

**EFEITOS DE DIFERENTES ANTIVENENOS SOBRE A FUNÇÃO HEPÁTICA EM  
RATOS WISTAR**

HERNANI CESAR BARBOSA SANTOS

**EFEITOS DE DIFERENTES ANTIVENENOS SOBRE A FUNÇÃO HEPÁTICA EM  
RATOS WISTAR**

HERNANI CESAR BARBOSA SANTOS

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.

Orientador: Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira.

636.089 59 Santos, Hernani Cesar Barbosa.  
S237e Efeitos de diferentes antivenenos sobre a  
função hepática em ratos wistar / Hernani Cesar  
Barbosa Santos. – Presidente Prudente, 2014.  
49 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,  
Presidente Prudente, SP, 2014.

Bibliografia.

Orientador: Rosa Maria Barilli Nogueira.

1. Antiveneno. 2. Alteração hepática. 3.  
Acidente ofídico. I. Efeitos de diferentes antivenenos  
sobre a função hepática em ratos wistar.

**HERNANI CESAR BARBOSA SANTOS**

**EFEITOS DE DIFERENTES ANTIVENENOS SOBRE A FUNÇÃO HEPÁTICA  
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, 24 de março de 2014

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Rita de Cássia Collicchio Zuanaze  
Faculdade de Jaguariúna-FAJ  
Jaguariúna-SP

---

Prof. Dra. Cecília Braga Laposy  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente-SP

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho, primeiramente a minha esposa e filhos, pois sei que algumas vezes falhei, por minhas ausências e falta de tempo, mas o fiz por pensar justamente no futuro deles.*

*A minha orientadora, Profa. Rosa, que é um exemplo profissional e pessoal, por me acolher com sua sabedoria e dedicação.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Universidade do Oeste Paulista, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa pelo apoio financeiro.*

*Aos colaboradores do Biotério da UNOESTE e pelo apoio com a lida dos animais.*

*Ao Instituto Butantã e Vencofarma® e pelo fornecimento dos soros antiofídicos*

*A Profa. Dra. Cecilia pela realização dos exames bioquímicos.*

*Ao Prof. Dr. Rogério Giufrida pela análise estatística.*

*Ao Prof. Dr. Ozimar pela realização dos exames histológicos.*

*“Verdades da Profissão de Professor*

*Ninguém nega o valor da educação e que um bom professor é imprescindível. Mas, ainda que desejem bons professores para seus filhos, poucos pais desejam que seus filhos sejam professores. Isso nos mostra o reconhecimento que o trabalho de educar é duro, difícil e necessário, mas que permitimos que esses profissionais continuem sendo desvalorizados. Apesar de mal remunerados, com baixo prestígio social e responsabilizados pelo fracasso da educação, grande parte resiste e continua apaixonada pelo seu trabalho.*

*A data é um convite para que todos, pais, alunos, sociedade, repensemos nossos papéis e nossas atitudes, pois com elas demonstramos o compromisso com a educação que queremos. Aos professores, fica o convite para que não descuidem de sua missão de educar, nem desanimem diante dos desafios, nem deixem de educar as pessoas para serem “águias” e não apenas “galinhas”. Pois, se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela, tampouco, a sociedade muda.” (Paulo Freire)*

## RESUMO

### Efeitos de Diferentes Antivenenos sobre a Função Hepática em Ratos Wistar

Os acidentes ofídicos em alguns países estão entre as 10 principais causas de morte em seres humanos e a soroterapia heteróloga é o único tratamento eficaz há mais de 100 anos. No entanto, problemas na sua produção e controle até hoje não foram totalmente resolvidos e reações adversas precoces e tardias à soroterapia são comuns. Na maioria dos relatos de caso, os achados clínicos e laboratoriais estão relacionados ao sujeito que já havia sido picado e recebido a soroterapia, assim fica a dúvida se as alterações só estão relacionadas à ação do veneno ou também a ação do soro. Estudos relatam evidências que quantidades excessivas de antiveneno estão sendo utilizadas, resultando em uma elevada incidência de reações. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a ação de diferentes antivenenos sobre a função hepática em ratos Wistar. Cento e cinquenta animais foram distribuídos em cinco grupos como se segue: grupo 1 que receberam soro anticrotálico para uso humano; grupo 2 que receberam soro antibotrópico para uso humano; grupo 3 que receberam soro antibotrópico-crotálico para uso humano; grupo 4 que receberam soro antibotrópico-crotálico para uso veterinário; grupo 5 que receberam solução fisiológica. Foi realizada dosagem sérica de alaninoaminotransferase, aspartato aminotransferase, gama glutamiltransferase, fosfatase alcalina e histopatologia do fígado com 2, 8 e 24 horas. Os testes estatísticos utilizados foram de análise de variância com contrastes pelo método de Tukey, Anova e Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5%. Nos grupos tratados com antiveneno, observou-se aumento de alanino aminotransferase e da fosfatase alcalina, ausência de alteração de aspartato aminotransferase e gama glutamiltransferase, além de congestão, diminuição de glicogênio, degeneração vacuolar, hiperplasia das células de Kupffer e necrose centrolobular na análise histopatológica. Os antivenenos utilizados neste ensaio, quando administrados por via intraperitoneal, na dose de 2 mL, causaram alterações hepáticas em ratos Wistar, sugerindo assim novos estudos relacionados a adequação da conduta quanto a dose de soro a ser usada no acidente ofídico, necessidade de produção de soros de maior qualidade e de maior segurança aos pacientes.

**Palavras Chaves:** antiveneno, alteração hepática, acidente ofídico.

## ABSTRACT

### Effects of Different Antivenom about Liver Function in Wistar Rats

**Introduction:** Snakebites in some countries are among the 10 leading causes of death and heterologous antivenom is the only effective treatment for over 100 years. However, problems in its production and control until now have not been fully resolved and early and late adverse reactions are common serotherapy. In most case reports, clinical and laboratory findings are related to the subject that had been chopped and received antivenom, so there is the question whether the changes are related only to the action of the venom and also the action of the serum. Studies report evidence that excessive amounts of antivenom are in use, resulting in a high incidence of reactions. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of different antivenoms on liver function in Wistar rats. One hundred and fifty animals were distributed in five groups as follows: group 1 (G1) - received anticrotalic serum for human use; group 2 (G2) - antivenom for human use; group 3 (G3) - serum antithropic-crotalic for human use; group 4 (G4) - serum antithropic-crotalic for veterinary use; group 5 (G5 control) - received saline. Serum dosage of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gammaglutamyltransferase, alkaline phosphatase and liver histopathology with 2, 8 and 24 hours was performed. The statistical analyzes were performed using analysis of variance with contrasts using the Tukey method, ANOVA and Kruskal-Wallis. The level of significance was 5%.

**Results:** In the groups treated with antivenom, we observed increased alanine aminotransferase and alkaline phosphatase, no change in aspartate aminotransferase and gammaglutamyltransferase, and congestion, decreased glycogen, vacuolar degeneration, Kupffer cell hyperplasia and centrilobular necrosis in the histopathological analysis. **Conclusions:** The antivenom used in this assay when administered intraperitoneally, caused hepatic changes in Wistar rats, suggesting new studies related to adequacy in conduct as the dose of serum to be used in snakebite, need to produce higher quality sera and greater safety for patients.

**Keywords:** antivenom, liver changes, snakebite.

## LISTA DE SIGLAS

ALP – Fosfatase alcalina.

ALT – Alanina aminotransferase.

AST – Aspartato aminotransferase.

BPF – Boas práticas de fabricação.

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

GGT – Gama glutamiltransferase

HE – Hematoxilina-eosina.

IgG – Imunoglobulina.

IgM – Imunoglobulina.

OMS – Organização Mundial da Saúde.

RP – Reações precoces.

RT – Reações tardias.

SAB – Soro antibotrópico.

SABC – Soro antibotrópico-crotálico.

SAC – Soro anticrotálico.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1 Histórico da Sorologia .....	11
1.2 Tratamento do Acidente Ofídico.....	13
1.3 Recomendações para Armazenamento dos Antivenenos.....	16
1.4 Reações Adversas a Soroterapia.....	17
REFERÊNCIAS.....	19
2 ARTIGO CIENTIFICO .....	22
ANEXO – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA.....	41

## **1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

As estimativas mais recentes publicadas, da ocorrência de acidentes ofídicos em seres humanos publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) sugerem pelo menos 5 milhões de picadas de cobra, com 2,5 milhões de acidentes por outros animais peçonhentos a cada ano e 125 mil mortes. Embora estes números sejam extrapolações estando sujeito a contestação, a maioria dos especialistas concordam que mortes por picada de cobra em todo o mundo estão na ordem de 100 mil a cada ano. É a principal doença no meio rural em algumas partes de países tropicais, ocupando 10% ou mais de vagas em leitos hospitalares e estão entre as 10 principais causas de morte (WHITE et al., 2003).

No Brasil ocorrem cerca de 20.000 acidentes ofídicos a cada ano e 2.000 deles no estado de São Paulo (BARRAVIERA et al., 1995; BONAN et al., 2010). Estes acidentes praticamente não alteraram o perfil epidemiológico nos últimos 100 anos, ocorrendo com maior frequência no início e final do ano, em pessoas do sexo masculino, trabalhadores rurais, na faixa etária produtiva de 15 a 49 anos, atingindo principalmente os membros inferiores (BOCHNER;STRUCHINER, 2003).

### **1.1 Histórico da Sorologia**

Os soros imunológicos utilizados para neutralizar venenos são também chamados de antiveneno, são imunoglobulinas(IgG) nas quais contém anticorpos ou fragmentos de anticorpos, dependendo da sua produção, para uso clínico específico contra venenos considerados antígenos (LOVRECEK; TOMIC, 2011).

Sua produção ocorre através de um processo biotecnológico que envolve a utilização de sangue de um animal, geralmente o equino, o qual é processado e purificado antes da obtenção do produto final (MORAIS; MASSALDI, 2006).

Nos casos de neutralização de antígenos pelos antivenenos sua eficácia é crucial para manutenção da vida dos pacientes comprometidos, principalmente em regiões subdesenvolvidas ou áreas com pouca infraestrutura de

suporte e sem assistência médica especializada (LOVRECEK; TOMIC, 2011).

Logo após a descoberta dos soros, problemas na produção, controle e uso dos antivenenos, purificação do produto, potência e padronização foram observados, no entanto até hoje não foram totalmente resolvidos e podem provocar efeitos colaterais graves devido à hipersensibilidade aos componentes heterólogos do sangue animal (LOVRECEK; TOMIC, 2011).

Alguns estudos são direcionados visando à produção de antivenenos com maior nível de anticorpos dirigidos contra componentes dos venenos e assim diminuindo a quantidade de proteínas inativas que podem causar reações alérgicas. Entre estes estudos podemos citar, o processamento para precipitação de proteínas inativas, métodos cromatográficos e clivagem das imunoglobulinas para formar fragmentos de anticorpo conhecido como Fab ou F(ab)<sub>2</sub> (HEARD; MALLEY; DART, 1999).

Apesar de todos estes esforços ainda existe muitos problemas relacionados aos antivenenos, mesmo os preparados com uma IgG purificada esta associado a um elevado grau de hipersensibilidade. No entanto, a segurança e eficácia das preparações de Fab nos seres humanos devem ser validadas antes de serem utilizadas, apesar das reações anafiláticas serem mais facilmente controladas do que os resultados de envenenamentos graves (KRIFI; EL AYEB; DELLAGI, 1999).

Outros fatores, incluindo os de caráter econômico, tais como custos crescentes de produção dos antivenenos, modernização e controle de qualidade, problemas logísticos na distribuição e manutenção de uma cadeia de frio (difíceis de contornar em áreas pobres), tornam a produção mundial deficitária, e o número de fabricantes deste grupo de medicamentos é decrescente, principalmente no continente Africano, resultando em falta de acessibilidade deste produto que pode salvar vidas (WHITE et al, 2003; LOVRECEK; TOMIC, 2011).

Morais e Massaldi (2006), demonstraram que a produção de antivenenos, devido aos custos fixos, pode ser economicamente viável, aumentando o número de frascos (doses) produzidos por ano dentro da mesma instalação e tecnologia, evitando ociosidade de equipamentos que acarretam em aumento do custo unitário dos frascos produzidos.

Na América Latina, a produção é realizada essencialmente sem fins lucrativos por instituições públicas, cuja capacidade é geralmente limitada as necessidades do país, com pouco ou nenhum excedente (MORAIS; MASSALDI, 2006).

Por outro lado, autoridades competentes são obrigadas a monitorar e controlar a implementação dos avanços tecnológicos na produção, qualidade segurança e eficácia dos medicamentos. Iniciativas globais destinadas a aumentar e melhorar a produção e disponibilidade dos antivenenos onde eles são mais necessários são apoiadas pela OMS (LOVRECEK;TOMIC, 2011).

Estudos recentes têm demonstrado que muitos antivenenos disponíveis são de baixa qualidade e podem apresentar altos índices de reações adversas, ou pouca capacidade de neutralização dos venenos (WHITE et al, 2003). Atualmente se busca antivenenos de melhor qualidade a um custo acessível (MORAIS; MASSALDI, 2009).

## **1.2 Tratamento do Acidente Ofídico**

Segundo Murtaugh e Kaplan (1992), vários fatores podem contribuir para a gravidade do acidente ofídico, dentre estes, encontram-se a variação individual (idade, peso, condições gerais do organismo), a quantidade de veneno inoculada, o número de picadas, o local atingido e o tempo decorrido até o tratamento.

O acidente ofídico de maior ocorrência na América do Sul é o acidente botrópico seguido do crotálico e ambos podem ser classificados em leve, moderado e grave, segundo a Fundação Nacional de Saúde (BRASIL. Ministério da Saúde, 2001) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada no acidente crotálico em humanos.

Manifestações e Tratamento	Classificação (Avaliação Inicial)		
	Leve	Moderado	Grave
Fácies miastêmica/Visão turva	Ausente ou tardia	Discreta ou evidente	Evidente
Mialgia	Ausente ou discreta	Discreta	Intensa
Urina vermelha ou Marrom	Ausente	Pouco evidente ou ausente	Presente
Oligúria/Anúria	Ausente	Ausente	Presente ou ausente
Tempo de Coagulação (TC)	Normal ou alterado	Normal ou alterado	Normal ou alterado
Soroterapia (nº ampolas) SAC ou SABC	5	10	20
Via de administração	INTRAVENOSA		

Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde (2001)

Tabela 2 – Classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada no acidente botrópico em humanos.

Manifestações e Tratamento	Classificação (Avaliação Inicial)		
	Leve	Moderado	Grave
Locais	Ausente ou discreta	Evidente	Intensas
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Dor</li> <li>▪ Edema</li> <li>▪ Equimose</li> </ul>			
Sistêmicas	Ausente ou discreta	Discreta	Intensa
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Hemorragia grave</li> <li>▪ Choque</li> <li>▪ Anúria</li> </ul>			
Urina vermelha ou Marrom	Ausente	Pouco evidente ou ausente	Presente
Tempo de Coagulação (TC)*	Normal ou alterado	Normal ou alterado	Normal ou alterado
Soroterapia (nº ampolas) SAC ou SABC	2 - 4	4-8	12
Via de administração	INTRAVENOSA		

Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde (2001)

Como a captura da serpente na maioria das vezes não é realizada, seja por falta de preparo, indisponibilidade de equipamento ou tempo, a identificação da serpente na maioria das vezes não é realizada, não sendo possível a redução do uso do antiveneno ou até mesmo o direcionamento de um antiveneno específico. (ISBISTER, 2005). A confirmação laboratorial do acidente pode ser feita através de antígenos do veneno, que podem ser detectados no sangue através da técnica de Enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA, no entanto não esta disponível em todos os pronto atendimentos e é de alto custo (PEREIRA; PINHO, 2001).

Araújo e Belluomini (1960-62) observaram que a dose de 1mg/kg de

dos venenos botrópico e crotálico em animais, pode ser letal sendo que equinos, ovinos e bovinos foram os mais sensíveis, seguidos de forma decrescente pelos caprinos, caninos, coelhos, suínos, cobaios, camundongos, felinos, hamsters e rato. O único tratamento eficaz para neutralizar a ação dos venenos botrópico e crotálico é por meio da soroterapia heteróloga, como os soros específicos antiofídico antibotrópico (SAB), anticrotálico (SAC) ou o soro polivalente antibotrópico-crotálico (SABC).

Como o objetivo é neutralizar a maior quantidade possível do veneno circulante, independentemente do peso do paciente, o soro deve ser administrado o mais precocemente possível pela via intravenosa, pois quanto mais rápida a distribuição do soro no organismo, maior será a quantidade de veneno neutralizada (JORGE; RIBEIRO, 1989, 1992; SOERENSEN et al., 1993; RIBEIRO et al., 1993; SAKATE, 2002). As vias subcutânea e intramuscular podem ser consideradas quando houver o impedimento do uso da via intravenosa (SAKATE, 2002). O soro bivalente é o mais facilmente encontrado para utilização em animais e o específico para uso em humanos.

### **1.3 Recomendações para Armazenamento dos Antivenenos**

É recomendado pela OMS que os soros sejam apresentados na forma liofilizada, conservados em geladeira à temperatura de 4 a 8°C positivos, por no máximo 2 a 3 anos (BRASIL. Ministério da Saúde, 2001).

A exposição a elevadas temperaturas, estimulam a formação de agregados de proteína e o uso de estabilizadores tais como sorbitol e fenol podem reduzir este efeito negativo. Por outro lado, os efeitos dos conservantes mais comumente utilizados aumentam a formação de dímeros e agregados, podendo levar à ativação do complemento *in vitro*, enfraquecimento da interação entre leucócitos e endotélio, e mesmo o aumento ou a causa do aparecimento de determinados efeitos secundários (VOHRA; KELNER; CLARK, 2009; LOVRECEK; TOMIC, 2011).

## 1.4 Reações Adversas a Soroterapia

Não há consenso sobre a dose de soro antiofídico necessária após um acidente, devido a fatores que são impossíveis de se determinar, como quantidade do veneno inoculado, idade, tamanho da serpente, sendo assim a dose a ser administrada é uma questão controversa. (JORGE; RIBEIRO, 1989, 1992; RIBEIRO et al., 1993; SAKATE, 2002; AGARWAL et al., 2005; ISBISTER, 2005)

Heard, Malley e Dart (1999), expõe que o risco do antiveneno pode superar os benefícios, mas defendem que isto deva ser bem avaliado no tratamento de um paciente envenenado. Agarwal et al. (2005), relataram em seu estudo, semelhança na recuperação de pacientes tratados com altas e baixas doses de antiveneno, mas apontam para a redução de gastos econômicos e redução na incidência de anafilaxia precoce e reações tardias ao soro, quando baixas doses foram utilizadas.

De acordo com a Fundação Nacional de Saúde (BRASIL. Ministério da Saúde, 2001), a gravidade do acidente é que se determina a quantidade de soro a ser utilizada em humano e em animais deve ser utilizada uma quantidade de soro que neutralize no mínimo 100mg do veneno botrópico e 50mg do veneno crotálico (ARAÚJO; BELLUOMINI, 1960-62).

O prognóstico dos acidentes leves e moderados pode ser favorável nos pacientes atendidos nas primeiras seis horas após a picada (CARDOSO, 1990). Complicações e óbito relacionados ao acidente ofídico foram citados por Ribeiro et al. (1998), sendo relatados 79,1% dos óbitos por insuficiência renal aguda, 65,1% por insuficiência respiratória aguda (mais comum no acidente crotálico), 41,9% devido ao choque anafilático e 41,9% por sepse, esta última só observada no acidente botrópico. A maioria dos óbitos (67,6%) ocorreu cerca de três a cinco dias, e o restante (29,4%) nos dois primeiros dias.

As reações à soroterapia podem ser classificadas, em reações precoces e tardias. As primeiras reações, também denominadas de imediatas, geralmente ocorrem durante a infusão do antiveneno ou nas duas horas subsequentes, e são subdivididas em três tipos: reações anafiláticas, reações anafilatóides e reações pirogênicas (CUPO et al., 1991; HEARD; MALLEY; DART,

1999). Os sinais e sintomas mais frequentemente observados são urticária, prurido, tremores, dispnéia, tosse e náuseas (BRASIL. Ministério da Saúde, 2001).

Fatores como dose do antiveneno usada, via de administração, velocidade de infusão, qualidade de purificação e sensibilização prévia com algum tipo de soro heterólogo podem favorecer o aparecimento de reações precoces (BRASIL. Ministério da Saúde, 2001; CARDOSO et al., 1993; THEAKSTON, 1997).

As reações tardias, conhecidas como “doença do soro”, se manifestam por exantema pruriginoso, febre, artralgia, linfadenopatia, urticária, articulações edemaciadas, vermelhas e doloridas, ocorrendo geralmente entre cinco a 24 dias após o contato com o soro heterólogo em humanos, porém, não existem relatos sobre estes efeitos nos animais (BARRAVIERA; PERAÇOLI, 1994).

Além do tratamento específico com a soroterapia, outros procedimentos são de fundamental importância para o restabelecimento do paciente acometido. O tratamento geral no acidente inclui hidratação adequada, visando a estabilização da volemia, correção da desidratação, correção do quadro de acidose, preservação da função renal e prevenção de instalação de insuficiência renal aguda (SAKATE, 2002).

Outros procedimentos como o uso de torniquete, corte no local e sucção, uso de produtos químicos são contra indicados no acidente ofídico, pois podem agravar o quadro clínico do paciente (AMARAL et al., 1998).

Reações adversas como hepatotoxicidade e nefrotoxicidade são citadas na literatura em pacientes humanos, atendidos após o acidente ofídico pelas serpentes do gênero *Bothrops* ou *Crotalus*, no entanto em todos estes relatos os indivíduos foram avaliados em momentos onde já haviam sido picados e recebido a soroterapia (antiveneno), desta forma fica a dúvida se as alterações estão relacionadas somente a ação do veneno ou também a ação do soro (CARDOSO; BRANDO, 1982; BARRAVIERA et al., 1995; CASTRO, 2006; NAVARRO; SENIOR, 2006; CHANG; SCHAINO, 2007).

Este estudo teve como objetivo avaliar a ação de diferentes antivenenos sobre a função hepática em ratos Wistar. A hipótese deste estudo é que os antivenenos sejam capazes de induzir lesões hepáticas importantes mesmo em pequenas doses.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R. et al. Low dose of anti-snake venom is as effective as high dose in patients with severe neurotoxic snake envenoming. **Emergency Medicine Journal**, v. 22, p. 397-399, 2005.
- AMARAL, C. F. et al. Tourniquet ineffectiveness to reduce the severity of envenoming after *Crotalus durissus sp* snake bite in Belo Horizonte, Minas Gerais - Brazil. **Toxicon.**, v. 36, p. 805-808, 1998.
- ARAÚJO, P.; BELLUOMINI, H. E. Toxicidade de venenos ofídicos I. Sensibilidade específica de animais domésticos e de laboratório. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 30, p. 143-156, 1960-62.
- BARRAVIERA, B. et al. Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (Laurent, 1768) Snakes in Botucatu (State of São Paulo, Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, p. 63-69, 1995.
- BARRAVIERA, B.; PERAÇOLI, M. T. S. Soroterapia heteróloga. In: BARRAVIERA, B. (Coord.). **Venenos Animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994. p. 361-372.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 7-16, 2003.
- BONAN, P. R. F. et al. Perfil epidemiológico dos acidentes causados por serpentes venenosas no norte do estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 20, n. 4, p. 503-507, 2010.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnósticos e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2 ed. Brasília, 2001. p. 131.
- CARDOSO, J. L. C.; BRANDO, R. B. **Acidentes por animais peçonhentos: clínica e tratamento**. São Paulo: Liv. Santos, 1982. p. 243.
- CARDOSO, J. L. Ofidismo, aracneísmo, escorpionismo, epidemiologia, patogenia e clínica, diagnóstico e terapêutica. In: SOERESSEN, B. **Animais peçonhentos**. São Paulo: Atheneu, 1990. p. 109-138.
- CARDOSO, J. L. et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **International Journal of Medicine**, v. 86, n. 5, p. 315-325, 1993.
- CASTRO, I. Estudo da toxidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase na toxidade renal. **O Mundo da Saúde São Paulo**, v. 30, n. 4, p. 644-653, 2006.

- CHANG, C. Y., SCHAINO, T. D. Review: drug hepatotoxicity. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics's**, v. 25, p. 1135-51, 2007.
- CUPO, P. et al. Reações de hipersensibilidade imediatas após uso intravenoso de soros antivenenos: valor prognóstico dos testes de sensibilidade intradérmicos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, p. 115-122, 1991.
- HEARD, K.; MALLEY, G. F. O.; DART, R. C. Antivenom therapy in the Americas. **Drugs**, v. 58, n. 1, p. 5-15, 1999.
- ISBISTER, G. K. Snake antivenom research: the importance of case definition. **Emergency Medicine Journal**, v. 22, n. 6, p. 399-400, 2005.
- JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Acidentes por animais peçonhentos. In: AMATO NETO, V.; BALDY, J. L. S. **Doenças transmissíveis**. São Paulo: Sarvier, 1989. p. 133-141.
- JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 4, p. 347-354, 1992.
- KRIFI, M. N.; EL AYEB, M.; DELLAGI, K. The improvement and standardization of antivenom production in developing countries: comparing antivenom quality, therapeutical efficiency, and cost. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 5, n. 2, p. 128-141, 1999.
- LOVRECEK, D.; TOMIC, S. A century of antivenom. **Collegium Antropologicum School of Biological Anthropology**, v. 1, n. 35, p. 249-258, 2011.
- MORAIS, V.; MASSALDI, H. Economic evaluation of snake antivenom production in the public system. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 497-511, 2006.
- MORAIS, V. M.; MASSALDI, H. Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. 2-18, 2009.
- MURTAUGH, R. T.; KAPLAN, P. M. **Veterinary emergency and critical care medicine**. 1. ed. Missouri: Mosby-Year Book, 1992. p. 685.
- NAVARRO V. J.; SENIOR J. R. Drug related hepatotoxicity. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 731-739, 2006.
- PEREIRA, I. D.; PINHO, F. M. O. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 2-13, 2001.
- RIBEIRO, L. A. et al. Avaliação em camundongos da eficácia do antiveneno administrado no local da inoculação intramuscular do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 1, p.

23-27, 1993.

RIBEIRO, L. A. et al. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 312-318, 1998.

SAKATE, M. Terapêutica das intoxicações. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2002. p. 523-555.

SOERENSEN, B. et al. Importância da urgência na soroterapia dos acidentes por animais peçonhentos: estudo experimental em camundongos. **Unimar Ciências**, Marília, v. 2, p. 25-29, 1993.

THEAKSTON, R. D. G. An objective approach to antivenom therapy and assessment of first-aid measures in snake bite. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 91, p.857-865, 1997.

VOHRA, R.; KELNER, M.; CLARK, R. Preparation of crotaline F-ab antivenom (CroFab®) with automated mixing methods: in vitro observations. **Clinical Toxicology**, v. 47, p. 69-71, 2009.

WHITE, J. et al. Clinical Toxicology: where are we now? **Journal of Clinical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 263-276, 2003.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

# EFEITOS DE DIFERENTES ANTIVENENOS SOBRE A FUNÇÃO HEPÁTICA EM RATOS WISTAR

Hernani Cesar Barbosa Santos <sup>1\*§</sup>, Rosa Maria Barilli Nogueira <sup>2\*</sup>, Lucas Batista dos Santos <sup>3</sup>,  
Cecília Braga Laposy <sup>2</sup>, Rogério Giuffrida <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Discente do Mestrado em Ciência Animal (UNOESTE), Pres. Prudente-SP

<sup>2</sup> Docente do Mestrado em Ciência Animal (UNOESTE), Pres. Prudente-SP

<sup>3</sup> Discente do Curso de Graduação em Biologia (UNOESTE), Pres. Prudente-SP

\* Estes autores contribuíram igualmente para este trabalho

§ Autor correspondente

Endereços de Email:

HCBS: [hernani@unoeste.br](mailto:hernani@unoeste.br)

RMBN: [rosa@unoeste.br](mailto:rosa@unoeste.br)

LBS: [lucasbatista1989@hotmail.com](mailto:lucasbatista1989@hotmail.com)

CBL: [claposy@unoeste.br](mailto:claposy@unoeste.br)

RG: [rgiuffrida@unoeste.br](mailto:rgiuffrida@unoeste.br)

## Resumo

**Introdução:** Os acidentes ofídicos em alguns países estão entre as 10 principais causas de morte e a soroterapia heteróloga é o único tratamento eficaz há mais de 100 anos. No entanto, problemas na sua produção e controle até hoje não foram totalmente resolvidos e reações adversas precoces e tardias à soroterapia são comuns. Na maioria dos relatos de caso, os achados clínicos e laboratoriais estão relacionados ao sujeito que já havia sido picado e recebido a soroterapia, assim fica a dúvida se as alterações só estão relacionadas à ação do veneno ou também a ação do soro. Estudos relatam evidências que quantidades excessivas de antiveneno estão sendo utilizadas, resultando em uma elevada incidência de reações. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a ação de diferentes antivenenos sobre a função hepática em ratos Wistar. Cento e cinquenta animais foram distribuídos em 5 grupos como se segue: grupo 1 (G1)- receberam soro anticrotálico para uso humano; grupo 2 (G2)- soro antibotrópico para uso humano; grupo 3 (G3)- soro antibotrópico-crotálico para uso humano; grupo 4 (G4)- soro antibotrópico-crotálico para uso veterinário; grupo 5 (G5 controle)- receberam solução fisiológica. Foi realizada dosagem sérica de alaninoaminotransferase, aspartato aminotransferase, gama glutamiltransferase, fosfatase alcalina e histopatologia do fígado com 2, 8 e 24 horas. Os testes estatísticos utilizados foram de análise de variância com contrastes pelo método de Tukey, Anova e Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5%. **Resultados:** Nos grupos tratados com antiveneno, observou-se aumento de alanino aminotransferase e da fosfatase alcalina, ausência de alteração de aspartato aminotransferase e gama glutamiltransferase, além de congestão, diminuição de glicogênio, degeneração vacuolar, hiperplasia das células de Kupffer e necrose centrolobular na análise histopatológica. **Conclusões:** Os antivenenos utilizados neste ensaio, quando administrados por via intraperitoneal, causaram alterações hepáticas em ratos Wistar, sugerindo assim novos estudos relacionados a adequação da conduta quanto a dose de soro a ser usada no acidente ofídico, necessidade de produção de soros de maior qualidade e de maior segurança aos pacientes.

**Palavras Chaves:** antiveneno, alteração hepática, acidente ofídico.

## Introdução

No mundo atual ocorrem cerca 5 milhões de casos de acidentes ofídicos e 125 mil mortes. É a principal doença em meios rurais em países tropicais, ocupando 10% ou mais de vagas em leitos hospitalares, e em alguns países como África e América do Sul estão entre as 10 principais causas de morte [1]. Os soros imunológicos utilizados para neutralizar venenos, chamados de antivenenos, são imunoglobulinas (IgG) que contêm anticorpos para uso clínico específico contra venenos considerados antígenos [2].

Sua produção é feita através de um processo biotecnológico que envolve a utilização de sangue de um animal, geralmente o equino, o qual é processado e purificado antes da obtenção do produto final [3]. A eficácia dos antivenenos é crucial para manutenção da vida dos pacientes comprometidos, principalmente em regiões subdesenvolvidas ou áreas sem assistência médica especializada [2].

Problemas na produção, controle e uso de antivenenos tais como, purificação do produto, potência e atividade, padronização, efeitos colaterais devido à hipersensibilidade aos componentes heterólogos do sangue animal, surgiram logo após a sua descoberta, e muitos até hoje ainda não foram totalmente resolvidos [2]. Estudos recentes têm demonstrado que muitos antivenenos disponíveis, inclusive os preparados com uma IgG purificada são de baixa qualidade e podem apresentar altos índices de reações adversas precoces, tardias, ou apresentam pouca capacidade neutralizadora [1; 4].

No Brasil, os acidentes ofídicos de maior ocorrência são os causados pela serpente do gênero *Bothrops* seguido do gênero *Crotalus durissus* e o único tratamento eficaz é a soroterapia heteróloga, como o soro específico antibotrópico (SAB), anticrotálico (SAC) ou o polivalente antibotrópico-crotálico (SABC). O soro polivalente é o mais facilmente encontrado para utilização em animais e o específico para uso em humanos [5] e como o objetivo é neutralizar a maior quantidade possível do veneno circulante, a administração deve ser precoce e a via intravenosa é a mais recomendada [6; 7; 8; 9].

Não há consenso sobre a dose exata de soro antiofídico necessário após um acidente, devido a fatores que impossibilitam a determinação da quantidade do veneno inoculado [10]. Como a captura da serpente no momento do acidente é difícil por falta de preparo, e nos hospitais e pronto socorros a realização do teste de ELISA não é preconizado, seja por indisponibilidade de equipamento, recursos financeiros ou tempo, a identificação do acidente e as quantificações do veneno é impossível, inviabilizando a redução do antiveneno ou até mesmo o direcionamento de um antiveneno específico [11]. Em humanos os acidentes ofídicos são classificados de acordo com a gravidade dos sinais clínicos em leve, moderado e grave, podendo ser utilizado até 20 ampolas de soro em uma atendimento [5]. Em animais utiliza-se dose suficiente para neutralizar no mínimo 100 mg de veneno botrópico e 50mg de veneno crotálico [12].

Algumas serpentes possuem venenos com atividades nefrotóxica e hepatotóxica [13], no entanto nos relatos de caso, os indivíduos foram avaliados em momentos onde já haviam sido picados e recebido a soroterapia, desta forma fica a dúvida se as alterações estão relacionadas somente a ação do veneno ou também a ação do soro [14]. Hepatotoxicidade pode ser caracterizada por diferentes mecanismos de lesão: hepatocelular e colestática [15]. Lesões hepatocelular ou citolítica envolve predominantemente elevações iniciais nos níveis das aminotransferases sérica, geralmente precede o aumento dos níveis de bilirrubina total e apresenta aumentos modestos na fosfatase alcalina. Lesões colestáticas são caracterizadas por elevações predominantemente iniciais nos níveis de fosfatase alcalina que precede ou são relativamente mais importantes do que o aumento dos níveis das transaminases séricas [16].

No Brasil, existem evidências do uso de quantidades excessivas de antiveneno, resultando em uma incidência elevada de reações de hipersensibilidade [17;18]. Reações tardias (doença do soro) também são citadas e estão relacionadas a reações mediadas por IgG e IgM, hipersensibilidade do tipo III ou reações por imunocomplexo, que geralmente surgem de uma

a três semanas após uso do antiveneno [5;19]. Em um futuro próximo, os antivenenos poderão ser substituídos por anticorpos de vacinação humanizado e/ou compostos neutralizantes específicos, enquanto isso, a melhoria na qualidade do soro deve concentrar-se no aumento da pureza do produto e na redução dos agregados, bem como na implementação de boas práticas de fabricação, no entanto estas técnicas e outros fatores comerciais levaram a um aumento de custos, provocando uma forte escassez de soro, especialmente nos países mais pobres. [20]

Este estudo teve como objetivo avaliar a ação de diferentes antivenenos sobre a função hepática em ratos Wistar. A hipótese deste estudo é que os antivenenos sejam capazes de induzir lesões hepáticas importantes mesmo em pequenas doses.

## **Métodos**

### **Animais**

Foram utilizados 150 ratos Wistar, 60 dias de idade, machos, com peso médio de 250g, e mantidos agrupados em caixas de polietileno com cinco animais em cada caixa, sob temperatura ambiente controlada 22 a 24°C e fotoperíodo de 12h claro/12h escuro durante uma semana antes do início do experimento, com alimentação (Supra Lab<sup>®</sup>, Alisul) e água à vontade.

### **Soros**

Os soros antiofídicos para uso em humanos foram fornecidos pela Fundação Butantan de São Paulo-SP, e os mesmos foram transportados em condições ideais, sob refrigeração e mantidos até o momento da sua utilização em local adequado e refrigerado. Já o soro antiofídico para uso veterinário liofilizado, foi fornecido pelo laboratório Vencofarma<sup>®</sup> Londrina-PR, e pela apresentação do mesmo, não há recomendação do armazenamento sob refrigeração.

Após a semana de adaptação os animais foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos experimentais, com trinta animais em cada um (Tabela 1).

Os animais de todos os grupos receberam um volume de 2,0 mL da solução referente ao seu grupo pela via intraperitoneal. Para os grupos tratados com antiveneno o volume de 2,0 mL correspondeu a 20% da dose indicada para neutralizar os diferentes venenos em acidentes considerados leves.

### **Exames laboratoriais**

Os animais foram anestesiados com éter [21], para coleta de sangue por punção cardíaca de 10 animais em cada momento após 2 horas (M2), 8 horas (M8) e 24 horas (M24) para realização da dosagem sérica de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP) feitos e analisados automaticamente (Cobas C111 - Roche®). Após a morte dos animais por exsanguinação foi aberta a cavidade abdominal para a coleta de uma amostra do lóbulo caudal do fígado, as quais foram acondicionadas em formol tamponado 10% e processadas para a inclusão em parafina e os cortes corados pela hematoxilina-eosina (H/E) e ácido periódico de Schiff (PASS) com diastase. Na avaliação histopatológica foram utilizados os seguintes escores: 0-ausente; 1-leve; 2-moderado; 3-acentuado, para acúmulo de glicogenio, congestão, degeneração vacuolar, hiperplasia de células de kupffer e necrose centrolobular.

### **Análise estatísticas**

Para verificar se os parâmetros bioquímicos aferidos diferiram entre grupos e entre momentos recorreu-se ao teste de análise de variância em uma via (ANOVA one-way) com contrastes pelo método de Tukey. Para as variáveis que apresentaram violação no pressuposto de homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene, empregou-se alternativamente a ANOVA com correção de Welch e contrastes pelo método de Games-Howell. Para determinar se os escores das lesões histológicas diferiram entre grupo dentro de cada momento e entre momentos dentro de cada grupo foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com

constrastes pelo método de Dunn. Todas as análises foram realizadas com auxílio do Programa SPSS for Windows® v. 13.0. O nível de significância adotado foi de 5% [22].

## **Resultados**

O ALT aumentou de forma significativa no M2 para o G2 e no M24 para o G1 diferindo significativamente do G3 e G4, no entanto não diferiram do controle (Tabela 2).

A fosfatase alcalina (ALP ) aumentou de forma significativa em média duas vezes mais em todos os grupos comparado ao controle (G5), após duas horas e manteve-se até 24 horas. O aumento do G4 diferiu significativamente do G1 e G3 no M8 e do G3 no M24, já o G2 teve aumento maior em relação ao G3 no M24. Na comparação entre momentos o aumento no G4 após 24 horas diferiu do M2 (Tabela 2). Para AST e GGT nenhuma diferença foi observada na comparação entre grupos e momentos.

Na análise histopatológica o glicogênio esteve presente de forma acentuada em todos os momentos no grupo controle, já nos grupos tratados com antiveneno o mesmo esteve presente moderadamente no M2 (Figura 1 – A) mas no momento subsequente (M8) foi observado redução de glicogênio (Figura 1 – B) em todos os grupos o que diferiu significativamente do grupo controle. Com 24 horas os níveis de glicogênio iniciaram o retorno a normalidade mas de forma moderada (Figura 1 – C) o que também diferiu do controle. Na comparação entre momentos em todos os grupos, houve diferença significativa no M8 comparado ao M2 e M24 (Tabela 3).

Congestão leve foi observada no grupo controle (G5) em todos os momentos. No M2 a congestão também foi leve em todos os grupos não havendo diferença em relação controle (Figura 2 – A). No momento subsequente M8, a congestão apresentou-se moderada a acentuada em todos os grupos sendo o G2 e G4 diferente do controle. Após 24 horas a congestão manteve-se moderada a acentuada adicionando diferença do G3 em relação ao

controle (Figura 2 – B). Comparando momentos a congestão foi maior com 8 e 24 horas comparado a 2 horas no G2 e G4 (Tabela 3).

Todos os grupos tratados com antiveneno apresentaram degeneração vacuolar ou hidrópica, hiperplasia das células de Kupffer e necrose centrolobular em todos os momentos de avaliação diferindo significativamente do grupo controle. Comparando os momentos em cada grupo observou-se um grau acentuado de degeneração vacuolar em todos os grupos após 24 horas (Figura 3 – B) diferindo do M2 e M8 que se manteve moderada (Figura 3 – A). A hiperplasia foi de intensidade moderada a acentuada no M2 (Figura 3 – C) passando a moderada nos momentos subsequentes (M8 e M24) (Figura 3 – D). Hiperplasia acentuada e significativa ocorreu somente no M2 comparado ao M8 para o G1. Para necrose nenhuma diferença foi encontrada entre momentos e manteve-se leve (Figuras 3 – E e F) em todos os grupos e momentos de avaliação (Tabela 3).

## **Discussão**

A hipótese deste estudo foi confirmada, de modo que doses pequenas (20%) de todos os antivenenos estudados foram capazes de causar importantes lesões hepáticas, com características histológicas de degeneração, hiperplasia de células de Kupffer e Necrose centro lobular, em ratos Wistar, corroborando os achados dos dois únicos trabalhos encontrados na literatura [23; 24].

Segurança e eficácia da imunoterapia nos envenenamentos, estão intimamente relacionados a pureza do soro e a determinação exata da sua potência neutralizante. Apesar de todos os produtores de antiveneno no mundo utilizarem basicamente o mesmo método para purificar e unir imunoglobulinas eqüina, os resultados deste processo de purificação, teor de proteína, potência final e rendimento podem ser muito diferentes [4].

Alguns autores relatam que além de manifestações alérgicas clássicas a medicamentos em geral, reações sistêmicas relacionadas a outros órgãos como fígado, podem estar envolvidos e caracterizar quadros de extrema gravidade como lesão hepato-celular e colestase [19].

Lovrecek et al. [2], afirmam que os antivenenos ainda precisam ser melhorados e que até hoje existem problemas que não foram totalmente resolvidos. Na toxicidade hepática direta provocada por fármacos, os efeitos observados ocorrem de forma previsível em indivíduos expostos e é dependente da dose. Geralmente o período latente entre a exposição e a lesão hepática é curto (horas), embora as manifestações clínicas possam instalar-se até 24 a 48 horas [26].

Apesar de discreto, o aumento da ALT ao longo do tempo em todos os grupos mostra ser um indicador específico para uma lesão hepática aguda, já que a atividade sérica da ALT superou a da AST, a qual se manteve dentro da normalidade

O aumento da ALP em todos os grupos comparados com o controle, reforça ainda mais a ocorrência do dano hepático, corroborando Pereira [24] que relata aumento de ALP precocemente em ratos tratados com soro antiofídico botrópico-crotálico para uso veterinário comparado aos animais que receberam somente veneno. A fosfatase alcalina é sintetizada nos hepatócitos adjacentes aos canalículos biliares e desordens hepáticas agudas relacionadas a obstrução do trato biliar eleva seus valores entre 3 a 10 vezes em relação aos valores de referência [27].

A redução do glicogênio com duas horas nos grupos que receberam antiveneno e ausência pelo consumo do mesmo com oito horas e subsequente início de recuperação com 24 horas evidencia que sua síntese e degradação são reguladas para enfrentar as necessidades do organismo como um todo, e a medida que houve maior absorção do soro e metabolização (M2) as reservas de glicogênio diminuíram retornando a reservas quase normais com 24 horas [27].

A congestão hepática leve observada após duas horas progredindo para moderada e acentuada nos momentos subsequentes pode estar relacionada a um aumento local do volume de sangue, ocasionado por uma obstrução completa ou parcial de veias que drenam o sangue do fígado, talvez uma colestase intra-hepática [28].

A degeneração vacuolar ou hidrópica encontrada em todos os grupos tratados com antiveneno é resultante de um estágio mais avançado de edema celular, no entanto pode ser considerada reversível quando retirada a causa, significando um estado temporário de alteração funcional e pode estar relacionada a lesão da membrana celular por deposição de imunocomplexo ou hipóxia. Neste estudo, observou-se um processo evolutivo, pela instalação da necrose centrolobular leve, esta é considerada uma das mais importantes manifestações de necrose hepática presente nas hepatites tóxicas [29;30].

Outro achado significativo foi a hiperplasia das células de Kupffer que em nenhum momento foi leve. Autores também relatam que em situações de lesão hepática é comum ocorrer um aumento na síntese de citocinas inflamatórias [31;32].

## **Conclusões**

Os antivenenos utilizados neste ensaio, quando administrados por via intraperitoneal, na dose de 2 mL, foram capazes de provocar alterações hepáticas em ratos Wistar, sugerindo assim novos estudos relacionados a adequação da conduta quanto a dose de soro a ser usada no acidente ofídico, necessidade de produção de soros de maior qualidade e segurança aos pacientes.

## Aprovação no Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA da universidade de origem (protocolo número 1171)

## Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## Contribuições dos autores

HCBS realizou o levantamento bibliográfico, concepção do estudo, coleta de materiais e redigiu o manuscrito. RMBN realizou a concepção do estudo, coleta de materiais e ajudou redigir o manuscrito. LBS, realizou a coleta de materiais. CBL realizou os exames bioquímicos. RG realizou a análise estatísticas.

## Agradecimentos

Ao Biotério Central da Universidade de origem, pelos animais, organização e apoio na realização da pesquisa, ao instituto Butantan e Vencofarma® pela doação dos antivenenos e ao professor Dr. Osimar de Carvalho Sanches que realizou a análise histológica e fotografou o material.

## Referências

1. White J, Warrell D, Eddleston M, Currie BJ, Whyte IM, Isbister GK: **Where are we now?.** *Clinical toxicology* 2003, **41**(3):263-276.
2. Lovrecek D, Tomic S: **A century of antivenom.** *Coll Antropol* 2011, **35**(1):249-258.
3. Morais V, Massaldi H: **Economic evaluation of snake antivenom production in the public system.** *J Venom Anim Toxins* 2006, **12**(3):497-511.

4. Krifi MN, El Ayeb M.; Dellagi K: **The improvement and standardization of antivenom production in developing countries: comparing antivenom quality, therapeutical efficiency, and cost.** *J Venom Anim Toxins* 1999, **5**(2): 128-141.
5. Brasil. **Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde.** *Manual de diagnósticos e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.* 2<sup>a</sup> Edição. Brasília; 2001:131.
6. Jorge MT, Ribeiro LA: **Acidentes por animais peçonhentos.** In *Doenças transmissíveis.* Edited by Amato Neto V, Baldy JLS. São Paulo: Sarvier. 1989:133-41.
7. Jorge MT, Ribeiro LA: **Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*).** *Rev Inst Med Trop* 1992, **34**(4):347-54.
8. Ribeiro LA, Utescher CL, Vieira SL, Fensterseifer S, Mukuno H, Jorge MT: **Evaluation in mice of the efficacy of antivenins administered at the site of the intramuscular inoculation of the *Crotalus durissus terrificus* venom.** *Rev Inst Med Trop* 1993, **35**:23-27.
9. Sakate M: **Terapêutica das intoxicações.** In *Manual de terapêutica veterinária.* Edited by Andrade SF. São Paulo:Roca; 2002:523-55.
10. Agarwal R, Aggarwal AN, Gupta D, Behera D, Jindal SK: **Low dose of anti-snake venom is as effective as high dose in patients with severe neurotoxic snake envenoming.** *Emerg med J* 2005, **22**:397-99.
11. Isbister GK: **Snake antivenom research: the importance of case definition.** *Emerg med J* 2005, **22**(6):399-400.
12. Bicudo PL: **Acidentes ofídicos em Medicina Veterinária.** In *Venenos animais: uma visão integrada.* 1<sup>a</sup> Edição. Editado por Barraviera B. (Coord.). Rio de Janeiro: Publicações Científicas; 1994:375-87.
13. Castro I: **Estudo da toxicidade das peçonhas crotálicas e botrópicas, no acidente ofídico, com ênfase na toxicidade renal.** *O mundo da saúde* 2006, **30**:644-53.

14. Barraviera B, Coelho KY, Curi PR, Meira DA: **Liver disfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (laurent, 1768) snakes in Botucatu (State of São Paulo, Brazil).** *Rev Inst Med Trop* 1995, **37**:63-9.
15. Navarro VJ, Senior JR: **Drug related hepatotoxicity.** *N Engl J Med* 2006, **354**: 731-9.
16. Chang CY, Schaino TD: **Review: drug hepatotoxicity.** *Aliment Pharmacol Ther* 2007, **25**:1135-51.
17. Cardoso JL, Fan HW, França FO, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, Avila A, Sano-Martins IS, Tomy SC, Santoro ML, Chudzinski AM, Castro SCB, Kaniguti<sup>2</sup> AS, Kelen EMA, Hirata<sup>3</sup> MH, Mirandola RMS, Theakston<sup>4</sup> RDG, Warrell<sup>5</sup> DA: **Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil.** *International Journal of Medicine* 1993, **86**(5):315-25.
18. Theakston RD: **An objective approach to antivenom therapy and assessment of first-aid measures in snake bite.** *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 1997, **91**:857-65.
19. Ensina LF, Fernandes FR, Gesu GD, Malaman MF, Chavarria ML, Bernd LAG: **Reações de hipersensibilidade a medicamentos.** *Rev bras alerg imunopatol* 2009, **32**(2):211-23.
20. Morais VM, Massaldi H: **Snake antivenoms: adverse reactions and production technology.** *J Venom Anim Toxins* 2009, **5**(1):2-18.
21. França RF, Vieira RP, Ferrari EF, Souza RA, Osório RAL, Prianti Junior ACG, Hyslop S, Zamuner SR, Cogo JC, Ribeiro W: **Acute Hepatotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* (south American Rattlesnake) venom in rats.** *J Venom Anim Toxins* 2009, **15**(1):61-78.
22. Field A: *Descobrimdo a estatística usando o SPSS.* Porto Alegre: Artmed; 2009.

23. Lodi KB, Franca RF, Sales RP, Mine CEC, Franco AD, Brandao AAH, Carvalho VAP, Hyslop S, Cogo JC, Lopes-Martins RAB, Ribeiro W: **Hepatotoxicity of Crotalus durissus terrificus snake venom in rats and its prevention by antivenom [abstract]**. In *VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia e VIII Symposium of the Pan American section of the International Society on Toxinology*. Angra dos Reis; 2004.
24. Pereira CP. **Avaliação clínica e da hepatotoxicidade do veneno de Crotalus durissus terrificus e do soro antiofídico em ratos Wistar**. Universidade do Oeste Paulista, Mestrado em Ciência Animal; 2012.
25. Bogarin G, Morais JF, Yamaguchi IK, Stephano MA, Marcelino JR, Nishikawa AK, Guidolin R, Rojas G, Higashi HG, Gutiérrez JM: **Neutralization of crotaline snake venoms from Central and South America by antivenoms produced in Brazil and Costa Rica**. *Toxicon* 2000, **38**:1429-41.
26. Carvalho A. **Hepatites tóxicas e medicamentosas**; 2009. [www.alert-online.com.br/medical-guideqhepatites.toxicas.e.medicamentosas](http://www.alert-online.com.br/medical-guideqhepatites.toxicas.e.medicamentosas)
27. Motta VT: **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. Porto Alegre: Medbook; 2009.
28. Chalasani N, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB, Davern T, Serrano J, Yang H, Rochon J: **Causes, clinical, features and outcomes from a prospective study of drug-induced liver injury in the United States**. *Gastroenterology* 2008, **135**(6):1924-34.
29. Gerber MA, Thung SN: **Histology of the liver**. *Am J Surg Pathol*, 1987, **11**:709-22.
30. Singh A, Bhat TK, Sharma OP: **Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity**. *Clinical Toxicology* 2011, **4**:2-19.

31. Toman KG: **Eicosanoids and the liver: Review article.** *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 2000, **61**:163-74.
32. Mantovani M, Fontelles MJ, Hirano ES, Morandin RC, Caputo LRG, Schenka AA: **Isquemia e reperfusão hepática associada ao estado de choque hemorrágico controlado: efeitos no sequestro de neutrófilos no pulmão de rato.** *Acta Cirurgica Brasileira* 2002, **17**(1):46-54.

**Tabela 1. Delineamento experimental dos grupos, momentos de avaliação e quantidade de animais utilizados.**

GRUPOS	MOMENTOS / NÚMERO DE ANIMAIS		
	M2 (2h)	M8 (8h)	M24 (24h)
G1 – soro anticrotálico para uso humano Cada 10mL neutraliza 15mg de veneno crotálico.	n=10	n=10	n=10
G2 – soro antibotrópico para uso humano Cada 10mL neutraliza 50mg de veneno botrópico	n=10	n=10	n=10
G3 – soro antibotrópico-crotálico para uso Humano Cada 10mL neutraliza 50mg de veneno botrópico e 15mg de veneno crotálico	n=10	n=10	n=10
G4 – soro antibotrópico-crotálico para uso Veterinário Cada 10mL neutraliza 50mg de veneno botrópico e 15mg de veneno crotálico	n=10	n=10	n=10
G5 (controle) - tratado com solução de cloreto de sódio 0,9%	n=10	n=10	n=10

**Tabela 2. Comparação entre grupos e momentos para alanino aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP).**

Exame	Grupo	M2	M8	M24
		Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
ALT (U/L)	G1	54.6 ± 11.1 <sup>a</sup>	60.9 ± 24.3	78.2 ± 17.1 <sup>Ab</sup>
	G2	63.7 ± 9.0 <sup>A</sup>	57.5 ± 10.9	72.1 ± 30.1
	G3	48.5 ± 8.1 <sup>B</sup>	83.2 ± 17.2	58.4 ± 11.7 <sup>B</sup>
	G4	50.2 ± 9.4 <sup>B</sup>	55.1 ± 13.5	52.4 ± 9.7 <sup>B</sup>
	G5	56.2 ± 15.4	57.5 ± 18.1	67.1 ± 19.7
ALP (U/L)	G1	199.0 ± 78.4 <sup>B</sup>	146.5 ± 22.0 <sup>C</sup>	207.0 ± 73.4 <sup>C</sup>
	G2	225.8 ± 47.8 <sup>B</sup>	200.6 ± 60.1 <sup>B</sup>	240.7 ± 69.9 <sup>B</sup>
	G3	192.1 ± 47.2 <sup>B</sup>	146.8 ± 39.0 <sup>C</sup>	168.1 ± 37.2 <sup>C</sup>
	G4	178.8 ± 35.9 <sup>Ba</sup>	232.2 ± 66.7 <sup>B</sup>	258.7 ± 39.7 <sup>Bb</sup>
	G5	90.9 ± 30.0 <sup>A</sup>	74.1 ± 23.4 <sup>A</sup>	85.2 ± 26.6 <sup>A</sup>

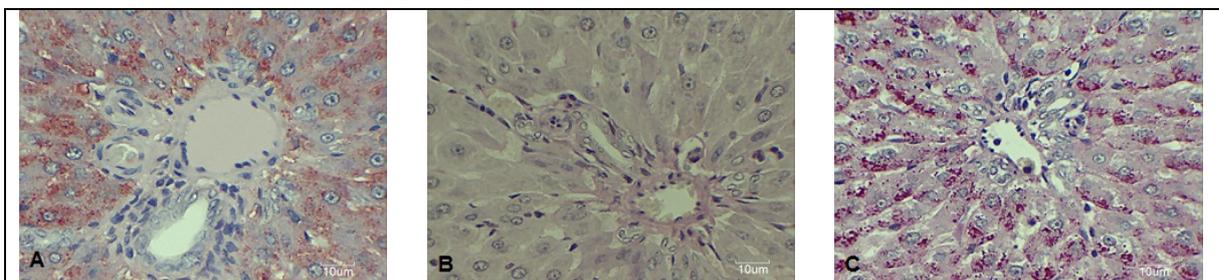
Letras maiúsculas comparam grupos no mesmo momento e letras minúsculas comparam momentos no mesmo grupo. P<0,05.

**Tabela 3. Média, mínima e máxima das variáveis avaliadas na histopatologia nos diferentes grupos e momentos.**

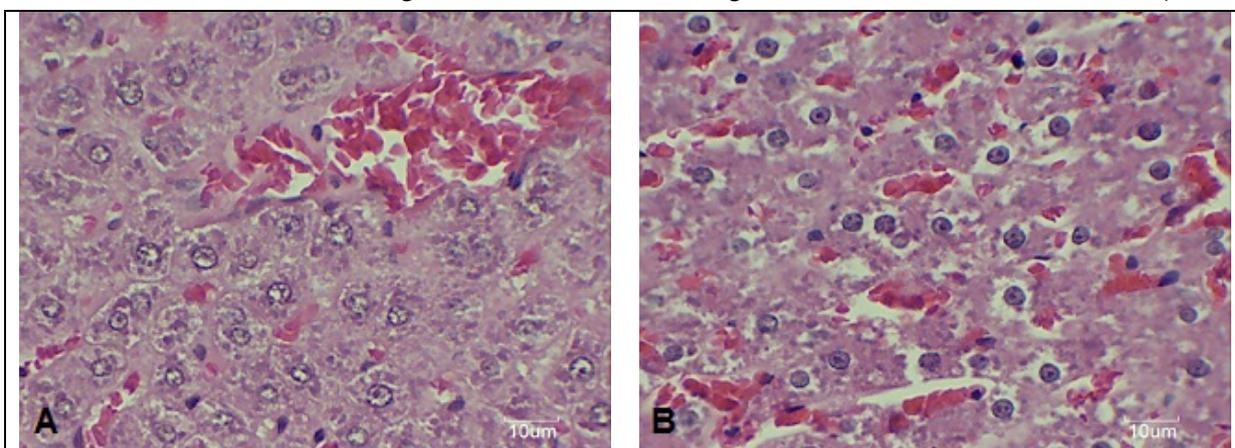
Variáveis avaliadas	Grupo	M2 (2h) Média (Min;Max)	M8 (8h) Média (Min;Max)	M24 (24h) Média (Min;Max)
Acumulo de Glicogênio	G1	2.5 <sup>b</sup> (1.0;3.0)	0.0 <sup>Ba</sup> (0.0;0.0)	2.0 <sup>Bb</sup> (2.0;2.0)
	G2	1.5 <sup>b</sup> (0.0;3.0)	0.0 <sup>Ba</sup> (0.0;0.0)	2.0 <sup>Bb</sup> (2.0;2.0)
	G3	2.0 <sup>b</sup> (1.0;3.0)	0.0 <sup>Ba</sup> (0.0;0.0)	2.0 <sup>Bb</sup> (2.0;2.0)
	G4	2.0 <sup>b</sup> (1.0;3.0)	0.0 <sup>Ba</sup> (0.0;0.0)	2.0 <sup>Bb</sup> (2.0;2.0)
	G5	3.0 <sup>A</sup> (3.0;3.0)	3.0 <sup>A</sup> (3.0;3.0)	3.0 <sup>A</sup> (3.0;3.0)
Congestão	G1	1.0 (1.0;2.0)	2.0 (0.0;3.0)	1.5 (1.0;3.0)
	G2	1.0 <sup>a</sup> (1.0;2.0)	2.0 <sup>Bb</sup> (1.0;3.0)	2.0 <sup>Bb</sup> (1.0;2.0)
	G3	1.0 (1.0;2.0)	1.5 (1.0;3.0)	2.0 <sup>B</sup> (1.0;3.0)
	G4	1.5 <sup>a</sup> (1.0;2.0)	2.5 <sup>Bb</sup> (2.0;3.0)	2.0 <sup>Bb</sup> (2.0;3.0)
	G5	1.0 (0.0;2.0)	1.0 <sup>A</sup> (0.0;1.0)	1.0 <sup>A</sup> (0.0;1.0)
Degeneração Vacuolar	G1	2.0 <sup>Ba</sup> (1.0;3.0)	1.0 <sup>Ba</sup> (1.0;2.0)	3.0 <sup>Bb</sup> (3.0;3.0)
	G2	1.0 <sup>Bb</sup> (1.0;2.0)	1.0 <sup>Bb</sup> (1.0;1.0)	3.0 <sup>Ba</sup> (3.0;3.0)
	G3	1.0 <sup>Bb</sup> (1.0;2.0)	1.0 <sup>Bb</sup> (1.0;1.0)	3.0 <sup>Ba</sup> (3.0;3.0)
	G4	2.0 <sup>Bb</sup> (1.0;3.0)	1.0 <sup>Bb</sup> (1.0;2.0)	3.0 <sup>Ba</sup> (3.0;3.0)
	G5	0.0 <sup>A</sup> (0.0;0.0)	0.0 <sup>A</sup> (0.0;0.0)	0.0 <sup>A</sup> (0.0;0.0)
Hiperplasia de Células de Kupffer	G1	3.0 <sup>Ba</sup> (2.0;3.0)	2.0 <sup>Bb</sup> (0.0;2.0)	2.0 <sup>B</sup> (2.0;2.0)
	G2	2.0 <sup>B</sup> (1.0;3.0)	2.0 <sup>B</sup> (2.0;2.0)	2.0 <sup>B</sup> (2.0;2.0)
	G3	2.0 <sup>B</sup> (1.0;3.0)	2.0 <sup>B</sup> (2.0;2.0)	2.0 <sup>B</sup> (2.0;2.0)
	G4	2.5 <sup>B</sup> (1.0;3.0)	2.0 <sup>B</sup> (2.0;2.0)	2.0 <sup>B</sup> (2.0;2.0)
	G5	0.0 <sup>A</sup> (0.0;0.0)	0.0 <sup>A</sup> (0.0;0.0)	0.0 <sup>A</sup> (0.0;0.0)
Necrose Centro Lobular	G1	0.5 <sup>B</sup> (0.0;1.0)	1.0 <sup>B</sup> (1.0;1.0)	1.0 <sup>B</sup> (1.0;1.0)
	G2	0.5 <sup>B</sup> (0.0;1.0)	1.0 <sup>B</sup> (1.0;1.0)	1.0 <sup>B</sup> (1.0;1.0)
	G3	0.5 <sup>B</sup> (0.0;1.0)	1.0 <sup>B</sup> (1.0;1.0)	1.0 <sup>B</sup> (1.0;1.0)
	G4	1.0 <sup>B</sup> (0.0;1.0)	1.0 <sup>B</sup> (1.0;1.0)	1.0 <sup>B</sup> (1.0;1.0)
	G5	0.0 <sup>A</sup> (0.0;0.0)	0.0 <sup>A</sup> (0.0;0.0)	0.0 <sup>A</sup> (0.0;0.0)

Letras maiúsculas comparam grupos no mesmo momento. Letras minúsculas comparam momentos no mesmo grupo. Escor: 0-Ausente; 1-leve; 2-moderada; 3-acentuada. p>0,05.

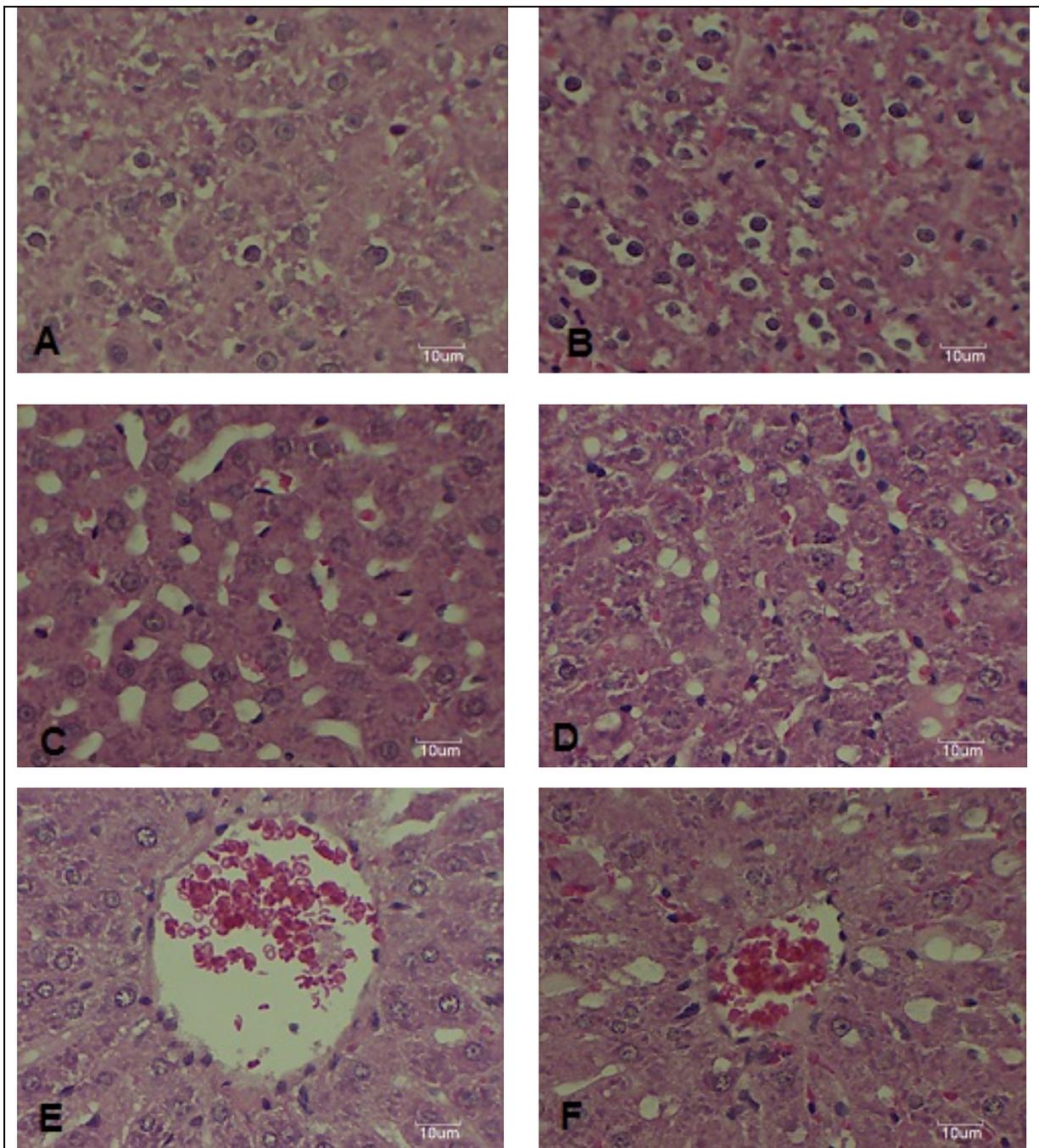
**Figura 1-Análise histológica de fígado de rato Wistar do grupo tratado com soro antiofídico anticrotálico humano. (A) Acúmulo moderado de glicogênio no M2. (B) Ausência de glicogênio no M8. (C) Acúmulo moderado de glicogênio no M24. Escala 10  $\mu$ m**



**Figura 2-Análise histológica de fígado de rato Wistar do grupo tratado com soro antiofídico anticrotálico humano. (A) Congestão leve no M2. (B) Congestão moderada no M24. Escala 10  $\mu$ m**



**Figura 3-Análise histológica de fígado de rato Wistar do grupo tratado com soro antiofídico anticrotálico humano. (A) Degeneração vacuolar moderada no M2. (B) Degeneração vacuolar acentuada no M24. (C) Hiperplasia de Células de Kupffer acentuada no M2. (D) Hiperplasia de Células de Kupffer moderada no M24. (E e F) Necrose Centrolobular leve no M2 e M24. Escala 10  $\mu$ m**



**ANEXO – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA**

<http://www.jvat.org/authors/instructions/research>

## Instructions for authors

### Research articles

[Presubmission enquiries](#) | [Submission process](#) | [Preparing main manuscript text](#) | [Preparing illustrations and figures](#) | [Preparing tables](#) | [Preparing additional files](#) | [Style and language](#)

See '[About this journal](#)' for descriptions of different article types and information about policies and the refereeing process.

### Presubmission enquiries

If you wish to make a presubmission enquiry about the suitability of your manuscript, please email the [editors](#) who will respond to your enquiry as soon as possible.

### Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

Please note that *JVATiTD* levies an article-processing charge on all accepted Research articles; if the submitting author's institution is a [BioMed Central member](#) the cost of the article-processing charge may be covered by the membership (see [About](#) page for detail). Please note that the membership is only automatically recognised on submission if the submitting author is based at the member institution.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *JVATiTD* prefers [online submission](#).

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of [word processor](#) and [graphics file formats](#) that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system. Additional files of any type, such as [smovies](#), animations, or [original data files](#), can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating to our editorial policies in the '[About JVATiTD](#)' page, and to declare any potential competing interests. Your covering letter should also include the title page of your manuscript. You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of the same research institution. Suggested reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the editorial team and/or by Editorial Board members or other advisers.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from [BioMed Central customer support team](#).

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our [Useful Tools](#) page.

#### File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))
- DeVice Independent format (DVI)

TeX/LaTeX users: Please use [BioMed Central's TeX template](#) and BibTeX stylefile if you use TeX format. During the TeX submission process, please submit your TeX file as the main manuscript file and your bib/bbl file as a dependent file. Please also convert your TeX file into a PDF and submit this PDF as an additional file with the name 'Reference PDF'. This PDF will be used by internal staff as a reference point to check the layout of the article as the author intended. Please also note that all figures must be coded at the end of the TeX file and not inline.

If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

For all TeX submissions, all relevant editable source must be submitted during the submission process. Failing to submit these source files will cause unnecessary delays in the publication procedures.

## Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given [below](#).

### Overview of manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to *JVATiTD* should be divided into the following sections (in this order):

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Keywords](#)
- [Background](#)
- [Methods](#)
- [Results and discussion](#)
- [Conclusions](#)
- [List of abbreviations used](#) (if any)
- [Competing interests](#)
- [Authors' contributions](#)
- [Authors' information](#)
- [Acknowledgements](#)
- [Endnotes](#)
- [References](#)
- [Illustrations and figures](#) (if any)
- [Tables and captions](#)
- [Preparing additional files](#)

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

You can [download a template](#) (Mac and Windows compatible; Microsoft Word 98/2000) for your article.

For reporting standards please see the information in the [About](#) section.

### Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- the title should include the study design, for example "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial X is a risk factor for Y: a case control study"
- abbreviations within the title should be avoided

Please note: as this journal operates double-blind peer review, the title page should be uploaded as part of the covering letter, and not included in the main manuscript file.

### Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Methods**, how the study was performed and statistical tests used; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. **Trial registration**, if your research reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number (e.g. **Trial registration**: Current Controlled Trials ISRCTN73824458). Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number. We recommend manuscripts that report randomized controlled trials follow the [CONSORT extension for abstracts](#).

### Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

### Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where

appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

## Methods

The methods section should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses in the Methods section.

For studies involving human participants a statement detailing ethical approval and consent should be included in the methods section. For further details of the journal's editorial policies and ethical guidelines see '[About this journal](#)'.

For further details of the journal's data-release policy, see the policy section in '[About this journal](#)'.

## Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

## Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

## List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

## Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

### *Financial competing interests*

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

### *Non-financial competing interests*

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Please note: as this journal operates double-blind peer review, the Competing interests section should be uploaded as part of the covering letter, and not included in the main manuscript file.

## Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

According to [ICMJE guidelines](#), An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have

made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; 3) have given final approval of the version to be published; and 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

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

Please note: as this journal operates double-blind peer review, the Authors' contributions section should be uploaded as part of the covering letter, and not included in the main manuscript file.

## Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Please note: as this journal operates double-blind peer review, the Authors' information section should be uploaded as part of the covering letter, and not included in the main manuscript file.

## Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

The role of a scientific (medical) writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding. We suggest wording such as 'We thank Jane Doe who provided medical writing services on behalf of XYZ Pharmaceuticals Ltd.'

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Please note: as this journal operates double-blind peer review, the Acknowledgements section should be uploaded as part of the covering letter, and not included in the main manuscript file.

## Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

## References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets, clinical trial registration records and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding 'et al.'.

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- [BibTeX](#)
- [EndNote style file](#)
- [Reference Manager](#)
- [Zotero](#)

Examples of the *JVATiTD* reference style are shown [below](#). Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

### Examples of the *JVATiTD* reference style

#### *Article within a journal*

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs**. *Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

#### *Article within a journal supplement*

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction**. *Proteins* 1999, **43**(Suppl 3): 149-170.

#### *In press article*

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide**. *Eur Respir J*, in press.

#### *Published abstract*

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract]**. *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

#### *Article within conference proceedings*

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms**. In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996: 16-27.

#### *Book chapter, or article within a book*

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates**. In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993: 53-76.

#### *Whole issue of journal*

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology**. In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

#### *Whole conference proceedings*

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

#### *Complete book*

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

#### *Monograph or book in a series*

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage**. In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995: 54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

#### *Book with institutional author*

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

#### *PhD thesis*

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

#### *Link / URL*

**The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

#### *Link / URL with author(s)*

Corpas M: **The Crowdfunding Genome Project: a personal genomics community with open source values** [<http://blogs.biomedcentral.com/bmcblog/2012/07/16/the-crowdfunding-genome-project-a-personal-genomics-community-with-open-source-values/>]

#### *Dataset with persistent identifier*

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C-

M; Jing, H-C (2011): **Genome data from sweet and grain sorghum (Sorghum bicolor)**. *GigaScience*. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.  
*Clinical trial registration record with persistent identifier*  
 Mendelow, AD (2006): **Surgical Trial in Lobar Intracerebral Haemorrhage**. Current Controlled Trials. <http://dx.doi.org/10.1186/ISRCTN22153967>

## Preparing illustrations and figures

---

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

### Formats

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)
- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG
- BMP

### Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

**Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.**

### Preparing a personal cover page

If you wish to do so, you may submit an image which, in the event of publication, will be used to create a cover page for the PDF version of your article. The cover page will also display the journal logo, article title and citation details. The image may either be a figure from your manuscript or another relevant image. You must have permission from the copyright to reproduce the image. Images that do not meet our requirements will not be used.

Images must be 300dpi and 155mm square (1831 x 1831 pixels for a raster image).

Allowable formats - EPS, PDF (for line drawings), PNG, TIFF (for photographs and screen dumps), JPEG, BMP, DOC, PPT, CDX, TGF (ISIS/Draw).

## Preparing tables

---

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be

used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a landscape page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls ) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

## Preparing additional files

Although *JVATiTD* does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to [editorial@jvat.org](mailto:editorial@jvat.org), quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *JVATiTD* requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author. We recommend CSV rather than PDF for tabular data.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

- File name (e.g. Additional file 1)
- File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'

## Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
  - PDF (Adode Acrobat)
- Animations
  - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
  - MP4 (MPEG 4)
  - MOV (Quicktime)
- Tabular data
  - XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)
  - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

## Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.
5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

## Style and language

---

### General

Currently, *JVATiTD* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

*JVATiTD* will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

### Language editing

For authors who wish to have the language in their manuscript edited by a native-English speaker with scientific expertise, BioMed Central recommends [Edanz](#). BioMed Central has arranged a 10% discount to the fee charged to BioMed Central authors by Edanz. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact [Edanz](#) directly to make arrangements for editing, and for pricing and payment details.

### Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the [BioMed Central author academy](#).

### Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

### Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the *JVATiTD* [reference format](#).
- Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.
- Please do not format the text in multiple columns.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**

### Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).