmicas), permitindo a esses animais uma maior facilidade na captura do alimento (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007). Segundo Puerto (1992), serpentes que não apresentam fosseta loreal e presas anteriores não são peçonhentas.

FIGURA 4 - Serpentes Peçonhentas - Fosseta Loreal



Fonte: (KOCH, 2012).

A porção final da cauda lisa é característica do gênero *Bothrops* (Jararaca, Urutu, Jararacuçu, Cotiara), escamas eriçadas indica que a serpente

pertence ao gênero *Lachesis* (Surucucu, Pico de Jaca) e a presença de chocalho indica que a serpente é do gênero *Crotalus* (PUORTO, 1992).

1.2 Serpente *Crotalus Durissus*

A serpente responsável pela maior taxa de letalidade é do gênero *Crotalus* (JORGE; RIBEIRO, 1990). É conhecida popularmente pelo nome de Cascavel, Cascavel de quatro ventas, Boicininga ou Maracabóia (PUORTO, 1992). Encontram-se distribuídas no Brasil em seis subespécies (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus ruruima*, *Crotalus durissus marajoensis* e *Crotalus durissus trigonicus*) (BARRAVIERA, 1994).

Ribeiro et al. (1998) analisaram 12.639 acidentes por serpentes peçonhentas notificados com 43 casos de óbito (0,34%). O gênero da serpente foi identificado em 11.297 acidentes e em 41 dos envenenamentos fatais. As serpentes do gênero *Bothrops* foram as principais causadoras de acidentes (87%) e de óbitos, mas a porcentagem de acidentes por *Crotalus durissus* que evoluiu para óbito foi maior, reforçando o conhecimento da maior letalidade do acidente crotálico em relação ao botrópico.

A ponta da cauda é modificada formando um “botão terminal”, com cobertura que não se destaca durante a muda. Por ocasião de cada muda, mais um resíduo de pele se junta aos anteriores e forma um conjunto de resíduos capaz de produzir ruído ao movimento, chamado de chocalho ou guizo (Figura 5) (SOERENSEN, 1990). São encontradas em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas, raramente na faixa litorânea. Não têm hábito de atacar e denuncia sua presença pelo ruído característico da cauda (RIBEIRO; JORGE; IVERSSON, 1995).

FIGURA 5 - Chocalho ou Guizo na Extremidade da Cauda



Fonte: (KOCH, 2012).

A maioria dos acidentes ocorre no verão, ou seja, entre janeiro e abril de cada ano, que coincidem com a época destinada ao preparo, plantio e colheita da safra agrícola (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007). Mise, Lira-da-Silva e Carvalho (2007), confirmaram em seu estudo que grande parte dos acidentes ocorreu no ambiente rural. Oliveira et al. (2008) analisaram os dados de 45 pacientes e 80% destes exerciam atividade agrícola no momento do acidente. De acordo com Barraviera e Ferreira Júnior (2007), as regiões mais acometidas são os membros inferiores (62,75%), seguidas dos membros superiores.

1.3 Intoxicação Crotálica

As serpentes *Crotalus durissus* possuem veneno de composição complexa e constituído de enzimas, toxinas e peptídeos, com ações miotóxica, neurotóxica, coagulante e hepatotóxica. O fracionamento do veneno revela as seguintes frações enzimáticas: 5-nucleotidases, fosfodiesterases, enzima tipo trombina, l-aminooxidases, atividades da calicreína tipo tecidual e hidrolase do NAD. As toxinas separadas foram: crotamina, crotapotina, fosfolipase A2, girotoxina e convulxina (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007). Os efeitos biológicos do complexo tóxico-enzimático da peçonha crotálica variam nas diferentes espécies animais (MARQUES; CUPO; HERING, 1992).

O exame clínico do paciente deve ser iniciado pela avaliação do local da picada, sendo que no acidente crotálico o quadro local é pouco expressivo, geralmente sem edema ou dor, com relatos de parestesia local. Neste tipo de acidente não há relação entre os sintomas locais e a gravidade do envenenamento (BARRAVIERA, 1994). Procedimentos como garroteamento, escarificações ou sucção do local podem provocar aparecimento de edema ou lesões cutâneas variáveis (MARQUES; CUPO; HERING, 1992).

1.3.1 Ação miotóxica

A crotoxina é um complexo composto por subunidades, uma proteína denominada fosfolipase A, uma proteína denominada crotapotina e uma mistura (fração III), que são pouco tóxicas isoladamente (MARQUES; CUPO; HERING, 1992). De acordo com Barraviera e Ferreira Júnior (2007), a ligação química entre a fosfolipase A e a crotapotina não é do tipo covalente e, portanto, é uma ligação fraca e reversível. É a fração do veneno melhor conhecida do ponto de vista fisiopatológico.

O estudo realizado por Azevedo-Marques et al. (1982) revelou o efeito miotóxico do veneno crotálico em pessoas vítimas de acidentes com esta serpente. Neste estudo o veneno provocou lesões em fibras esqueléticas. Azevedo-Marques et al. (1985) demonstraram a ação do veneno lesando as fibras musculares estriadas, comprovando que a agressão muscular é acompanhada de mialgia. Sendo assim, pode ocorrer queixa de dor muscular generalizada de aparecimento precoce, mais intensa nos casos mais graves.

A atividade miotóxica sistêmica, caracterizada pela liberação de mioglobina para o sangue e urina, está bem estabelecida (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007). Como resultado da miólise, há liberação de mioglobina (confundida inicialmente com a hemoglobina) e enzimas para a circulação sanguínea, podendo-se observar valores elevados de creatinoquinase (CK), desidrogenase láctica (DHL), transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e aldolase (MARQUES; CUPO; HERING, 1992).

A urina nas primeiras 6 horas pode tornar-se avermelhada e progressivamente marrom (âmbar) nas horas subsequentes, demonstrando a

eliminação de mioglobina, pigmento liberado do tecido muscular. A mioglobinúria constitui a manifestação clínica mais evidente da existência de rabdomiólise. Não havendo dano renal, a urina readquire sua coloração habitual em um ou dois dias (MARQUES; CUPO; HERING, 1992). O diagnóstico de rabdomiólise pode ser comprovado pela elevação dos níveis séricos de CK, DHL e aspartato aminotransferase (AST) e confirmado com a detecção de mioglobina em soro e urina. O exame histopatológico muscular também pode contribuir de forma importante na confirmação de rabdomiólise (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

A maior parte das informações sobre alterações teciduais foi obtida a partir de observações anatomo-patológicas e de estudos experimentais relacionados às peçonhas ofídicas (DAL PAI; SANTOS NETO, 1994). A comprovação direta da atividade miotóxica sistêmica do veneno crotálico foi obtida com a execução de biópsias de tecido muscular esquelético, sempre a distância em relação ao ponto de inoculação do veneno. O aspecto focal das lesões pode ser resultado de algumas alterações da microcirculação, evidenciadas em algumas biópsias, ou da existência de agressão seletiva a tipos específicos de fibras (MARQUES; CUPO; HERING, 1992).

As alterações anatomopatológicas ocorrem quatro a seis horas após a inoculação da crotoxina no músculo, o que não ocorre com a inoculação de diferentes quantidades da crotapotina isolada. Observações experimentais concluem que a associação das subunidades leva a uma potencialização dos efeitos miotóxicos (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

A crotamina é uma toxina polipeptídica básica, pouco tóxica e encontrada na peçonha de cascavéis de certas regiões do Brasil, Argentina e Bolívia. Atua na membrana das fibras musculares alterando sua permeabilidade ao sódio, o que provoca espasmos musculares em alguns animais (MARQUES; CUPO; HERING, 1992).

1.3.2 Ação neurotóxica

As neurotoxinas isoladas, referidas por Vital Brazil, são a crotoxina, crotamina, girotoxina e convulxina (MARQUES; CUPO; HERING, 1992).

A neurotoxina pré-sináptica responsável pela alta toxicidade do veneno é a crotoxina, que atua nas terminações nervosas motoras inibindo a liberação da acetilcolina pelos impulsos nervosos, principal fator responsável pelo bloqueio neuromuscular e portanto, pelas paralisias motoras e respiratórias observadas em animais (MARQUES; CUPO; HERING, 1992). Causa paralisia em todas as espécies animais estudadas, sendo tal paralisia semelhante ao efeito causado pelos curares (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

As manifestações decorrentes da atividade neurotóxica do veneno geralmente se tornam evidentes nas primeiras seis horas, quando se evidencia a queda das pálpebras (ptose palpebral) uni ou bilateral e flacidez da musculatura da face, caracterizando a denominada “fácies miastênica” ou “fácies neurotóxica”. Há oftalmoplegia, podendo existir dificuldade na acomodação, alteração do diâmetro pupilar (midríase) com referência a visão turva, até “cegueira” e diplopia em humanos (MARQUES; CUPO; HERING, 1992; BRASIL, 1998a).

No estudo em cães de Koscinczuk et al. (2000) foi possível observar sinais neurológicos poucos minutos após o acidente e no estudo de Amaral, Magalhães e Rezende (1991) houve relato de paralisia respiratória em três humanos como complicação da intoxicação. A ptose palpebral, acompanhada de distúrbios de acomodação visual, geralmente referidos pelo paciente como “visão duplicada dos objetos” (diplopia) geralmente se instalam nas primeiras três a seis horas após a picada. Alguns pacientes referem ainda perda transitória da sensação olfativa, de modo geral os efeitos da ação neurotóxica desaparecem, sem deixar sequelas, dentro da primeira semana de ocorrência do acidente (MARQUES; CUPO; HERING, 1992).

Há relatos raros da ocorrência de insuficiência respiratória aguda, interpretada como decorrente de paralisia da musculatura intercostal e/ou diafragmática (MARQUES; CUPO; HERING, 1992; BRASIL, 1998a). Estudos em animais mostram também a presença de vômitos, salivação intensa, diarreia, além de convulsões. É possível concluir que esta neurotoxina atue na pré-sinapse, inibindo a liberação de acetilcolina, já que estes achados sugerem que as paralisias motoras e respiratórias sejam decorrentes do bloqueio da junção neuromuscular (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

A girotoxina, descrita por Barrio, é farmacologicamente pouco conhecida, produzindo síndrome convulsiva em camundongos. A convulxina,

descrita por Prado Franceschi, produz experimentalmente perturbações respiratórias, circulatórias e convulsões, e atua sobre plaquetas (MARQUES; CUPO; HERING, 1992). A convulxina e a girotóxina contribuem no aparecimento de convulsões, perturbações circulatórias e respiratórias em animais de experimentação (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

1.3.3 Ação nefrotóxica

Nos casos tratados tardiamente e de forma inadequada a complicação mais grave e frequente é a insuficiência renal aguda (IRA) (MARQUES; CUPO; HERING, 1992). O veneno crotálico diminuiu o fluxo sanguíneo cortical renal e contribuiu para a trombose dos capilares glomerulares (ROVERE et al., 1978). Segundo Martins et al. (2002) a crotoxina é a principal responsável pela nefrotoxicidade causada pelo veneno de *Crotalus durissus*.

A excreção da mioglobina isolada não leva à necrose tubular aguda (NTA), sendo necessário associar outras condições como hipovolemia, urina ácida ou agente nefrotóxico (MARQUES; CUPO; HERING, 1992). Outros sintomas como acidose metabólica e choque podem estar associados à rabdomiólise e contribuem para a instalação da lesão renal (BARRAVIERA; FERREIRA JÚNIOR, 2007).

1.3.4 Ação hematológica

De acordo com Barraviera e Ferreira Júnior (2007), as alterações hematológicas encontradas estão relacionadas aos leucócitos, eritrócitos, plaquetas e fatores de coagulação. A hemólise do veneno só foi observada in vitro.

Acredita-se que o distúrbio da coagulação sanguínea causada pelo acidente crotálico deve-se a uma fração tipo trombina que é capaz de converter o fibrinogênio diretamente em fibrina (in vitro), prolongando o tempo para ocorrer coagulação (THOMAZINI; BARRAVIERA, 1994). O hemograma apresenta aumento nos valores do hematócrito, aumento do número total de leucócitos e velocidade de hemossedimentação diminuída (antes do tratamento). As plaquetas podem estar normais ou diminuídas, (BARRAVIERA, 1994; BRASIL, 1998b).

1.3.5 Ação hepatotóxica

O fígado desempenha um papel importante na intoxicação, serve como barreira orgânica à ação dos venenos e, por esta razão, muitos são os sintomas e sinais relacionados com as suas lesões anatômicas e perturbações funcionais (ALCÂNTARA, 1985).

O possível dano hepático produzido no envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* foi observado em um estudo em 1954 quando dois pacientes humanos evoluíram com esteatose e congestão hepática. Em 1973, pesquisadores constataram a fixação do veneno da espécie *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos hepáticos de ratos e em 1983 observaram, em um estudo experimental em gado, degeneração hidrópica, esteatose e necrose hepática (BARRAVIEIRA et al., 1995).

Azevedo-Marques et al. (1985) também relataram esteatose hepática e aumento nos níveis de AST em dois pacientes atendidos em um hospital no estado de São Paulo. Barraviera et al. (1989), constataram a hepatotoxicidade após observar níveis séricos de AST e alanina aminotransferase (ALT) em um paciente humano que foi a óbito após picada de *Crotalus durissus terrificus*. A autopsia foi feita e o estudo histopatológico mostrou extensa necrose hepática.

Em 1995, Barraviera et al., avaliaram dezesseis pacientes picados por *Crotalus durissus terrificus* e concluíram que as alterações hepáticas são causadas por pelo menos dois mecanismos: lesão mitocondrial por efeito do veneno crotálico e efeito das citocinas, especialmente a interleucina-6. O estudo avaliou, através do teste de bromosulfaleína (BSP), ALT e AST. Só houve estudo histopatológico em um paciente que foi a óbito após ser picado pela *Crotalus durissus terríficos* e este mostrou degeneração hepatocelular hidrópica.

Hernández Cruz et al. (2008), observaram diminuição nos níveis de uréia após intoxicação de camundongos com o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, sugerindo falência hepática. França et al. (2009) constataram hepatotoxicidade aguda do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em ratos, comprovando que o mesmo produz um aumento na atividade das enzimas hepáticas e alterações histológicas, sugerindo hepatotoxicidade.

1.4 Tratamento na Intoxicação Crotálica

Baseado nas alterações clínicas e laboratoriais e visando orientar a terapêutica, os acidentes crotálicos são classificados em casos leves, moderados e graves (BRASIL, 1998b). O tratamento específico desses envenenamentos é realizado com soro equino contra venenos de serpentes do mesmo gênero da que causou o acidente (JORGE; RIBEIRO, 1990) e na quantidade suficiente para neutralizar a quantidade de veneno que supostamente tenha sido inoculada. Para minimizar as complicações, tratamentos auxiliares e de suporte devem ser instituídos (NOGUEIRA, 2011).

Os seguintes fatores podem contribuir para a gravidade do acidente: idade, peso, condições gerais do organismo, quantidade de veneno inoculada e o tempo decorrido entre o acidente e a instalação do tratamento adequado, local atingido e sensibilidade individual (NOGUEIRA, 2011).

Os soros antiofídicos são medicamentos contendo imunoglobulinas específicas purificadas. São produzidos a partir de plasma de animais, geralmente equinos, hiperimunizados com venenos de animais peçonhentos. A especificidade dos soros foi assinalada por Vital Brasil, quando verificou que os soros antiofídicos contra o veneno de serpentes européias, não neutralizava o veneno das serpentes americanas (SOERENSEN, 1990).

O soro antiofídico exerce seu efeito também sobre o sistema imune. Alguns autores observaram, após sete dias de tratamento, aumento na velocidade de hemossedimentação em 45,7% dos doentes e aumento da proteína C-reativa em 28,5%. Estes resultados reforçam a hipótese de que tanto o veneno quanto o soro têm capacidade de induzir a liberação de mediadores químicos capazes de desencadear a reação de fase aguda nos acidentes (THOMAZINI; BARRAVIERA, 1994).

A alta incidência e mortalidade nas intoxicações pelo veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* e a escassez de dados sobre os efeitos da hepatotoxicidade estimulam o desenvolvimento deste estudo, que tem como objetivo avaliar a hepatotoxicidade do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e do soro antiofídico em ratos Wistar por meio de exames clínico, laboratorial e histopatológico.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, H. R. **Toxicologia clínica e forense: diagnóstico, tratamento, aspectos forenses dos envenenamentos, intoxicações e toxicomanias**. 2.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1985.

AMARAL, C. F. S.; MAGALHÃES, R. A.; REZENDE, N. A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, p. 251-255, 1991.

ARAGUAIA, M. **Serpentes peçonhentas brasileiras**. Mundo Educação, 2012. Disponível em: <http://www.mundoeducacao.com.br/biologia/serpentes-peconhentas-brasileiras.htm>. Acesso em: 10 jan. 2012.

AZEVEDO-MARQUES, M. M. et al. Mionecrose e insuficiência renal aguda mioglobínica após acidente crotálico. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 18. Ribeirão Preto, 1982. **Anais...** Ribeirão Preto, 1982. p.12.

AZEVEDO-MARQUES, M. M. et al. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**. v. 23, n. 4, p. 631-636, 1985.

BARRAVIERA, B. et al. A retrospective study of 40 victims of *Crotalus* snake bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 22, n. 1, p. 5-12, 1989.

BARRAVIERA, B. et al. Liver Dysfunction in Patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) snakes in Botucatu (state of São Paulo, Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 37, n. 1, p. 63-69, 1995.

BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994.

BARRAVIERA, B.; FERREIRA JÚNIOR, R. S. **Acidentes por animais peçonhentos**. 1.ed. Botucatu: CEVAP-UNESP, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Casos de acidentes por animais peçonhentos: Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1999 a 2010**. Portal da Saúde SUS, 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_casos_serie_historica_99_10.pdf. Acesso em: 26 jun. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília, 1998a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos**. Brasília, 1998b.

DAL PAI, V.; SANTOS NETO, H. Ação dos venenos ofídicos sobre os tecidos animais. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. p. 97-105.

FRANÇA, F. et al. Acute Hepatotoxicity of *Crotalus Durissus Terrificus* (South American Rattlesnake) venom in rats. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 15, p. 61-78, 2009.

HERNÁNDEZ CRUZ, A. et al. Pro-and anti-inflammatory cytokines release in mice injected with *Crotalus Durissus Terrificus* Venom. **Mediators of Inflammation**. v. 2008, n. 874962, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2442456/?tool=pubmed>. Acesso em: 10 jan. 2012

JIM, J.; SKATE, M. Biologia das serpentes. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. p. 109-134.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. **Rev. Ass. Méd. Bras.**, v. 36, n. 2, p. 66-77, 1990.

KOCH, Z. ***Crotalus durissus terrificus***. Natureza Brasileira, 2012. Disponível em: <http://www.naturezabrasileira.com.br>. Acesso em: 10 jan. 2012.

KOSCINCZUK, P. et al. American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) bite accidents in dogs in Argentina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 52, n. 2, p.125-129, 2000.

MARQUES, M. M. A.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidente crotálico. In: SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 161-167.

MARTINS, A. M., et al. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induced renal toxicity in isolated rat kidneys. **Toxicon.**, v. 40, n. 8, p. 1165-1171, 2002.

MISE, Y. F.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; CARVALHO, F. M. Envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* no Estado da Bahia: aspectos epidemiológicos e clínicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 5, p. 569-573, 2007.

NOGUEIRA, R. M. B. Lagartas e serpentes. In: NOGUEIRA, R. M. B.; ANDRADE, S. F. **Manual de toxicologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2011. p. 295-313.

OLIVEIRA, A. L. et al. Avaliação epidemiológica e laboratorial de pacientes que sofreram acidente ofídico na cidade de Micacatu (Vale do Ribeira, São Paulo). **Rev. Patol. Trop.**, v. 37, n. 3, p. 268-274, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Progress in characterization of venoms and standardization of antivenoms**. Geneva, 1981. (WHO Publication, n. 58).

PUORTO, G. Serpentes brasileiras de importância médica. In SCHVARTSMAN, Samuel. **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 143-149.

RIBEIRO, L. A., et al. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988-1993. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 44, n. 4, p. 312-318. 1998.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T.; IVERSSON, L. B. Epidemiologia dos acidentes por serpentes peçonhentas: estudo de casos atendidos em 1988. **Rev. Saúde Pub.**, v. 29, n. 5, 380-388, 1995.

ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano. In: Soerensen, B (ed). **Animais peçonhentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. p. 1-46

ROVERE, A. A., et al. Early effect of *Crotalus Durissus Terrificus* venom on kidney circulation. **Acta Physiol Lat. Am.**, v. 28, n. 2-3, p. 133-139, 1978.

SOERENSEN, B. **Animais peçonhentos**: reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros, clínica e tratamento de envenenamentos. São Paulo: Atheneu , 1990.

THOMAZINI, I. A.; BARRAVIERA, B. Alterações hematológicas nos acidentes por animais peçonhentos. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais**: uma visão integrada. Rio de janeiro: Publicações Científicas, 1994. p.81-96.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação Clínica e da Hepatotoxicidade do Veneno de *Crotalus Durissus Terrificus* e do Soro Antiofídico em Ratos Wistar

C.P. Pereira, R.M.B. Nogueira, C.B. Laposy, A.M.S. Silveira, M.B. Uliam, L.N.G. Souza, A. P. Pereira, G. A. Nai.

Mestrado em Ciência Animal da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Resumo

Este estudo avaliou os efeitos clínicos e hepatotóxicos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e soro antiofídico em 120 ratos Wistar, através da realização de exames físico, laboratorial e histopatológico. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, com trinta animais em cada grupo, sendo: grupo controle (C) - recebeu solução de cloreto de sódio 0,9%; grupo veneno (V) - recebeu veneno crotálico 1mg/Kg; grupo soro antiofídico (S) - recebeu soro antiofídico na dose indicada para neutralizar o veneno; grupo veneno e soro (VS) - recebeu veneno crotálico e após 6 horas o soro antiofídico. A avaliação clínica e a colheita de material para exames laboratorial e histopatológico do fígado foram realizadas nos momentos 2 horas (n=10), 8 horas (n=10) e 24 horas (n=10) para todos os grupos. Observou-se para o grupo S elevação sérica da enzima fosfatase alcalina (FA), infiltrado inflamatório, alterações nas células de Kupffer, necrose e degeneração de hialina; Grupo V diminuição da frequência cardíaca no decorrer do tempo, aumento na temperatura retal (TR), elevação da FA, elevação sérica da aspartato aminotransferase (AST), infiltrado inflamatório, alterações nas células de Kupffer, necrose e degeneração de hialina; Grupo VS aumento da TR e na frequência respiratória, elevação sérica da FA, elevação sérica da AST, elevação sérica da alanina aminotransferase (ALT), infiltrado inflamatório, alterações nas células de Kupffer, necrose e degeneração de hialina. Os resultados encontrados indicam que o veneno crotálico e o soro antiofídico, associados ou não, alteram os parâmetros clínicos e provocam danos hepáticos nas doses e momentos estudados. No entanto, são necessários novos estudos com o veneno crotálico e a soroterapia para que se possa entender o efeito do tempo nas alterações e a porcentagem de contribuição do soro isolado na hepatotoxicidade. Além disso, investigar a necessidade de tratamentos complementares para a proteção hepática.

Palavras chave: *Crotalus durissus terrificus*. Hepatotoxicidade. Veneno crotálico. Soro antiofídico.

1. Introdução

Nos países tropicais, os acidentes ofídicos constituem um problema de saúde pública (World Health Organization, 1981), tanto pelo número de casos registrados quanto pela gravidade apresentada. As serpentes são as principais causadoras de acidentes por animais peçonhentos no Brasil. No período de janeiro de 2005 a dezembro de 2009 foram registrados 142.882 casos, o que representa uma média de 28.576 casos/ano. O índice de letalidade para estes acidentes foi de 0,39% (Brasil, 2011), sendo maior nos acidentes da serpente do gênero *Crotalus*, com 1.87% (Brasil, 2001).

O veneno crotálico tem composição complexa e constituída de enzimas, toxinas e peptídeos, com ações miotóxica, neurotóxica, nefrotóxica, coagulante e hepatotóxica (Barraviera; Ferreira Júnior, 2007). O possível dano hepático produzido no envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) foi observado no estudo de Wajchenberg et al. (1954) onde dois pacientes humanos evoluíram com esteatose e congestão hepática e Bancher et al. (1973) que constataram a fixação do veneno da espécie nos tecidos hepáticos de ratos. Saliba et al. (1983) observaram em um estudo experimental em bovinos, degeneração hidrópica, esteatose e necrose hepática. Azevedo Marques et al. (1985) relataram esteatose hepática e aumento nos níveis de aspartato aminotransferase (AST) em dois pacientes humanos. Barraviera et al. (1989) confirmaram a lesão hepática, ao observarem extensa necrose na autópsia de um paciente humano, que foi a óbito após picada de Cdt.

De acordo com França et al. (2009), existem muitos estudos que avaliam as implicações e complicações dos acidentes ofídicos, porém poucos dão atenção ao efeito nocivo destes ao fígado. A escassez de dados sobre o dano hepático provocado pela ação do veneno impulsionou a realização deste estudo, que avaliou a hepatotoxicidade do veneno de Cdt e soro antiofídico em ratos Wistar, através da realização dos exames físico, laboratorial e histopatológico.

2. Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo n.º 209 e realizado no Biotério Central da Universidade de origem. Foram utilizados 120 ratos da linhagem Wistar, fêmeas, adultas, com peso médio de 250g, mantidas em ambiente com temperatura média controlada a 22°C, em ciclo luminoso de 12h claro/escuro, recebendo água e ração à vontade.

O veneno da serpente Cdt foi fornecido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Campus Botucatu. A inoculação do veneno foi realizada no terço médio da face lateral da coxa esquerda do rato, via intramuscular, na dose de 1mg/kg de peso vivo (dose obtida de projeto piloto). A soroterapia antiofídica com soro botrópico crotálico (Laboratório Vencofarma®) foi realizada pela via intraperitoneal, seis horas após a administração do veneno, na dose preconizada pelo fabricante para neutralizar a quantidade de veneno inoculado. A solução de cloreto de sódio 0,9% foi administrada no grupo controle no terço médio da face lateral da coxa esquerda, via intramuscular.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, com trinta animais em cada grupo sendo, grupo controle (C) - recebeu a solução de cloreto de sódio a 0,9%; grupo veneno (V) - recebeu veneno crotálico; grupo soro antiofídico (S) - recebeu soro antiofídico; grupo veneno e soro (VS) - recebeu veneno crotálico e após 6 horas o soro

antiofídico. A avaliação clínica e a colheita de material para exames laboratorial e histopatológico foram realizadas nos momentos 2 horas (M2), 8 horas (M8) e 24 horas (M24) em todos os grupos.

Para a avaliação clínica aferiu-se a frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm), frequência respiratória (f) em movimentos por minuto (mpm) e a temperatura retal (TR) na escala Celsius (°C). Os animais foram anestesiados com éter (França et al., 2009) para a colheita de sangue por punção cardíaca e submetidos à eutanásia por exsanguinação. Em seguida foi aberta a cavidade abdominal para a coleta de uma amostra do lóbulo caudal do fígado. As amostras de sangue foram encaminhadas ao laboratório para determinação das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA).

As amostras de fígado foram acondicionadas em formol a 10% e encaminhadas ao laboratório. As amostras foram processadas para inclusão em parafina e os cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS) com diastase. Para avaliação histopatológica foram observados os seguintes escores: infiltrado inflamatório (HE): 0-ausente; 1-leve; 2-moderada; 3-intensa; células de Kupffer (HE): 0-normal; 1-aumentada; 2-muito aumentada; necrose (HE): 0-ausente; 1-presente; colestase: 0-ausente; 1-presente e degeneração hialina (PAS com diastase): 0-padrões celulares habituais; 1-raras células positivas; 2- pequeno número de células positivas; 3-grande número de células positivas.

Os pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias foram validados respectivamente pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. As variáveis paramétricas foram avaliadas pelo teste de análise de variância em uma via (ANOVA on-way) com contrastes pelo método de Tukey. Quando necessário, empregou-se a correção de Welch com contrastes pelo método de Games-Howell. As diferenças entre as frequências dos parâmetros histopatológicos foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado e o teste Q de Cochran. Os contrastes par a par (pairwise post-hoc) foram realizados pelo teste de Mac Nemar com correção de continuidade cujo nível de significância foi ajustado pela correção de Bonferroni. As análises foram realizadas com o uso do software SPSS for Windows v.13.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

3. Resultados

Na avaliação dos parâmetros clínicos, observou-se diminuição nos valores de FC do grupo VS no M2, porém não foi significativa quando comparada ao grupo C. Nenhum dos grupos diferiu significativamente do grupo controle, no entanto, 40% dos animais do grupo VS apresentaram no M2 valores inferiores aos considerados normais para a espécie (Tabela 1). Na comparação entre momentos dentro de um mesmo grupo, observou-se para o grupo

V diminuição da FC no decorrer do tempo, sendo significativa ($p<0,05$) na comparação de M24 com M2 e M8 (Tabela 1).

Embora não significativo quando comparado ao grupo C, verificou-se no grupo VS diminuição dos valores de f no M2 em 20% dos animais, que apresentaram valores inferiores aos considerados normais para a espécie. No M8 houve aumento da f em 90% dos animais. A diferença foi considerada significativa quando comparada ao grupo C (Tabela 1). Embora não significativo quando comparado ao grupo C, 70% dos animais dos grupos S e V no M24 apresentaram valores de f superiores aos valores normais para a espécie. No entanto, nenhum animal apresentou sinais de comprometimento respiratório grave. Observou-se na comparação entre momentos dentro de um mesmo grupo, aumento ($p<0,05$) da f no grupo V no M24 em relação ao M2. No grupo VS houve aumento ($p<0,05$) da f no M8 em relação ao M2 e M24 (Tabela 1).

Os valores de TR no M2 do grupo V foram superiores e diferiram significativamente ($p<0,05$) dos valores registrados para o grupo C. No M24 observou-se média superior ($p<0,05$) no grupo VS (Tabela 1). Porém, todos os animais apresentaram valores de TR normais para a espécie. Na comparação entre momentos de um mesmo grupo, observou-se diminuição da TR dos grupos S e V com o passar do tempo, sendo significativa ($p<0,05$) entre M2 e M24 nos dois grupos e entre M8 e M24 no grupo V. No grupo VS observou-se aumento da TR ($p<0,05$) no M8 quando comparado ao M2 (Tabela 1).

Na avaliação laboratorial da FA nos momentos M2 e M8, observou-se que os grupos S e VS diferiram dos grupos C e V com aumento significativo ($p<0,05$). No M24 observou-se elevação sérica ($p<0,05$) nos grupos V e VS em relação ao grupo C. O aumento de FA foi maior ($p<0,05$) no grupo VS em relação ao S (Tabela 2). Na comparação entre momentos dentro do mesmo grupo o aumento ($p<0,05$) de FA no grupo S no M2 diferiu do M24. No grupo V o aumento ($p<0,05$) ocorreu no M24 diferindo do M2 e M8. No grupo VS foi observado aumento de FA em todos os momentos estudados ($p<0,05$).

Não houve diferenças entre os grupos estudados com relação à enzima GGT em nenhum dos grupos e momentos avaliados.

Para a enzima AST os níveis séricos no M8 se elevaram ($p<0,05$) no grupo VS quando comparado aos grupos C e S e no grupo V quando comparado ao grupo S. No M24 a AST se elevou ($p<0,05$) nos grupos V e VS quando comparados aos grupos C e S (Tabela 2). Na comparação entre momentos dentro de um mesmo grupo, foi possível observar para o grupo V aumento significativo ($p<0,05$) no momento M24 quando comparado ao M2. No grupo VS houve aumento ($p<0,05$) nos momentos M8 e M24 diferindo do M2.

Para a enzima ALT no M2 houve diminuição significativa ($p<0,05$) no grupo V em relação ao grupo C, porém todos os valores permaneceram dentro dos considerados normais para a espécie. No M24 houve aumento ($p<0,05$) nos níveis plasmáticos do grupo

VS, quando comparado com os grupos C e S (Tabela 2). Na comparação entre momentos de cada grupo, observou-se no grupo V uma elevação gradativa ($p < 0,05$) com o passar do tempo em todos os momentos. No grupo VS o aumento também foi gradativo ao longo dos momentos sendo significativo ($p < 0,05$) no momento M24 em relação ao M2 e M8. Porém, apenas um animal do grupo VS no M8 apresentou valores de ALT superiores aos normais para a espécie.

Nos achados histopatológicos observou-se no M2 a presença de infiltrado inflamatório classificado como leve (Figura 2a) em 100% dos casos do grupo S e a diferença foi considerada significativa ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos C, V e VS (Tabela 3). No M8 90% dos animais do grupo S apresentaram infiltrado inflamatório, sendo 80% classificado como leve e 10% como moderado, diferindo significativamente do controle. Houve aumento na porcentagem de animais com presença de infiltrado inflamatório leve no grupo V (70%), que também diferiu do grupo C ($p < 0,05$). Observou-se diminuição ($p < 0,05$) no infiltrado inflamatório no grupo VS em relação ao grupo S. No M24 apenas o grupo V diferiu significativamente ($p < 0,05$) do grupo C (Tabela 3) (Figura 1a).

Na comparação entre momentos não houve diferença estatística entre os momentos em nenhum dos grupos. No entanto, observou-se diminuição no infiltrado inflamatório no decorrer dos momentos de avaliação ($2h > 8h > 24h$) para os grupos S e VS. No grupo V verificou-se infiltrado inflamatório leve em 30% dos casos no M2 e em 70% dos casos avaliados no M8. No M24 esta porcentagem foi de 60%. Neste momento percebe-se que o efeito do veneno passa a ser mais influente sobre o infiltrado inflamatório que o soro antiofídico isolado (Figura 1a).

Observou-se, em todos os momentos, alterações ($p < 0,05$) nas células de Kupffer (Figura 2b) para os grupos S, V e VS quando comparados ao grupo C (Tabela 3). Nos grupos V e S esta alteração no M2 foi em 100% (escore um) e 90% (escore um), respectivamente. No grupo VS esta alteração foi em 100% dos animais (90% no escore 1 e 10% no escore 2). No M8 os grupos S e V apresentaram alteração em 90% dos animais e o grupo VS registrou alteração em 100% (60% no escore um e 40% no escore dois). No M24 os grupos S, V e VS apresentaram escore um em 100%, 90% e 70%, respectivamente. Apenas o grupo VS apresentou escore dois em 30% dos animais (Figura 1b).

Não foi possível identificar o aparecimento de colestase em nenhum animal dos grupos e momentos estudados. Observou-se a ocorrência de necrose (Figura 2c) no M2 e M8 para os grupos V e VS. No M24 a necrose foi observada nos grupos S, V e VS (Figura 1c).

A degeneração de hialina foi observada para os grupos V e VS no M2 e M8 e diferiram significativamente dos grupos C e S, que não apresentaram alteração em nenhum dos animais (Tabela 3). No M8 70% dos animais do grupo S apresentaram raras alterações

celulares (Figura 2d), neste mesmo momento os grupos V e VS apresentaram alterações em algum grau para todos os animais. No M24 observou-se degeneração que variou de rara a grande nos grupos VS e V, sendo significativa apenas no grupo V que apresentou o maior número de células com deposição de material hialino (Figura 1d).

4. Discussão

Diversos trabalhos descrevem a ocorrência do potencial hepatotóxico do veneno no homem e nos animais, entretanto, não foram encontrados na literatura estudos que avaliem os efeitos do soro antiofídico sobre o fígado.

Neste estudo, a diminuição da FC no grupo VS no M2 ocorreu em 40% dos animais, apesar de não ser significativa quando comparada com o grupo C. Nogueira e Sakate (2006) também observaram diminuição da FC em cães, intoxicados experimentalmente, após quatro horas do envenenamento e Floriano et al. (2009) verificaram esta diminuição em ratos, seis horas após intoxicação.

Neste estudo houve diminuição dos valores de f no M2 em 20% dos animais do grupo VS, no entanto no M8 houve aumento em 90% dos animais deste grupo. O aumento ocorreu também em 70% dos animais do grupo V no M24. Estes resultados concordam com os estudos de Sousa e Silva et al. (2003) que observaram em cães dispnéia e taquipnéia, duas horas após a intoxicação experimental e Floriano et al. (2009) que observaram dispnéia e discreta diminuição da f em ratos intoxicados experimentalmente com veneno crotálico e tratados com soro antiofídico. No presente estudo nenhum animal apresentou sinais de comprometimento respiratório grave como relatado no estudo de Amaral et al. (1991), onde três pacientes humanos apresentaram dispnéia, taquipnéia e movimentos respiratórios superficiais, necessitando de intubação após evoluírem para um quadro de insuficiência respiratória aguda.

Não foi constatada diminuição da TR em nenhum dos grupos estudados. No estudo de Lago et al. (2000) a diminuição da TR ocorreu 20 horas após a intoxicação em bovinos, porém dentro dos valores normais para a espécie. De acordo com Raiser (2002) esta diminuição pode estar relacionada ao quadro de choque que pode se instalar. Nogueira e Sakate (2006) e Graça et al. (2008) não encontraram diferenças significativas na temperatura corporal em cães e bovinos, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle. Floriano et al. (2009) relataram em rato diminuição significativa da temperatura seis horas após inoculação do veneno e tratamento com soro antiofídico, no entanto, a dose utilizada de veneno crotálico por estes pesquisadores foi dez vezes maior que a utilizada no presente estudo.

Detectou-se elevação da FA no grupo S no M2 e M8, no grupo V esta elevação só ocorreu no M24. No grupo VS houve elevação nos níveis da FA em todos os momentos

estudados, concordando com os achados dos estudos de Sousa e Silva et al. (2003) e França et al. (2009), que detectaram esta elevação em cães e em ratos, respectivamente.

Neste estudo, a AST se elevou no grupo V somente no M24, enquanto que no grupo VS esta elevação ocorreu a partir do M8, sendo que no M24 a mediana encontrada foi nove vezes superior à mediana do grupo controle. Estes resultados sugerem que o grupo que recebeu o veneno e o soro antiofídico sofreu alteração precoce e superior aos outros grupos. Este resultado concorda com os estudos de Azevedo Marques et al. (1985), Cupo et al. (1988) e Barraviera et al. (1989). No estudo experimental em ratos *Wistar* de França et al. (2009), os níveis de AST se elevaram no decorrer do tempo em todas as doses de veneno estudadas, sendo significativa na dose de 100mcg/Kg apenas no momento três horas enquanto que as doses de 200mcg/Kg e 300mcg/kg se elevaram significativamente em todos os momentos estudados.

Barraviera et al. (1995) verificaram após 48 horas aumento nos níveis plasmáticos da ALT em 66,67% dos pacientes humanos intoxicados pela Cdt, sendo que 30% destes permaneceram com os valores alterados após 30 dias. França et al. (2009) avaliaram o dano hepático em ratos e encontraram valores acima da normalidade após intoxicação com veneno de Cdt nas doses de 200mcg/Kg e 300mcg/Kg. Silva et al. (2010) também observaram aumento significativo da enzima em ratos intoxicados com 100mcg/Kg (após seis horas) e 300mcg/Kg (após três e seis horas) de veneno crotálico. Neste estudo, somente o grupo VS teve seus valores elevados no M24, porém apenas um animal do grupo VS no M8 apresentou valores superiores aos normais para a espécie.

Neste trabalho, os resultados encontrados para infiltrado inflamatório sugerem que após 2 horas o soro antiofídico provoca uma infiltração inflamatória maior no fígado que o veneno crotálico, concordando com o estudo de Sangiorgio et al. (2008) que observaram infiltrado inflamatório em dois cães intoxicados e tratados com soro antiofídico e fluidoterapia com alcalinização da urina e em um cão tratado com soro antiofídico e fluidoterapia, não observando o mesmo no grupo que recebeu apenas o veneno crotálico.

Constatou-se neste estudo que o soro antiofídico e o veneno crotálico são capazes de provocar hiperplasia nas células de Kupffer, concordando com Sangiorgio et al. (2008) que observaram hiperplasia em um cão que foi tratado com soro antiofídico, fluidoterapia e alcalinização da urina, após intoxicação experimental. França et al. (2009) observaram alterações nas células de Kupffer em ratos intoxicados experimentalmente nas doses de 200mcg/Kg e 300mcg/Kg e Jarrar (2011) observou esta ativação do mecanismo de defesa celular em três carneiros intoxicados por serpente peçonhenta.

De acordo com MacLachlan e Cullen (1998) a morfologia da lesão hepática induzida por toxinas varia consideravelmente com o tipo, dose e a duração da exposição à toxina. Reações do hepatócito à agressão tóxica incluem tumefação celular e esteatose,

acompanhada ou não de colestase. Em casos de intoxicação suficientemente grave, isso pode progredir para necrose e insuficiência hepática. Segundo Yeh (2011) substâncias tóxicas podem provocar inflamação e degeneração gordurosa do fígado através da lesão de mitocôndrias, incapacitando o fígado de metabolizar adequadamente as gorduras no órgão, o que pode levar à destruição de células e inflamação.

Observou-se neste estudo a ocorrência de necrose no M2 para os grupos V e VS. No M24 a necrose foi observada nos grupos S, V e VS. Estes resultados indicam que o veneno crotálico provoca o aparecimento da necrose nos momentos iniciais e que o soro isoladamente também pode influenciar no aparecimento da necrose, porém após 24 horas da administração. Estes achados concordam com o estudo de Barraviera et al. (1989) que observaram, no exame anatomopatológico do fígado, extensa necrose em um humano que foi a óbito após acidente com Cdt. e tratamento com soro antiofídico. Sangiorgio et al. (2008) constatarem necrose hepática em dois cães intoxicados. França et al. (2009) observaram necrose hepática em ratos intoxicados com 300mcg/Kg, 12 horas após a intoxicação. Mais uma vez, observamos que quanto maior a dose do veneno mais precoce são as alterações encontradas.

Neste estudo, foi possível observar deposição de material hialino no interior do citoplasma do hepatócito em todos os momentos estudados do grupo V e nos momentos M2 e M8 do grupo VS. Os corpúsculos de Mallory são encontrados no interior dos hepatócitos na forma de condensações grosseiras de material filamentar, eosinófilos, próximas ao núcleo da célula. Esta degeneração de hialina esta relacionada com doenças hepáticas, cirrose e hepatites (Saxena, 2011).

Conclusão

Nas condições em que o experimento foi realizado, conclui-se que:

Em ratos *Wistar*, o veneno crotálico isolado na dose de 1mg/Kg alterou a TR, os exames laboratoriais de AST e FA e provocou as seguintes alterações histológicas no fígado: Infiltrado inflamatório, hiperplasia de células de Kupffer, necrose, degeneração de hialina. O soro antibotrópico crotálico induziu alterações laboratoriais na FA e histológicas (Infiltrado inflamatório, hiperplasia de células de Kupffer, necrose e degeneração de hialina). E o veneno quando associado ao soro alterou os exames clínicos (FC, TR e f), laboratoriais (FA, AST e ALT) e histológicos (Infiltrado inflamatório, hiperplasia de células de Kupffer, necrose e degeneração de hialina).

No entanto, são necessários novos estudos com o veneno crotálico e a soroterapia para que se possa entender o mecanismo da hepatotoxicidade, a contribuição do tempo nas alterações e a porcentagem de contribuição do soro isolado na hepatotoxicidade.

Além disso, investigar a necessidade de acrescentar tratamentos complementares à soroterapia para a proteção hepática.

Declaração de Conflito de Interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Referências

- Amaral, C.F.S., Magalhães, R.A., Rezende, N.A., 1991. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 33, 251-255.
- Azevedo Marques, M.M., Cupo, P., Coimbra, T. M., Hering, S. E., Rossi, Laure, C. J., 1985. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. Toxicon. 23, 631-636.
- Bancher, W., Rosa, R.R., Furlanetto, R.S., 1973. Estudos sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervoso, renal, hepático e muscular de *Mus musculus* (Linneus, 1758). Mem. Inst. Butantan. 47, 139-148.
- 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). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 37, 1, 63-69.
- Barraviera, B., Ferreira Júnior, R.S., 2007. Patogenia dos Acidentes Ofídicos. In Barraviera, B., Ferreira Júnior, R.S. Acidentes por animais peçonhentos. CEVAP-UNESP, 1ª edição.
- Barraviera, B., Bonjorno Júnior, 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. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 22, 5-12.
- Brasil. Portal da Saúde SUS, 2011. Situação Epidemiológica. Série histórica de casos de acidentes por animais peçonhentos 1999 - 2010. Fonte Sinan/SVS/MS, atualizada em 02/02/2011. Disponível http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1539 Acesso em: 26/06/2011.
- Brasil. Ministério da Saúde (MS) e Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), 2001. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília: MS/FUNASA.
- Cupo, P., Azevedo Marques, M. M., Hering, S. E., 1988. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 82, 924-929.
- Floriano, R.S., Nogueira, R.M.B., Sakate, M., Laposy, C.B., Motta, Y.P., Sangiorgio, F., David, H.C., Nabas, J.M., 2009. Effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae) leaf extract

combined with anti-venom serum on experimental *Crotalus durissus* (Squamata: Viperidae) envenomation in rats. *Rev. Biol. Trop.* 57, 4, 929-937.

França, R.F., Vieira, R.P., Ferrari, E.F., Souza R.A., Osório, R.A.L., Prianti Júnior, A.C.G., Hyslop, S., Zamuner, S.R., Cogo, J.C., Ribeiro, W., 2009. Acute Hepatotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake) venom in rats. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* (Online), 15, 61-78.

Graça, F. A. S., Peixoto, P. V., Coelho, C. D., Caldas, S. A., Tokarnia, C. H., 2008. Aspectos clínico-patológicos e laboratoriais do envenenamento crotálico experimental em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 28, 6, 261-270.

Jarrar, B. M., 2011. Histological alterations and biochemical changes in the liver of sheep following *Echis coloratus* envenomation. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 18, 169-174.

Lago, L.A., Ferreira, P.M., Facury Filho, E.J., Melo, M.M., Alzamora Filho, F., 2000. Quadro clínico do envenenamento crotálico experimental em bovinos (*Crotalus durissus terrificus*-crotamina positivo). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 37, 4, 312-315.

MacLachlan, N. J., Cullen, J.M. 1998. Fígado, Sistema Biliar e Pâncreas exócrino. In: Carlton, W.W., McGavin, M.D. *Patologia Veterinária Especial*. 2.ed. Artmed, São Paulo, pp.95-131.

Nogueira, R.M.B., Sakate, M., 2006. Clinical and hematological alterations in dogs during experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom and treated with antiophidic serum. *J. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 12, 2, 285-296.

Raiser, A.G., 2002. Choque, in: Andrade, S.F. *Manual de Terapêutica Veterinária*. 2.ed. Roca, São Paulo pp.504-521.

Saliba, A.M., Belluomini, H.E., Leinz, F.F., 1983. Pathology of experimental poisoning of cattle with *Crotalus* snake venom. *Dtsch. Tierarztl. Wochenscher.* 3, 513-517.

Sangiorgio, F., Sakate, M., Nogueira, R. M. B., Tostes, R. A., 2008. Histopathological evaluation in experimental envenomation of dogs with *Crotalus durissus terrificus* venom. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 14, 1, 83-87.

Saxena, R., 2011. Microscopic Anatomy, Basic Terms, and elemental Lesions. in: Saxena, R., *Practical Hepatic Pathology. A Diagnostic Approach*, Elsevier, Philadelphia, pp. 24-25.

Silva, J. G., Soley, B. S., Gris, V., Pires, A. R. A., Caderia, S. M. S. C., Eler, G. J., Hermoso, A. P. M., Bracht, A., Dalsenter, P. R., Acco, A. 2010. Effects of the *Crotalus durissus terrificus* Snake Venom on Hepatic Metabolism and Oxidative Stress. *J Biochem Molecular Toxicology.* 25, 3, 195-203.

Sousa e Silva, M.C., Tomy, S.C., Tavares, F.L., Navajas, L., Larsson, M.H., Lucas, S.R., Kogika, M.M., Sano Martins, I.S., 2003. Hematological, hemostatic and clinical chemistry disturbances induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom in dogs. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 491-500.

Wajchenberg, B.L., Sesso, J., Inague, T., 1954. Feições clínico-laboratoriais do envenenamento crotálico humano. *Rev. Ass. Med. Bras.* 1, 179-193.

World Health Organization, 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. *Who off set Publication*, n. 58.

Yeh, M. M., 2011. Nonalcoholic Fatty Liver Disease, in: Saxena, R., Practical Hepatic Pathology. A Diagnostic Approach, Elsevier, Philadelphia, pp. 435-440.

2. Anexos

Tabela 1 – Comparação entre grupos das variáveis paramétricas: Frequência Cardíaca (FC), Frequência Respiratória (f) e Temperatura Retal (TR).

Variável	Grupo	M2	M8	M24
		Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão
FC (bpm)	C	333,2 ± 30,35	326,0 ± 29,65	318,8 ± 29,76

	S	331,2 ± 16,09	314,8 ± 17,08	332,8 ± 15,87
	V	357,6 ± 25,80	338,4 ± 25,52	305,2 ^a ± 21,75
	VS	298,0 ± 57,08	338,0 ± 18,21	339,2 ± 21,97
f (mpm)	C	98,40 ± 16,57	96,0 ± 20,04	104,8 ± 23,99
	S	112,40 ± 23,28	115,2 ± 15,64	126,4 ± 22,80
	V	107,60 ± 12,99	112,8 ± 14,34	126,8 ^b ± 18,48
	VS	81,60 ± 12,54	130,8 ^{*a} ± 14,61	95,2 ± 15,75
TR (°C)	C	37,72 ± 0,48	37,97 ± 0,45	37,3 ± 0,63
	S	38,07 ± 0,46	37,79 ± 0,50	37,43 ^b ± 0,34
	V	38,45 [*] ± 0,63	38,15 ± 0,45	37,54 ^a ± 0,27
	VS	37,51 ± 0,52	38,27 ^b ± 0,41	37,94 [*] ± 0,42

Grupo controle (C)- solução salina, Grupo Soro Antiofídico (S), Grupo Veneno crotálico (V) e Grupo Veneno crotálico e soro antiofídico (VS) nos momentos de avaliação 2 horas (M2), 8 horas (M8) e 24 horas (M24). *Diferença considerada significativa (p<0.05) quando comparada ao grupo controle. ^aDiferença considerada significativa (p<0.05) quando comparada aos demais momentos dentro do mesmo grupo. ^bDiferença considerada significativa (p<0.05) quando comparada ao M2 dentro do mesmo grupo.

Tabela 2 - Comparação entre grupos da variável paramétrica Fosfatase Alcalina (FA) e das variáveis não paramétricas Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT).

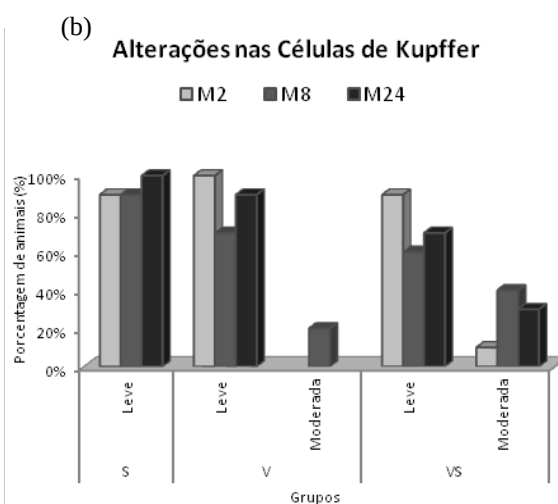
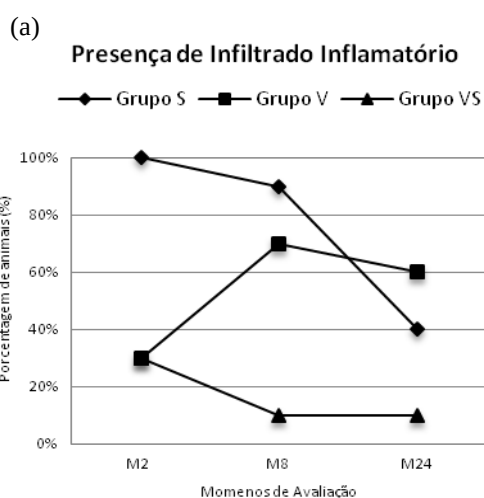
Variável	Grupo	M2		M8		M24	
		Média ± Desvio Padrão	Mediana (P-50)	Média ± Desvio Padrão	Mediana (P-50)	Média ± Desvio Padrão	Mediana (P-50)
FA (U/L)	C	90,9 ± 29,99	83,5	74,10 ± 23,44	82	88,20 ± 34,26	82
	S	329,2 ^{*d} ± 94,91	364	244,30 [*] ± 144,32	236	136,70 ± 49,98	120
	V	69,8 ± 15,66	65,5	68,10 ± 27,08	65	287,50 ^{*a} ± 167,56	287,5
	VS	349,9 [*] ± 63,76	348	314,40 [*] ± 196,40	382	423,40 ^{*a} ± 182,80	506,5
AST (U/L)	C	176,9 ± 38,3	168,5	189,6 ± 77,26	186	163 ± 53,99	151,5
	S	163,6 ± 70,09	142,5	143,2 ± 48,76	129	176,5 ± 82,00	158
	V	203,3 ± 79,86	165	309 ± 109,96	357,5	381,3 ± 34,32	371,0 ^{*b}
	VS	236,3 ± 66,6	220	581,2 ± 639,10	405,0 ^{*b}	1252,6 ± 604,99	1.382,5 ^{*b}
ALT (U/L)	C	135,2 ± 32,21	140	98,6 ± 16,51	103	98,3 ± 27,76	95,5
	S	94,5 ± 26,55	87,5	88,2 ± 15,61	87	104,7 ± 23,67	96,5
	V	71,9 ± 24,13	64,0 ^{*a}	79,7 ± 19,29	72,5 ^a	126,7 ± 25,06	119,5 ^a
	VS	92,2 ± 25,97	82,5	105,1 ± 75,52	84	145,4 ± 34,53	146,0 ^{*a}

Grupo controle (C)- solução de cloreto de sódio 0,9%, Grupo Soro Antiofídico (S), Grupo Veneno crotálico (V) e Grupo Veneno crotálico e soro antiofídico (VS) nos momentos de avaliação 2 horas (M2), 8 horas (M8) e 24 horas (M24). *Diferença considerada significativa (p<0.05) quando comparada ao grupo controle. ^aDiferença considerada significativa (p<0.05) quando comparada aos demais momentos dentro do mesmo grupo. ^bDiferença considerada significativa (p<0.05) quando comparada ao M2 dentro do mesmo grupo. ^cDiferença considerada significativa (p<0.05) quando comparada ao M8 dentro do mesmo grupo. ^dDiferença considerada significativa (p<0.05) quando comparada ao M24 dentro do mesmo grupo.

Tabela 3 – Comparação entre grupos das variáveis não paramétricas: Infiltrado Inflamatório, células de Kupffer e Degeneração de Hialina.

Variável	Grupo	M2	M8	M24
		Mediana (P-50)	Mediana (P-50)	Mediana (P-50)
Degeneração de Hialina (PAS c/ diastase)	C	0	0	0
	S	0	1,0	0
	V	2,0*	2,0*	2,0*
	VS	1,0*	1,5*	0
Células de Kupffer (HE)	C	0	0	0
	S	1,0*	1,0*	1,0*
	V	1,0*	1,0*	1,0*
	VS	1,0*	1,0*	1,0*
Infiltrado Inflamatório (HE)	C	0	0	0
	S	1,0*	1,0*	0
	V	0	1,0*	1,0*
	VS	0	0	0

Grupo controle (C)- solução de cloreto de sódio 0,9%, Grupo Soro Antiofídico (S), Grupo Veneno crotálico (V) e Grupo Veneno crotálico e soro antiofídico (VS) nos momentos de avaliação 2 horas (M2), 8 horas (M8) e 24 horas (M24). Valores de Mediana e porcentagem de animais que apresentaram alterações (abaixo ou acima dos valores normais para a espécie). *Diferença considerada significativa ($p < 0.05$) quando comparada ao grupo controle.



(c)

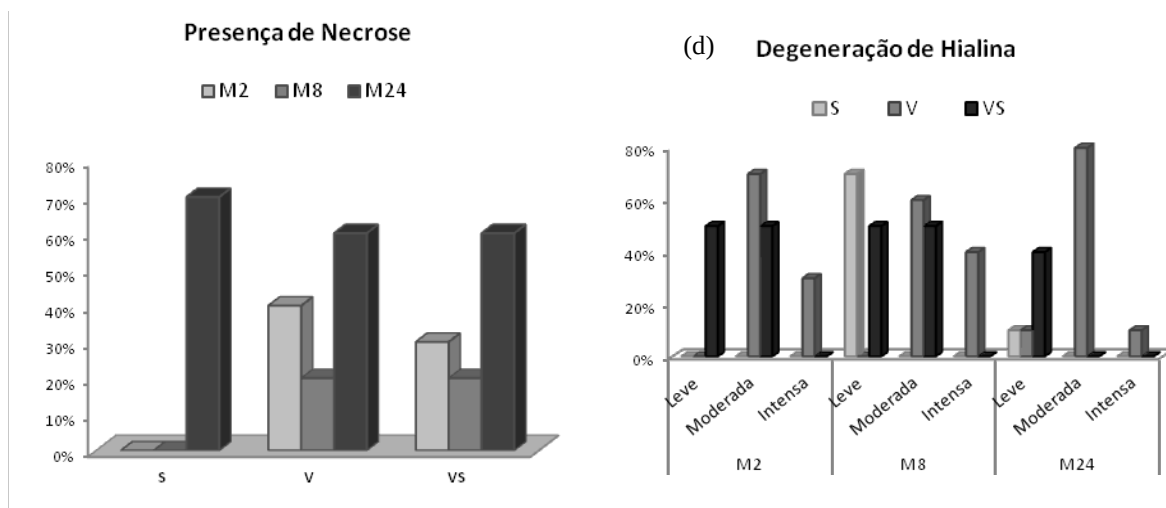


Figura 1 – Análise Histológica do Fígado. Grupo Soro Antiofídico (S), Grupo Veneno crotálico (V) e Grupo Veneno crotálico e soro antiofídico (VS) nos momentos de avaliação 2 horas (M2), 8 horas (M8) e 24 horas (M24). (a) Porcentagem de animais com presença de Infiltrado Inflamatório. (b) Porcentagem de animais com hiperplasia nas células de Kupffer. (c) Porcentagem de animais com necrose hepática. (d) Porcentagem de animais com degeneração de hialina classificada como leve, moderada ou intensa.

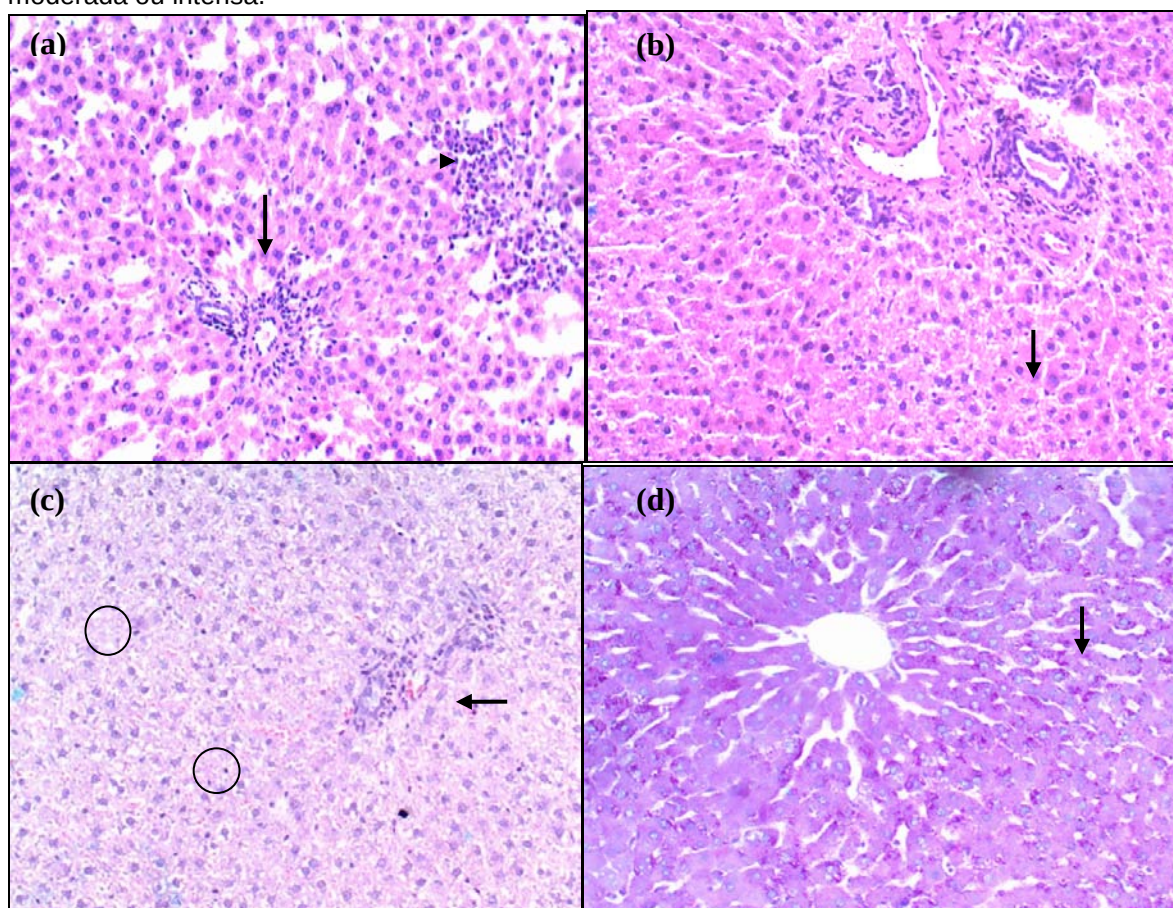


Figura 2 – Análise Histológica. (a) Corte histológico de fígado de rato do grupo S com moderado infiltrado misto no espaço porta (seta) e entre hepatócitos (cabeça de seta) (HE, 100x). (b) Corte histológico de fígado de rato do grupo S com aumento discreto no número de células de Kupffer (setas) (HE, 100x). (c) Corte histológico de fígado de rato do grupo V com infiltrado linfocitário periportal (seta), focos de necrose hepatocelular (círculos) e aumento discreto no número de células de Kupffer (seta) (HE, 100x). (d) Corte histológico de fígado de rato do grupo S com Degeneração de Hialina. Deposição de material hialino no interior do citoplasma do hepatócito (seta) (PAS com diastase, 100x).

NORMAS DA REVISTA



TOXICON

An Interdisciplinary Journal on the Toxins Derived from Animals, Plants and Microorganisms

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0041-0101

DESCRIPTION

Toxicon's "aims and scope" are laid down in the journal as:

To publish:

articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms papers on novel findings related to the chemical, pharmacological, toxicological, and immunological properties of natural toxins molecular biological studies of toxin and other genes from poisonous and venomous organisms that advance understanding of the role or function of toxins clinical observations on poisoning and envenoming where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been obtained material on the use of toxins as tools in studying biological processes and material on subjects related to venom-antivenom problems review articles on problems related to toxinology.

And

To encourage the exchange of ideas, sections of the journal may be devoted to Short Communications, Letters to the Editor and activities of the International Society on Toxinology.

Toxicon strives to publish articles that are current and of broad interest and importance to the toxinology research community. Emphasis will be placed upon articles that further the understanding and knowledge of toxinology.

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
 Cambridge Scientific Abstracts
 Chemical Abstracts
 Current Contents/BIOMED Database
 Current Contents/Life Sciences
 Current Contents/SciSearch Database
 Current Contents/Science Citation Index
 EMBASE
 EMBiology
 Elsevier BIOBASE
 MEDLINE®
 PASCAL/CNRS
 Research Alert
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Alan L. Harvey, Strathclyde Institute for Drug Research (SIDR), Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences (SIPBS), University of Strathclyde, The John Arbuthnott Building, 27 Taylor Street, Glasgow, G4 0NR, UK, Fax: 44 141 552 8376, Email: toxicon@strath.ac.uk

Honorary Editors

Philip Rosenberg, 37 Lincoln Avenue, West Orange, NJ 07052-2333, USA

Review Editor

Peter N. Strong, Sheffield Hallam University, Division of Biomedical Sciences, Sheffield, S1 1WB, UK

Mini-Review Editors

Yara Cury, Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brazil, 1500, 05503-900 São Paulo, Brazil
Raymond S. Norton, Medicinal Chemistry and Drug Action, Inst. of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Monash University, Parkville Campus, 381 Royal Parade, Parkville, VIC 3052, Australia

Classic Toxins Review Editor

Edward G. Rowan, Dept. of Physiology and Pharmacology, Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Sir John Arbuthnott Building, 27 Taylor Street, Glasgow, G4 0NR, UK

Editorial Council

K. Aktories, Freiburg, Germany
I. Asuzu, Nsukka, Nigeria
G.L. Boyer, Syracuse, USA
B.W. Brooks, Waco, TX, USA
J.J. Calvete, Valencia, Spain
C.R. Carlini, Porto Alegre RS, Brazil
E.E. Creppy, Bordeaux Cedex, France
F. Ducancel, Gif-Sur-Yvette, France
M. Edery, Paris Cedex 05, France
J.W. Fox, Charlottesville, VA, USA
P. Gopalakrishnakone, Singapore
J.M. Gutiérrez, San José, Costa Rica
R.A. Harrison, Liverpool, UK
W.C. Hodgson, Clayton, VIC, Australia
R.J. Huxtable, Tucson, AZ, USA
G.K. Isbister, Callaghan, NSW, Australia
M. Ismail, Cairo, Egypt
E. Kalapothakis, Belo Horizonte, MG, Brazil
W.R. Kem, Gainesville, FL, USA
R.M. Kini, Singapore
I. Krizaj, Ljubljana, Slovenia
M. Lazdunski, Valbonne, France
R.J. Lewis, St Lucia, QLD, Australia

F.S. Markland Jr., Los Angeles, CA, USA
M.-F. Martin-Eauclaire, Marseille, France
D. Mebs, Frankfurt, Germany
E. Moczydlowski, Albuquerque, NM, USA
C. Montecucco, Padova, Italy
B.A. Neilan, Sydney, NSW, Australia
G.M. Nicholson, Sydney, NSW, Australia
B.M. Olivera, Salt Lake City, UT, USA
S. Pflugmacher, Berlin, Germany
M.A. Poli, Ft. Detrick, MD, USA
L.D. Possani, Cuernavaca, Mexico
S.M.T. Serrano, Sao Paulo, Brazil
W.T. Shier, Minneapolis, MN, USA
K. Sivonen, Helsinki, Finland
T. Tamiya, Tokyo, Japan
A. Tubaro, Trieste, Italy
J. Tytgat, Leuven, Belgium
D.A. Warrell, Oxford, UK
J. White, North Adelaide, SA, Australia
Y. Zhang, Yunnan, China
R.B. Zingali, Rio de Janeiro, Brazil

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Official Journal of The International Society on Toxinology (<http://www.toxinology.org/>), *Toxicon's* "aims and scope" are laid down in the journal as:

To publish:

articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms papers on novel findings related to the chemical, pharmacological, toxicological, and immunological properties of natural toxins molecular biological studies of toxin and other genes from poisonous and venomous organisms that advance understanding of the role or function of toxins clinical observations on poisoning and envenoming where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been obtained material on the use of toxins as tools in studying biological processes and material on subjects related to venom-antivenom problems review articles on problems related to toxinology.

And

To encourage the exchange of ideas, sections of the journal may be devoted to Short Communications, Letters to the Editor and activities of the International Society on Toxinology.

Toxicon strives to publish articles that are current and of broad interest and importance to the toxinology research community. Emphasis will be placed upon articles that further the understanding and knowledge of toxinology.

Types of paper

Short Communications: Short communications differ from full manuscripts only in that the research study does not lend itself to an extended presentation. Even though brief, the Short communication should represent a complete, coherent and self contained study. The quality of Short Communications is expected to be as good as that of full articles, and both full articles and Short communications will be refereed in an identical manner. The form is identical to that for a full article except that the report should not be divided into Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. An abstract of not more than 75 words should be provided. The Short Communication may not be longer than five double-spaced typewritten pages (not including references, tables and figures) and should include not more than two tables of two figures or one of each.

Letters to the Editor: These may be published if judged by the Editor to be of interest to the broad field of toxinology or of special significance to a smaller group of workers in a specialized field of toxinology. They should be headed "Letter to the Editor" which should be followed by a title for the communication. Names of authors and affiliations should be at the end of the letter.

Announcements: *Toxicon* will only accept for publication announcements of great interest to toxinologists, such as notices of appropriate meetings and symposia and activities of the International Society of Toxinology.

Reviews and mini-Reviews: Articles of interest to toxinologists which are published in journals other than *Toxicon* may be abstracted in the Reviews section of *Toxicon*. Readers who feel that a particular article or book should be abstracted in this section are encouraged to bring their opinions to the attention of one of the Review Editors. Mini-Reviews and proposals for mini-Reviews are welcome

Molecular Biology: Papers on molecular biological aspects of toxins are welcome. They can include cloning, expression, genetic and related studies. The papers must add to the understanding of the role or function of toxins. Papers providing cDNA sequences without any relevant conclusions are not acceptable. If cDNA sequences are included, authors must guarantee that the sequences will be deposited in a public gene bank before the publication of the paper in *Toxicon*.

Clinical reports: *Toxicon* will publish clinical reports on poisoning where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been established. Please observe the following: [Clinical Reports Guidelines](#)

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Toxicon requires full disclosure of all potential conflicts of interest. All sources of funding supporting the work are to be declared. At the end of the manuscript text (and in the cover letter of the manuscript), under a subheading "Conflict of Interest statement", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. If there are no conflicts of interest, the authors should state, "The authors declare that there are no conflicts of interest." Signed copies of the *Toxicon* Conflict of Interest policy form are required upon submission. The Conflict of Interest policy form can be downloaded [here](#). In order to minimize delays, we strongly advise that the signed copies of these statements are prepared before you submit your manuscript. The corresponding author is responsible for sharing this document with all co-authors. Each and every co-author must sign an individual disclosure form. The corresponding author is responsible for uploading their form and those of their co-authors.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are

included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases; please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding Body Agreements and Policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy:

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Referees

The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to five individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 125 characters including spaces, or, maximum 20 words per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- **GenBank**: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- **PDB**: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- **CCDC**: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- **TAIR**: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- **NCT**: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- **OMIM**: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- **MINT**: Molecular INTERactions database (MINT ID: 6166710)
- **MI**: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- **UniProt**: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2011 Elsevier | <http://www.elsevier.com>