



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

**OZONIOTERAPIA NA INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL PELO VENENO DE
LACHESIS MUTA MUTA EM RATOS WISTAR**

GABRIELA HARO DE MELO

**OZONIOTERAPIA NA INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL PELO VENENO DE
LACHESIS MUTA MUTA EM RATOS WISTAR**

GABRIELA HARO DE MELO

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora – Área de concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal

Orientador:
Prof. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira

636.089
M528o

Melo, Gabriela Haro de.

Ozonioterapia na intoxicação experimental pelo veneno de *Lachesis muta muta* em ratos Wistar – Presidente Prudente, 2022.

74f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2022.

Bibliografia.

Orientador: Dra Rosa Maria Barilli Nogueira.

1. *Lachesis muta muta*. 2. Ozonioterapia. 3. Antiveneno. 4. Toxicidade local e sistêmica. I. Título.

GABRIELA HARO DE MELO

**OZONIOTERAPIA NA INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL PELO VENENO DE
LACHESIS MUTA MUTA EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora - Área de Concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal.

Presidente Prudente, 04 de abril de 2022.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Guilherme Akio Tamura Ozaki
Universidade Paulista-UNIP
Araçatuba-SP

Profa. Dra. Karina Basso
Centro Veterinário Filadélfia-UNIFIL
Londrina-PR

Profa. Dra. Adriana Falco de Brito
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa Dra. Dayane Aparecida Francisco da Silva
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, Felipe, Lucas e Maria Alice, que tomam meu tempo, me fazem abandonar o egoísmo e são minha ocasião para desenvolver virtudes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Ao meu esposo André Fellipe F. Rodrigues pelo apoio incondicional e incentivo.

Agradeço aos meus pais, Ari de Melo Junior e Vanilda Haro de Melo e a minha irmã Grasiely Melo Correia, pelas orações e todo o cuidado com minhas crianças.

Agradeço em especial a minha orientadora, professora Rosa Maria Barilli Nogueira, que além de orientar a pesquisa, sempre demonstrou acreditar em meu trabalho.

Aos meus alunos que auxiliaram durante o período experimental com todo ânimo e disposição, ainda que no período de férias.

À minha colega de pós-graduação, Lilliane Giroto Pereira, que acompanhou e contribuiu com o experimento e, sobretudo, com o cuidado dispensado aos animais.

E por fim, agradeço ao médico veterinário, especialista e ozonioterapia, Dr Arnaldo Farina, por sua disposição e por, muito gentilmente, ceder o equipamento gerador de ozônio utilizado durante o experimento.

RESUMO

Ozonioterapia na intoxicação experimental pelo veneno de *Lachesis muta muta* em ratos Wistar

Neste estudo, avaliamos a ozonioterapia como tratamento adjuvante ao antiveneno polivalente para reduzir os efeitos agudos, locais e sistêmicos induzidos pelo veneno de *Lachesis muta muta*. 20 ratos *Wistar* machos foram utilizados como controle e 120 foram expostos ao veneno (1,0mg/kg – IM) e tratados com soro antiofídico *Bothrops/Lachesis* (6h após intoxicação) e gás ozônio (30mg/mL – IP) + óleo de girassol ozonizado tópico (3, 6, 24 e 72h pós veneno); os animais foram monitorados para avaliar a formação de edema local, úlcera e dor. Vinte animais por grupo foram anestesiados para coleta de sangue por punção intracardíaca e eutanasiados para coleta de tecido (momentos 6, 24 e 72h). As análises bioquímicas e histopatológicas mostraram que o veneno de *L.m. muta* produziu edema local pronunciado, hemorragia subcutânea e mionecrose. O antiveneno e o ozônio reduziram com sucesso a extensão da lesão mionecrótica e preveniu a ocorrência de hemorragia subcutânea. A liberação de creatina quinase (CK) induzida por veneno foi significativamente prevenida pelo ozônio em combinação com soro antiofídico; a associação foi parcialmente efetiva para reduzir os biomarcadores séricos ureia e creatinina induzidos pelo veneno. A ozonioterapia mostrou-se eficaz na prevenção da miotoxicidade esquelética e na redução progressiva da necrose. O veneno induziu aumento significativo de leucócitos que também foi associado a um aumento de neutrófilos, porém, o antiveneno e o ozônio reduziram parcialmente essas alterações. A terapia com ozônio em associação com um antiveneno polivalente tem o potencial de reduzir uma série de efeitos locais e sistêmicos causados pelo veneno de *L. m. muta*.

Palavras-chave: *Lachesis muta muta*; Ozonioterapia; antiveneno; Toxicidade local e sistêmica.

ABSTRACT

Ozone therapy in experimental poisoning by *Lachesis muta muta* venom in Wistar rats

In this study, we examined the potential use of ozone therapy (O₃) in association with a polyvalent antivenom to reduce the acute local and systemic effects induced by *Lachesis muta muta* venom in rats. Male Wistar rats were exposed to *L. m. muta* venom (1.0mg/kg – i.m.) and subsequently treated with anti-Bothrops/Lachesis serum (6h after) and ozone gas (30mg/mL – i.p.) + topic ozonized sunflower oil (3, 6, 24 and 72 hours post exposure to venom); the animals were monitored to assess local oedema formation, ulce and the prevalence of pain. Were carried of the applyings of the ozone 6, 24 and 72h post exposure to venom. Twent animals for grupo were anesthetized in order to collect blood samples through intracardiac puncture and then euthanized for collecting tissue samples (in moments 6, 24 and 72h); the hematological-biochemical and histopathological analyses were performed through con-ventional methods. The venom produced pronounced local oedema, subcutaneous haemorrhage and myonecrosis, with both antivenom and ozone successfully reducing the extent of the myonecrotic lesion; their association also prevented the occurrence of subcutaneous haemorrhage. Venom-induced creatine kinase (CK) release was significantly prevented by ozone in combination with antivenom; the association was also partially effective to reduced ureia and creatinine serum biomarkers induced by venom. The association proved to be effective in preventing local skeletal myotoxicity and progressively reducing necrosis. Venom induced significant increase of leucocytes which was also associated with an increase of neutrophils; antivenom and ozone partially reduced these alterations. In conclusion, ozone therapy in association with a polyvalent antivenom has the potential to reduce a number of local and systemic effects caused by *Lachesis muta muta* venom.

Keywords: *Lachesis muta muta* venom; Ozone therapy; Antivenom; Local and systemic toxicity.

LISTA DE SIGLAS

AV	- Antiveneno
CHCM	- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CK	- Creatininaquinase
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Cr	- Creatinina
GC	- Grupo controle
GO3	- Grupo ozônio
GV	- Grupo veneno
HCM	- Hemoglobina Corpuscular Média
IM	- Intramuscular
IP	- Intraperitoneal
<i>L.m.muta</i>	- <i>Lachesis muta muta</i>
O2	- Oxigênio
O3	- Gás ozônio
PPT	- Proteína Plasmática Total
RDW	- Red Cell Distribution Width (Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos)
Ur	- Ureia
VCM	- Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	10
ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	31
ANEXO A – APROVAÇÃO ÉTICA.....	54
ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA.....	55

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Efeito local da ozonioterapia na intoxicação experimental pelo veneno de *Lachesis muta muta* em ratos Wistar

Gabriela Haro de Melo^a, Lilliane Giroto Pereira^a, Matheus Barreto dos Santos^b, Elisângela Olegário da Silva^c, Arnaldo Farina^d, Rafael Stuani Floriano^e, Cecília Laposy Santarem^e, Luis Souza Lima de Souza Reis^e, Rosa Maria Barilli Nogueira^e

^aDiscente do Programa de Pós-graduação de Fisiopatologia e Saúde Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares Km 572, B2-205, 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brasil.

^bDiscente da Faculdade de Farmácia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, Cidade Universitária, CEP 19050-920, Presidente Prudente, SP, Brasil.

^cLaboratório de Anatomia Patológica, Hospital Veterinário, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares Km 572, 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brasil.

^dMédico Veterinário, Especialista em Fisioterapia e Ozonioterapia Veterinária.

^eDocente do Programa de Pós-graduação de Fisiopatologia e Saúde Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares Km 572, B2-205, 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brasil.

Resumo

Neste estudo, examinamos o potencial uso da terapia com ozônio (O₃) em associação com antiveneno polivalente para reduzir os efeitos locais agudos induzidos pelo veneno de *Lachesis muta muta* em ratos. 20 ratos Wistar machos foram utilizados para o grupo controle e 120 foram expostos a *L. m. muta* (1,0mg/kg – IM) e posteriormente tratados com soro antiofídico *Bothrops/Lachesis* (6h após) e gás ozônio (30mg/mL – IP) + óleo de girassol ozonizado tópico (3, 6, 24 e 72 horas pós exposição ao veneno); os animais foram monitorados para avaliar a formação de edema local, úlcera e a prevalência de dor. Foram realizadas aplicações de ozônio 6h, 24h e 72h pós exposição ao veneno. Vinte animais por grupo foram anestesiados para coleta de tecido; a análise histopatológica foi realizada por métodos convencionais. O veneno de *Lachesis muta muta* produziu edema local pronunciado, hemorragia subcutânea e mionecrose, com o antiveneno e o ozônio reduzindo com sucesso a extensão da lesão mionecrótica; o antiveneno e o ozônio também preveniu a ocorrência de hemorragia subcutânea. A associação mostrou-se eficaz na prevenção da miotoxicidade esquelética local e na redução progressiva da

necrose. Em conclusão, a terapia com ozônio tópica em associação com o antiveneno polivalente tem o potencial de minimizar a necrose e os efeitos inflamatórios locais nas primeiras horas após o envenenamento causados por *Lachesis muta muta* em rato.

Palavras-chave: *Lachesis muta muta*; Óleo de girassol ozonizado; Antiveneno; Toxicidade local; Rato

Destaques

Ozonioterapia causa diminuição da dor em acidentes com *Lachesis muta muta*.
A ozonioterapia contribui para a prevenção da miotoxicidade esquelética local.
O tratamento com ozônio reduz a necrose causada pelo veneno de *L. m. muta*.
A terapia de ozônio reduz, progressivamente, a hemorragia causada por envenenamento.

Corresponding author.

E-mail address: gabrielamelo@unoeste.br (G.H.Melo).

1. INTRODUÇÃO

Serpentes do gênero *Lachesis* estão entre as principais causadoras de acidentes ofídicos no Brasil, entre 2003 e 2012 representou 3,5% dos registros na região da Amazônia e Mata Atlântica (Matos and Ignotti, 2020).

As toxinas conhecidas da *Lachesis muta muta* são as serinoproteinases, L-aminoácido oxidase, fosfolipases A₂, hialuronidase e lecitina tipo C (Sanz et al., 2008; Chippaux, 2017; Wiezel et al., 2019). Alguns autores relatam no acidente laquético ações proteolítica, coagulante e hemorrágica com ação necrosante, atividade do tipo trombina, com sinais clínicos locais como dor, eritema, equimoses, edema, bolhas e necrose (Diniz-Sousa et al., 2020; Leão-Torres et al., 2021). A gravidade do acidente, além de outros fatores, se relaciona principalmente com o tempo da ocorrência até o atendimento (Mise et al., 2018; Pinho and Pereira, 2001).

Em geral o tratamento do acidente ofídico consiste na aplicação do antiveneno o mais rápido possível, pois a soroterapia neutraliza o veneno circulante e impede novas lesões. Contudo, as lesões que já ocorreram, principalmente no local da inoculação do veneno, são geralmente irreversíveis e mais propensas às complicações locais (Muniz et al., 2021; Pinho and Pereira, 2001). Embora a aplicação do antiveneno seja o tratamento convencional, possui pouca ação de neutralização sobre os efeitos locais, possibilidade de reação de hipersensibilidade imediata e tardia, problemas de regionalização das espécies das serpentes, falta de disponibilidade em regiões distantes e alto custo de produção com baixa margem de lucro, o que reduz o interesse das indústrias farmacêuticas em investir na produção (Albuquerque et al., 2013; Colombini et al., 2001; Domingos et al., 2012; Waldez and Vogt, 2009). Diante disso, a investigação de um tratamento adjuvante, com o intuito de minimizar os efeitos locais provocados pelo veneno se faz necessária.

A ozonioterapia, por sua vez, tem sido utilizada em várias situações, pois estimula uma série de mecanismos que contribuem para a normalização da disponibilidade de O₂, que resulta em melhora nas doenças relacionadas a falta do mesmo, como: isquemias, má cicatrização, infecções, estresse oxidativo (Bocci et al., 2011; Bocci, 2006; Cho et al., 2021; Elvis and Ekta, 2011; Travagli et al., 2010, 2009; Ugazio et al., 2020), no tratamento da dor, em patologias da musculatura esquelética (Babaei-Ghazani et al., 2019; Ryska et al., 2021; Seyam et al., 2018), e também como tratamento tópico, têm-se o uso de óleo ozonizado principalmente os

de girassol e oliva (Trench, 2007). Evidências apoiam seu efeito satisfatório em feridas cutâneas, como fístulas e feridas pós-cirúrgicas, úlceras de pressão, tróficas, isquêmicas e feridas diabéticas (Izadi et al., 2019). Promove redução da infecção microbiana, tem efeito de desbridamento, modulação da fase inflamatória, estimulação da angiogênese e também reações biológicas e enzimáticas que favorecem o metabolismo do oxigênio melhorando a cicatrização das feridas (Ferreira et al., 2014; Gupta and Deepa, 2016; Izadi et al., 2019; Kim et al., 2009; Pereira, 2021).

Bocci, (2004) demonstrou que a associação da terapia com ozônio ao tratamento convencional de diferentes feridas, pode causar uma melhora mais rápida da lesão quando realizado tratamento tópico com ozonização direta da lesão ou com água ozonizada, tanto com objetivo de limpeza, quanto de efeito estimulante de moléculas orgânicas. Além disso, o aumento do metabolismo e das respostas imunológicas causadas pelo ozônio contribuem com esses resultados.

Considerando que a eficácia de adjuvantes terapêuticamente úteis para tratar os efeitos induzidos por acidentes laquéticos precisam ser mais investigados, a terapia com ozônio tornou-se objeto de estudo para esta pesquisa, cujo objetivo foi avaliar os efeitos locais da ozonioterapia como tratamento adjuvante do antiveneno polivalente em casos de envenenamento por *Lachesis muta muta* em ratos Wistar.

2. METODOLOGIA

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista, sob protocolo nº 5487, desenhado e monitorado de acordo com os princípios éticos preconizados pela Resolução Normativa 33 do CONCEA (Brasil, 2016) e as diretrizes ARRIVE (du Sert et al., 2020)

2.1. Modelo experimental

Foram utilizados 140 ratos Wistar, machos, com peso médio de 350g, mantidos em gaiolas individuais, com água e ração à vontade, em ambiente climatizado com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, aclimatados uma semana antes de iniciar o experimento.

2.1.1. Veneno bruto e antiveneno

No primeiro dia de experimento 120 ratos foram submetidos a tricotomia em membro posterior esquerdo e inoculados com 1,0mg/Kg de veneno de serpente *Lachesis muta muta*, por via intramuscular (IM) (Saneshigue et al., 2019). A amostra liofilizadas do "Pool" de venenos de *Lachesis muta muta* foram fornecidas pelo Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da PUC de Goiás e mantidas congeladas a -20°C até o momento de uso. Após seis horas procedeu a aplicação intraperitoneal (IP) do antídoto comercial, soro antiofídico polivalente Master Soro Plus® (Vencofarma), na dose preconizado pelo fabricante, para neutralizar a toxina inoculada. Os 20 animais restantes não sofreram qualquer intervenção – não receberam veneno, ou, antiveneno – e foram eutanasiados, sendo este grupo destinado à avaliação dos valores basais e comparação com os demais.

2.1.2. Tratamento

Para o tratamento, os animais foram randomizados e distribuídos em dois grupos com 60 animais cada, sendo: O grupo veneno – (GV) recebeu tratamento com solução fisiológica (NaCl 0,9%), 2 gotas em membro inferior esquerdo – via tópica, e 3mL por via IP. O grupo Ozônio – (GO3) foi tratado com aplicação IP de gás ozônio na concentração de 30µg/mL e óleo de girassol ozonizado, por via tópica em membro posterior esquerdo. Foram instiladas duas gotas (cerca de 0,1mL) no local de inoculação do veneno e com auxílio de hastes de algodão para espargir, padronizou-se 5 movimentos circulares. O óleo de girassol ozonizado, contendo índice de peróxido equivalente padronizado de 700meq/kg, foi adquirido pronto para uso da Ozone&Life® - Tecnologia em Geradores de Ozônio. O gás administrado por via IP é uma mistura de gás oxigênio (95%) e ozônio (5%) (O₂-O₃) que foi gerado com auxílio de aparelho Gerador na concentração de 30µg/mL (de Sire et al., 2021; Diao et al., 2018; El-Mehi and Faried, 2020), captado com seringa de 3mL e aplicado com agulhas descartáveis no tamanho 25x8mm (21G), marca BD®. Os tratamentos se repetiram, às 3h, 6h, 24h e 48 horas após inoculação do veneno (Figura 1).

Com o intuito de avaliar o efeito de cada tratamento, a eutanásia ocorreu de forma gradativa com 20 animais de cada grupo nos momentos 6h (avaliação dos efeitos até 3h); momento 24h (avaliação dos efeitos após 3h e 6h); momento 72h

(avaliação dos efeitos após 3h, 6h, 24h e 48h). A eutanásia do grupo C ocorreu no momento 0 (M0h) (Fig. 1).

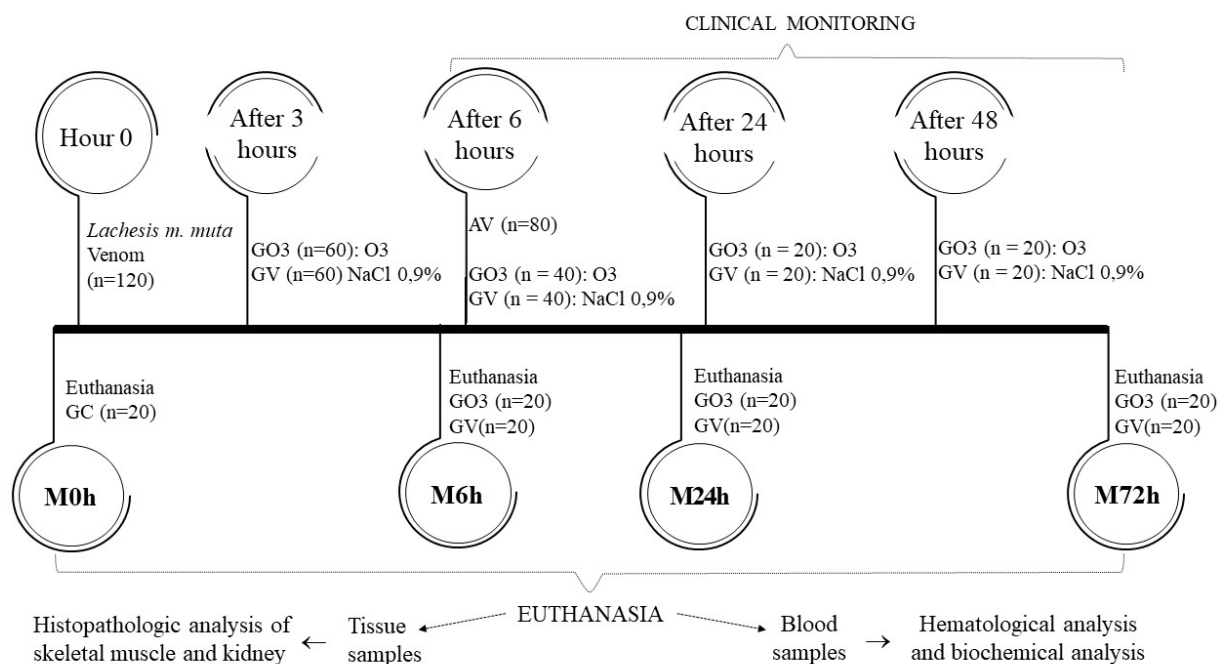


Fig. 1. Desenho experimental. Antiveneno (AV); Terapia com ozônio (O3); Grupo veneno (GV); Grupo ozônio (GO3); Grupo controle “basal” (GC). Momento 0 (M0); Momento 6 horas (M6h), após inocular o veneno; Momento 24 horas (M24h), após inocular o veneno; Momento 72 horas (M72h), após inocular o veneno.

2.2. Eutanásia

Os animais foram anestesiados por via IP com a aplicação de cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin[®]) na dose de 10mg/Kg e a Cetamina (Ketamina[®]) na dose de 60mg/Kg, segundo protocolo de Kanashiro and Cassu, (2008). O óbito dos animais ocorreu por conta da exsanguinação e foi confirmado pela ausência de movimentos respiratórios e batimentos cardíacos.

2.3. Avaliação clínica

Os parâmetros clínicos relacionados à lesão foram baseados no estudo de Abegão et al., (2015) e Barrionuevo et al., (2015), com os seguintes escores: sensibilidade dolorosa: 0- ausente; 1- presente (considerada quando havia uma ou mais mudanças no comportamento do animal, tais como inquietude, agitação, vocalização e movimento de virar a cabeça com intenção de morder após contato

com a lesão); cor do membro: 1- rósea; 2- amarelada; 3- pálida; 4- cianótica; edema, necrose e úlcera sendo: 0-ausente; 1-presente. A avaliação clínica da lesão iniciou no primeiro dia, seis horas após aplicação do veneno, e repetiu-se a cada 24 horas antecedendo os momentos de eutanásia.

2.4. *Análise histopatológica*

Os fragmentos de tecido muscular, retirados da área central da lesão, foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas e posteriormente inclusos em parafina. Foram obtidos cortes de 5µm de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). A pontuação utilizada na avaliação histopatológica para estabelecer critérios lesão muscular esquelético foi adaptada de estudos anteriores (Gerez et al., 2015; Grenier et al., 2011). O escore de cada lesão foi obtido multiplicando-se o fator gravidade com a extensão da lesão. O escore foi então obtido pela soma de cada escore da lesão. Fator de gravidade (grau de gravidade): 1-lesões leves, 2-lesões moderadas, e, 3-lesões graves. A extensão de cada lesão (intensidade ou frequência observada) foi avaliada e pontuada como: 0-sem lesão, 1-baixa extensão (25% do tecido afetado), 2-intermediária (50% do tecido afetado) e 3-grande extensão (75% ou mais do tecido afetado).

2.5. *Análise estatística*

Para análise dos dados foi utilizado o software Action Stat, um sistema estatístico que utiliza a linguagem R e trabalha de forma integrada ao Excel. Em todos os testes foi adotado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para verificar a existência de associação entre variáveis qualitativas foi aplicado o Teste Qui-Quadrado ou, em algumas situações, o Teste Exato de Fisher. Para análise do score de lesão histopatológica foi aplicado o teste de normalidade dos dados (Shapiro Wilk), que obteve p-value menor que 0,01, portanto, foi constatado que os dados não seguem uma distribuição normal. Sendo assim, foi necessário aplicar um teste não-paramétrico (Kruskal-Wallis) para comparar os grupos.

3. RESULTADOS

3.1. Manifestações clínicas causadas pelo veneno de *Lachesis muta muta* e tratamento com antiveneno e ozonioterapia, em ratos Wistar

O veneno de *L. m. muta* na dose de 1,0mg/k, aplicado por via intramuscular em membro posterior esquerdo, causou edema acentuado, dor e alterações na coloração do membro em todos os animais inoculados, com o avanço do tratamento houve melhora gradativa das alterações (Fig.2.), sendo que o grupo submetido a ozonioterapia apresentou melhores resultados ao final do experimento.

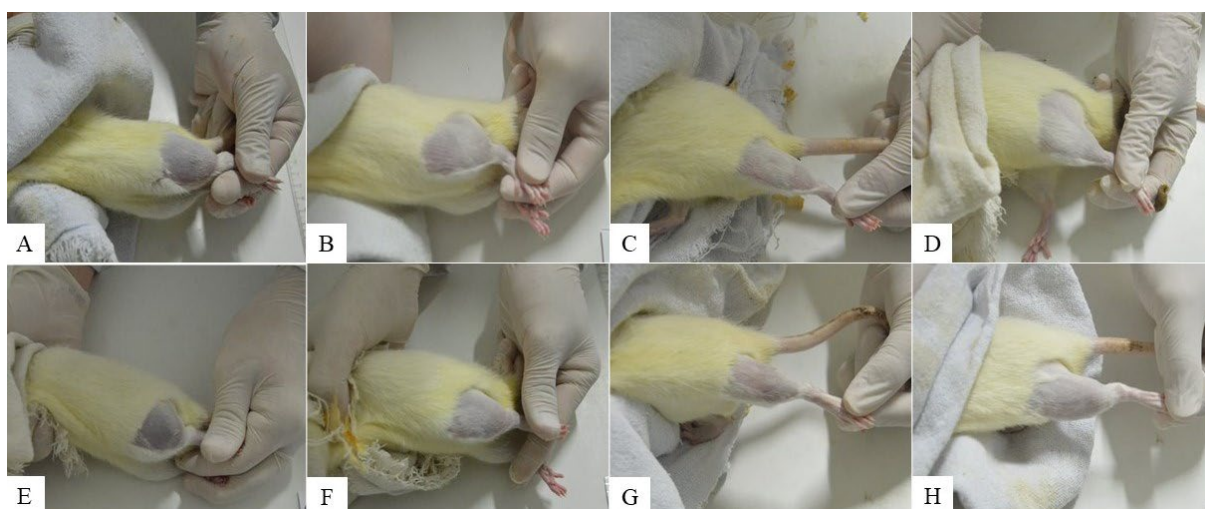


Fig. 2. Alterações em membro posterior esquerdo causadas pelo veneno de *L. m. muta* e efeito do tratamento com antiveneno e ozonioterapia. **(A, B, C, D)** animais do GV nos momentos 6h, 24h, 48h e 72h, respectivamente; **(E, F, G, H)** animais do GO3 nos momentos 6h, 24h, 48h e 72h, respectivamente. Em **A** e **E** intenso edema e coloração cianótica que regrediram ao longo do tempo. Ao final, **D** e **H**, lesões com aspecto róseo e sem edema.

Tabela1

Aspecto clínico de ratos *Wistar* inoculados com veneno de *Lachesis muta muta* e tratados com antiveneno e ozonioterapia.

	Painful sensitivity (%)			Oedema (%)			Color of the lesion (%)				
	GV	GO3	p	GV	GO3	P	GV		GO3		p
							Rose	Cyanotic	Rose	Cyanotic	
M6h	100	100	-	100	100	-	0	100	0	100	-
M24h	95	52	<0,05	100	43	<0,05	23	77	76	24	<0,05
M48h	91	19	<0,05	82	5	<0,05	32	68	81	19	<0,05
M72h	45	0	<0,05	32	0	<0,05	73	27	100	0	<0,05

$p < 0,005$ comparison of groups at each moment.

Em nosso estudo, em comparação com o grupo tratado somente com antiveneno, os animais submetidos a ozonioterapia apresentaram importante melhora clínica, com diminuição considerável da dor muscular esquelética e do edema logo nas primeiras 24h (Tabela1).

3.2. *Alterações histopatológicas provocadas por veneno de Lachesis muta muta e tratamento com antiveneno e ozonioterapia em ratos Wistar*

A análise histopatológica da musculatura esquelética demonstrou que o veneno de *L. m. muta* causa importante mudança na morfologia tecidual caracterizada por edema, necrose muscular, infiltrado inflamatório neutrofílico, hemorragia, degeneração e congestão (Fig. 4). A aplicação de antiveneno 6h após inoculação de veneno laquétrico não foi capaz de impedir o dano tecidual durante as primeiras 24h após a intoxicação. Somente no M72h os animais do GV apresentaram uma melhora do edema ($p < 0,001$), hemorragia ($p < 0,001$) e congestão ($p = 0,003$). A ozonioterapia, por sua vez, tanto isolada (M6h) quanto em associação com o antiveneno, mostrou-se eficaz para prevenir a miotoxicidade esquelética local em todos os parâmetros no GO3, com o decorrer dos momentos.

Logo nas primeiras 6h após inoculação do veneno houve formação de edema pronunciado (Fig. 3A). No GV o edema apresentou aumento progressivo (M24h), mesmo após administração do antiveneno, tendo sua redução observada somente no M72h. Já no GO3, embora tenha havido formação de edema intersticial, o score médio no M6h foi menor (2,7) que no grupo que não recebeu a ozonioterapia (3,8) ($p = 0,047$), manteve-se estável até M24h e posteriormente apresentou regressão significativa no M72h ($p = 0,005$), maior do que a dos animais tratados somente com antiveneno, no mesmo momento. O GO3 no M72h comparado com o GC não apresentou diferença estatisticamente significativa, o que demonstra a redução do edema, evidente também na avaliação do infiltrado inflamatório (Fig. 3F) e na avaliação clínica.

A formação de necrose tecidual na musculatura esquelética ocorreu em todos os animais inoculados com veneno de *L. m. muta* (Fig. 3B). Porém, os animais do grupo O3 evoluíram com redução progressiva da necrose no decorrer do tratamento. Ao final, quando comparados os GV e GO3 no M72, notamos diferença estatisticamente significativa ($p = 0,004$).

A intensa congestão causada pelo veneno laquético foi evidenciada tanto no grupo veneno, quanto no grupo ozônio. Contudo, na avaliação entre momentos do grupo O3, observamos que houve regressão mais significativa ($p < 0,001$) da congestão entre M6h e M72h, e, entre M24h e M72h (Fig. 3C).

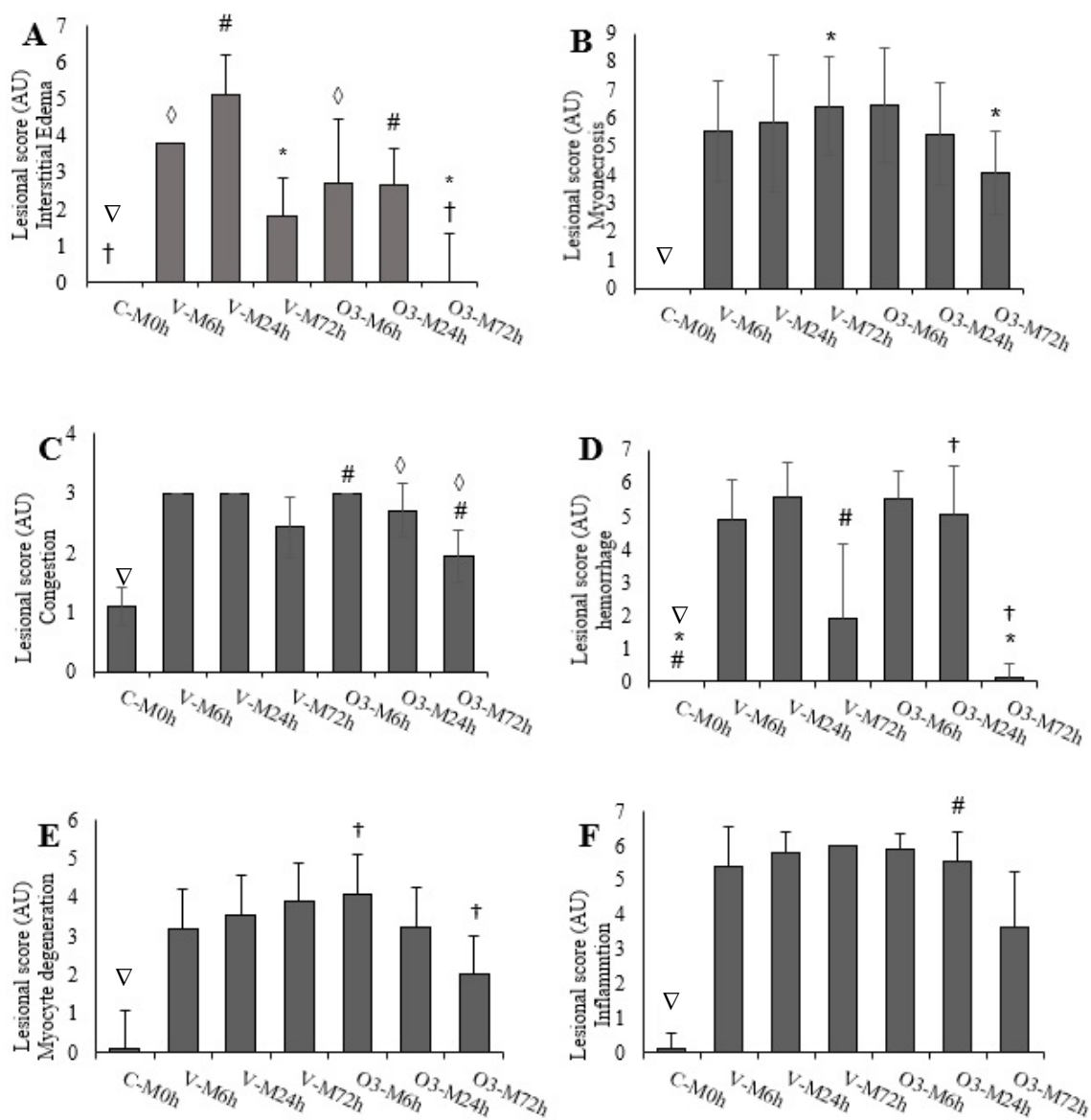


Fig. 3. Score lesional da musculatura esquelética de membro posterior esquerdo. O grupo controle (C-M0h) se diferenciou estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais grupos em todas as variáveis (∇) (A) edema pronunciado logo nas primeiras 6h após inoculação do veneno, principalmente no grupo que foi tratado somente com antiveneno (GV), o grupo tratado com ozônio (GO3) apresentou regressão quase total do edema, ao decorrer dos momentos. \diamond V-M6h x O3-M6h ($p = 0,047$); #V-M24h x O3-M24h ($p < 0,001$); * V-M72h x O3-M72h ($p = 0,005$); †C-M0h x O3-M72h. (B) necrose tecidual em ambos os grupos. *V-M72h x O3-M72h ($p=0,004$). (C) congestão causada pelo veneno laquético, nos grupos V e O3. Porém, na avaliação entre momentos do grupo O3, houve regressão mais significativa. #O3-M6h x M72h ($p < 0,001$); e no \diamond M24h x M72h ($p < 0,001$). (D) redução da hemorragia no grupo

tratado somente com antiveneno apenas no M72h. No grupo O3 houve redução progressiva. # C-M0h x V-M72h ($p = 0,002$); * C-M0h x O3-M72h ($p=0,933$); † group O3 M24h x M72h ($p < 0,001$). **(E)** Degeneração, ocorreu melhora entre †O3-M6h e O3-M72h ($p<0,001$). **(F)** No GO3 houve redução do processo inflamatório a partir do #M24h ($p=0,006$).

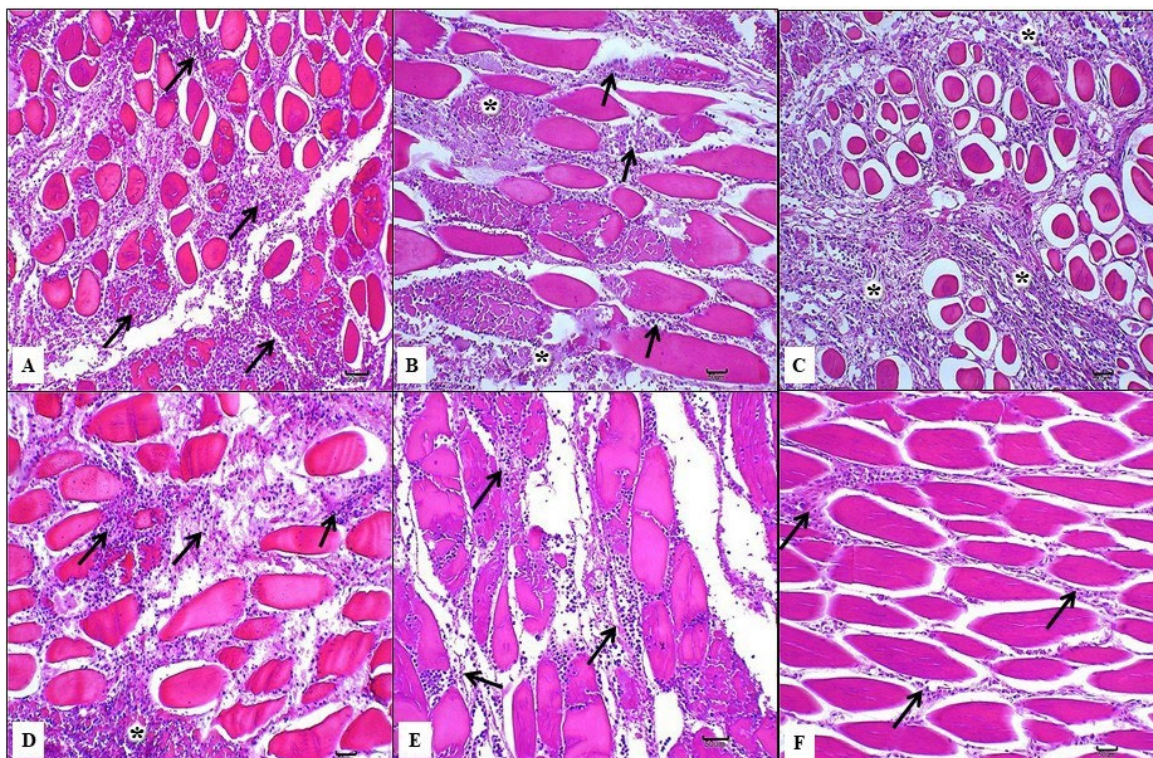


Fig. 4. Efeitos do veneno de *Lachesis muta muta* e do tratamento com antiveneno e ozônio na morfologia do músculo esquelético de ratos. **(A)** GV-M6h: degeneração severa de miócitos e necrose; infiltrado inflamatório neutrofílico grave (setas). HE, barra 50 μ M. **(B)** GV-M24h: degeneração e necrose severa dos miócitos; infiltrado moderado infiltrado inflamatório neutrofílico (setas) e hemorragia (*). HE, bar50 μ M. **(C)** GV-M72h: degeneração e necrose de miócitos graves; reparação tecidual com proliferação de tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório crônico (*). HE, barra 50 μ M. **(D)** Grupo GO3-M6h: necrose grave de miócitos e infiltrado inflamatório neutrofílico grave (setas). HE, barra 50 μ M. **(E)** GO3-M24h: degeneração e necrose moderada de miócitos e infiltrado inflamatório neutrofílico (setas). HE, barra 50 μ M. **(F)** GO3-M72h: diminuição da necrose dos miócitos e do infiltrado inflamatório (setas). HE, barra 50 μ M.

Ao comparar o GC com GV, no M72h, notamos que o antiveneno causou redução da hemorragia (Fig. 3D) entre os momentos 24h e 72h ($p<0,001$) e, embora, no M72h, a hemorragia tenha diminuído no GV ($p = 0,002$) com score médio de 1,9, os animais submetidos a ozonioterapia apresentaram maior redução, com score médio de 0,9, próximo ao do controle. Ainda no GO3, pode-se observar diminuição progressiva da hemorragia entre os momentos.

A degeneração de miócitos provocada pelo envenenamento foi intensa no GV e no GO3, porém com o passar do tempo, no GV, tratado somente com antiveneno, houve progressão da lesão, enquanto, no grupo que recebeu a ozonioterapia (GO3) a lesão regrediu consideravelmente. Note que há diferença estatística significativa entre M6h e M72h no GO3 ($p < 0,001$), o que não observamos no grupo veneno (Fig. 3E).

Quanto à inflamação neutrofílica causada pelo veneno, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os demais grupos em todos os momentos ($p < 0,001$) (Fig. 3F). Porém, vale ressaltar que, o GO3 apresentou redução do processo inflamatório desde o M6h, provavelmente devido a aplicação de ozônio após 3h de inoculação do veneno, sendo esta redução progressiva, principalmente entre o M24h e M72h ($p = 0,006$), quando foi associado o antiveneno. A associação foi eficiente no combate da inflamação tecidual.

3. DISCUSSÃO

Neste estudo, a ozonioterapia demonstrou grande potencial terapêutico em alguns aspectos locais do envenenamento por *L. m. muta* em ratos, como: redução significativa da dor e do edema muscular e melhora do aspecto cianótico da lesão ao prevenir hemorragia subcutânea, em associação com o antiveneno; redução significativa da formação de mionecrose local após associação;

O envenenamento por *Lachesis sp.* pode produzir efeitos locais devido às várias enzimas e proteínas que compõem o veneno. Miotoxicidade (Damico et al., 2006, 2005), edema, úlcera (Ferreira et al., 2009; Pereira, 2021), atividade proteolítica (Cordeiro et al., 2018) distúrbios hemorrágicos e hemodinâmicos (Bard et al., 1994; Cordeiro et al., 2015; Diniz-Sousa et al., 2020; Muniz et al., 2021; Rucavado et al., 1999; Sánchez et al., 1995, 1991) são comuns em casos de acidente laquético, porém, podem ser debelados ou até evitados quando tratados em tempo hábil e com um antiveneno adequado. Contudo, a falta ou dificuldade de acesso ao serviço de saúde e demora no atendimento em determinadas regiões, podem resultar em morte por acidentes envolvendo serpentes *Lachesis sp.* (Mise et al., 2018).

A avaliação clínica da lesão teve início no primeiro dia, sendo observadas as alterações como dor, edema e cianose logo nas primeiras horas após a aplicação do

veneno. Em um estudo que avaliou o edema inflamatório induzido com veneno de *L. m. muta*, Ferreira et al., (2009), observou o aumento da permeabilidade microvascular por mecanismos que envolvem, *in vivo*, a ativação de mastócitos e metabólitos de ácido araquidônico, bem como, que as respostas induzidas pelo veneno também envolvem a liberação de substância P, bradicinina e óxido nítrico. É amplamente aceito que dor e edema são sintomas comuns ao processo inflamatório, em nosso estudo, em comparação com o grupo tratado somente com antiveneno, os animais submetidos a ozonioterapia apresentaram importante melhora clínica, com diminuição considerável da dor muscular esquelética e do edema logo nas primeiras 24h. Tal achado pode ser justificado pelo efeito do ozônio, não apenas na mediação da inflamação, como sugerido anteriormente, mas também na percepção e modulação nociceptiva, o que corrobora com outras pesquisas (Babaei-Ghazani et al., 2019; de Sire et al., 2021, 2020; Melchionda et al., 2012; Raeissadat et al., 2018; Ryska et al., 2021). Diante do exposto, a ozonioterapia pode ser considerada uma alternativa promissora na mediação do processo inflamatório agudo e seus sintomas, tanto isoladamente quanto em combinação com outros tratamentos.

O estudo histopatológico do membro inoculado revelou que os animais tratados somente com antiveneno polivalente, sofreram acentuadas alterações circulatórias, edema intersticial, congestão e hemorragia, infiltrado inflamatório neutrofílico, necrose e degeneração de miócitos (Fig. 4). Somente no M72h houve redução das alterações circulatórias e mudança da composição inflamatória, passando a ter predomínio de macrófagos e discreta proliferação de tecido conjuntivo e neovascularização, porém o antiveneno sozinho não foi capaz de reduzir a mionecrose. Enquanto os animais tratados com a associação de ozônio e antiveneno, apresentaram melhora já no M24h, caracterizada por discreta redução das lesões teciduais e presença de infiltrado inflamatório misto (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) e, ao final do tratamento, M72h, uma acentuada redução das alterações morfológicas, caracterizada por diminuição da hemorragia, edema, congestão, degeneração e necrose tecidual. O infiltrado inflamatório, neste momento, apresentou predomínio de macrófagos, com grande proliferação de tecido conjuntivo e neovascularização para reparo tecidual (Fig. 4F). Sagai and Bocci, (2011) sugerem que o ozônio pode estimular o sistema antioxidante, regular respostas inflamatórias, melhorar a reologia vascular, aumentar o fluxo sanguíneo e a oxigenação em tecidos em hipóxia.

O tratamento tópico com ozônio vêm sendo estudado acerca do efeito cicatricial na redução do tempo de retração de feridas em diferentes espécies (Shete et al., 2016). Pereira, (2021) investigou o óleo de girassol ozonizado no tratamento de ratos inoculados com veneno de *L. m. muta* e observaram resultados promissores no processo cicatricial, sem efeitos adversos. Em nosso estudo este tratamento também foi proposto, mas, como citado anteriormente, nos animais inoculados não ocorreu a formação de ferida. A concentração de ozônio (30µg/mL) utilizada neste estudo também não causou efeitos adversos, mostrando-se segura. (Naserzadeh et al., 2017; Sagai and Bocci, 2011) mostram que a eficácia terapêutica do ozônio está relacionada ao estresse oxidativo controlado e moderado como resultado de reações de ozônio com componentes biológicos e que, a linha tênue entre a eficácia e toxicidade do ozônio pode ser dose dependente.

Existem algumas hipóteses acerca dos mecanismos de ação do ozônio no metabolismo (Bocci, 2006; Borrelli and Bocci, 2018). Estudos defendem que após penetrar no organismo o O₃ é capaz de promover a melhora da oxigenação que por sua vez favorece o metabolismo celular, o que contribui para excreção de produtos tóxicos gerados pelo catabolismo celular, além de contribuir para a regulação dos mecanismos de defesa imunológica, inclusive com efeito imunomodulador (Recio et al., 1999; Sagai and Bocci, 2011). O processo de ozonização que ocorre no sangue e intramuscular representa um estresse oxidativo agudo que, desde que seja precisamente calculado de acordo com uma dosagem criteriosa, não é deletério, mas é capaz de provocar uma infinidade de respostas biológicas úteis e, possivelmente, pode reverter o estresse oxidativo e restaurar a homeostase, bem como, estimular fatores de crescimento liberados de plaquetas e células endoteliais (Bocci, 2006). Segundo Shete et al., (2016) o mecanismo pode estar relacionado com o aumento da metabolização do oxigênio (O₂) pois o O₃ estimula o aumento da taxa de glicólise nas hemácias, aumentando a síntese do 2,3-difosfoglicerato, que por consequência aumenta a oferta de O₂ para os tecidos, promovendo uma melhor cicatrização e recuperação do tecido injuriado. Uma outra hipótese está relacionada a ativação do sistema imunológico. O O₃ quando administrado nas doses entre 30 e 55 µg/mL causa elevação da síntese de interferons, diminuição da interleucina-2, e fator de necrose tumoral, atuando como imunomodulador, diminuindo a intensidade das reações imunológicas posteriores (Shete et al., 2016). Após anos de pesquisa sobre as propriedades medicinais da terapia com ozônio Borrelli e Bocci, (2018)

recomendam o emprego da ozonioterapia para tratar diversas desordens inflamatórias. É importante ressaltar que, embora a literatura demonstre a eficácia do ozônio, o mesmo deve ser utilizado como adjuvante a terapia convencional, uma vez que pode melhorar os resultados do tratamento clínico e farmacológico (Clavo and Santana-Rodriguez, 2012; Re et al., 2012)

Para concluir, a ozonioterapia demonstrou sua eficácia no tratamento adjuvante do anti-veneno polivalente em casos de envenenamento por *Lachesis muta muta* e também isoladamente nas primeiras horas logo após envenenamento. A ozonioterapia na dose de 30µg/mL pode contribuir para minimizar os efeitos inflamatórios locais causados pela toxina laquética.

Declaração de crédito autoral

Gabriela Haro de Melo: Conceituação, metodologia, experimento, investigação, redação - rascunho original, recursos; **Liliane Giroto Pereira:** Experimento e Investigação; **Matheus Barreto dos Santos:** Experimento e Investigação; **Elisângela Olegário da Silva:** Investigação, redação - rascunho original; **Arnaldo Farina:** Investigação e recursos; **Rafael Stuaní Floriano:** Investigação e recursos; **Cecília Laposy Santarém:** Investigação; **Rosa Maria Barilli Nogueira:** Conceituação, metodologia, redação - revisão, recursos, supervisão e coordenação da pesquisa

Declaração de conflitos de interesse

Os autores declaram não haver nenhuma empresa com conflito de interesses financeiro, ou, relações pessoais que poderiam ter para influenciar o trabalho relatado neste artigo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Nelson Jorge da Silva Jr e a Pontifícia Universidade Católica de Goiás pela doação do *pool* de veneno utilizado neste experimento; a Gracielle V. Gonçalves, Ana Maria S. S. Wehbe, Cleonice Trevisan, Gabrielle G. S. Ribeiro e Estevam Salomão pela assistência técnica. Este trabalho foi financiado por recursos institucionais da Universidade do Oeste de São Paulo (UNOESTE) Presidente Prudente, SP, Brasil).

REFERÊNCIAS

- Abegão, K.G.B., Bracale, B.N., Delfim, I.G., Santos, E.S. dos, Laposy, C.B., Nai, G.A., Giuffrida, R., Nogueira, R.M.B., 2015. Effects of heterologous platelet-rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits. *Acta Cir. Bras.* 30, 209–15. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020150030000008>
- Albuquerque, P.L.M.M., Silva Junior, G.B., Jacinto, C.N., Lima, C.B., Lima, J.B., Veras, M.D.S.B., Daher, E.F., 2013. EPIDEMIOLOGICAL PROFILE OF SNAKEBITE ACCIDENTS IN A METROPOLITAN AREA OF NORTHEAST BRAZIL. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 55, 347–351. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500009>
- Babaei-Ghazani, A., Fadavi, H.R., Eftekharsadat, B., Ebadi, S., Ahadi, T., Ghazaei, F., Khabbaz, M.S., 2019. A Randomized Control Trial of Comparing Ultrasound-Guided Ozone (O2-O3) vs Corticosteroid Injection in Patients With Shoulder Impingement. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 98, 1018–1025. <https://doi.org/10.1097/PHM.0000000000001240>
- Bard, R., De Lima, J.C.R., Pereira De Sa Neto, R., Guedes De Oliveira, S., Dos Santos, M.C., 1994. Ineficacia do antiveneno botropico na neutralizacao da atividade coagulante do veneno de *Lachesis muta muta*. Relato de caso e comprovacao experimental. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 36, 77–81. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651994000100012>
- Barrionuevo, D. V., Laposy, C.B., Abegão, K.G.B., Nogueira, R.M.B., Nai, G.A., Bracale, B.N., Delfim, I.G., 2015. Comparison of experimentally-induced wounds in rabbits treated with different sources of platelet-rich plasma. *Lab. Anim.* 49, 209–14. <https://doi.org/10.1177/0023677214567747>
- Bocci, V., 2004. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm.* 13, 1, 3-11. <https://doi.org/10.1080/0962935062000197083>
- Bocci, V., Zanardi, I., Travagli, V., 2011. Ozone: A new therapeutic agent in vascular diseases. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 11, 73–82. <https://doi.org/10.2165/11539890-000000000-00000>
- Bocci, V. A., 2006. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Arch. Med. Res.* 37, 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.08.006>
- Borrelli, E., Bocci, V., 2018. The Use of Ozone in Medicine, *Annals of Medical and Health Sciences Research.* 8, 117–119. <https://www.amhsr.org/articles/the-use-of-ozone-in-medicine-4493.html>
- Brasil, C.N. de C. de E.A. (CONCEA), 2016. Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016. Brasil. https://ceua.ib.usp.br/images/Legislacao/32-Resolucao_Normativa_33181116.pdf
- Chippaux, J.P., 2017. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23.

<https://doi.org/10.1186/S40409-017-0127-6>

- Cho, K.-H., Kang, D.-J., Nam, H.-S., Kim, J.-H., Kim, S.-Y., Lee, J.-O., Kim, B.-J., 2021. Ozonated Sunflower Oil Exerted Protective Effect for Embryo and Cell Survival via Potent Reduction Power and Antioxidant Activity in HDL with Strong Antimicrobial Activity. *Antioxidants* (Basel, Switzerland) 10. <https://doi.org/10.3390/antiox10111651>
- Clavo, B., Santana-Rodriguez, N., 2012. Are we ready for a medical ozone challenge? *J. Exp. Integr. Med.* 2, 3, 189-191. <https://doi.org/10.5455/jeim.170612.ed.014>
- Re, L., Malcangi, G., MartinezSanchez, G., 2012. Medical ozone is now ready for a scientific challenge: current status and future perspectives. *J. Exp. Integr. Med.* 2, 3, 193 -196. <https://doi.org/10.5455/jeim.070612.ir.012>
- Colombini, M., Fernandes, I., Cardoso, D.F., Moura-da-Silva, A.M., 2001. *Lachesis muta muta* venom: immunological differences compared with *Bothrops atrox* venom and importance of specific antivenom therapy. *Toxicon* 39, 711–719. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00201-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00201-4)
- Cordeiro, F., Perini, T., Bregge-Silva, C., Cremonez, C., Rodrigues, R., Boldrini-França, J., C.F. Bordon, K., De Souza, D., Ache, D., M. Rodrigues, V., dos Santos, W., Rosa, J., Arantes, E., 2015. A New Phospholipase A2 from *Lachesis muta rhombeata*: Purification, Biochemical and Comparative Characterization with Crotoxin B. *Protein Pept. Lett.* 22, 816–827. <https://doi.org/10.2174/0929866522666150706112431>
- Cordeiro, F.A., Coutinho, B.M., Wiesel, G.A., Bordon, K. de C.F., Bregge-Silva, C., Rosa-Garzon, N.G., Cabral, H., Ueberheide, B., Arantes, E.C., 2018. Purification and enzymatic characterization of a novel metalloprotease from *Lachesis muta rhombeata* snake venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 2018 241 24, 1–11. <https://doi.org/10.1186/S40409-018-0171-X>
- Damico, D.C.S., Bueno, L.G.F., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S., da Cruz-Höfling, M.A., Novello, J.C., 2006. Functional characterization of a basic D49 phospholipase A2 (LmTX-I) from the venom of the snake *Lachesis muta muta* (bushmaster). *Toxicon* 47, 759–765. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.02.007>
- Damico, D.C.S., Bueno, L.G.F., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S., da Cruz-Höfling, M.A., Novello, J.C., 2005. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. *Toxicon* 46, 222–9. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.04.011>
- de Sire, A., Agostini, F., Lippi, L., Mangone, M., Marchese, S., Cisari, C., Bernetti, A., Invernizzi, M., 2021. Oxygen–Ozone Therapy in the Rehabilitation Field: State of the Art on Mechanisms of Action, Safety and Effectiveness in Patients with Musculoskeletal Disorders. *Biomolecules* 11, 356.

<https://doi.org/10.3390/biom11030356>

- de Sire, A., Stagno, D., Minetto, M.A., Cisari, C., Baricich, A., Invernizzi, M., 2020. Long-term effects of intra-articular oxygen-ozone therapy versus hyaluronic acid in older people affected by knee osteoarthritis: A randomized single-blind extension study. *J. Back Musculoskelet. Rehabil.* 33, 347–354. <https://doi.org/10.3233/BMR-181294>
- Diao, E., Ren, D., Liu, T., Zhang, J., Hu, W., Hou, H., 2018. Ozone detoxification of patulin in aqueous solution and cytotoxic evaluation using human hepatic carcinoma cells. *Toxicon* 155, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.10.004>
- Diniz-Sousa, R., Moraes, J. do N., Rodrigues-da-Silva, T.M., Oliveira, C.S., Caldeira, C.A. d. S., 2020. A brief review on the natural history, venomics and the medical importance of bushmaster (*Lachesis*) pit viper snakes. *Toxicon X* 7, 100053. <https://doi.org/10.1016/J.TOXCX.2020.100053>
- Domingos, T.F.S., Ortiz-Ramírez, F.A., Villaça, R.C., Cavalcanti, D.N., Sanchez, E.F., Teixeira, V.L., Fuly, A.L., 2012. Inhibitory effect of a Brazilian marine brown alga *Spatoglossum schröderi* on biological activities of *Lachesis muta* snake venom. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 741–747. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000049>
- du Sert, N.P., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W.J., Clark, A., Cuthill, I.C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S.T., Howells, D.W., Hurst, V., Karp, N.A., Lazic, S.E., Lidster, K., MacCallum, C.J., Macleod, M., Pearl, E.J., Petersen, O.H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E.S., Silberberg, S.D., Steckler, T., Würbel, H., 2020. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol.* 18, e3000411. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411>
- El-Mehi, A.E., Faried, M.A., 2020. Controlled ozone therapy modulates the neurodegenerative changes in the frontal cortex of the aged albino rat. *Ann. Anat. - Anat. Anzeiger* 227. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.151428>
- Elvis, A., Ekta, J., 2011. Ozone therapy: A clinical review. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2, 66. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.82319>
- Ferreira, R., Campos Passanezi, A., Lúcia Rubo de, M., Luiz Aguiar, S., Schutzer Raghianti, M., Andreotti, C., 2014. Ozonioterapia: uma visão crítica e atual sobre sua utilização em periodontia e implantodontia - revisão de literatura. *Innov Implant.* 9, 2/3, 35-39. <https://repositorio.usp.br/item/002711049>
- Ferreira, T., Camargo, E.A., Ribela, M.T.C.P., Damico, D.C., Marangoni, S., Antunes, E., De Nucci, G., Landucci, E.C.T., 2009. Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. *Toxicon* 53, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.10.016>
- Gerez, J.R., Pinton, P., Callu, P., Grosjean, F., Oswald, I.P., Bracarense, A.P.F.L.,

2015. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. *Exp. Toxicol. Pathol.* 67, 89–98. <https://doi.org/10.1016/J.ETP.2014.10.001>
- Grenier, B., Loureiro-Bracarense, A.-P., Luciola, J., Pacheco, G.D., Cossalter, A.-M., Moll, W.-D., Schatzmayr, G., Oswald, I.P., 2011. Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 761–771. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000402>
- Gupta, S., Deepa, D., 2016. Applications of ozone therapy in dentistry. *J. Oral Res. Rev.* 8, 86. <https://doi.org/10.4103/2249-4987.192243>
- Izadi, M., Kheirjou, R., Mohammadpour, R., Aliyoldashi, M.H., Moghadam, S.J., Khorvash, F., Jafari, N.J., Shirvani, S., khalili, N., 2019. Efficacy of comprehensive ozone therapy in diabetic foot ulcer healing. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 13, 822–825. <https://doi.org/10.1016/J.DSX.2018.11.060>
- Kanashiro, G.P., Cassu, R.N., 2008. Anestesia em animais selvagens e de laboratório. In: Andrade, S.F. *Manual de terapêutica veterinária*, third ed. Roca, São Paulo, SP
- Kim, H.S., Noh, S.U., Han, Y.W., Kim, K.M., Kang, H., Kim, H.O., Park, Y.M., 2009. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J. Korean Med. Sci.* 24, 368–374. <https://doi.org/10.3346/jkms.2009.24.3.368>
- Leão-Torres, A.G., Pires, C. V., Ribelato, A.C., Zerbinatti, M.C., Santarém, C.L., Nogueira, R.M.B., Giometti, I.C., Giuffrida, R., Silva, E.O., Gerez, J.R., Silva, N.J., Rowan, E.G., Floriano, R.S., 2021. Protective action of N-acetyl-L-cysteine associated with a polyvalent antivenom on the envenomation induced by *Lachesis muta muta* (South American bushmaster) in rats. *Toxicon* 198, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.04.018>
- Matos, R.R., Ignotti, E., 2020. Incidência de acidentes ofídicos por gêneros de serpentes nos biomas brasileiros. *Cien. Saude Colet.* 25, 2837–2846. <https://doi.org/10.1590/1413-81232020257.31462018>
- Melchionda, D., Milillo, P., Manente, G., Stoppino, L., Macarini, L., 2012. Treatment of radiculopathies: a study of efficacy and tollerability of paravertebral oxygen-ozone injections compared with pharmacological anti-inflammatory treatment. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 26, 467–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23034266>
- Mise, Y., Lira-da-Silva, R., Carvalho, F., 2018. Time to treatment and severity of snake envenoming in Brazil. *Rev. Panam. Salud Pública* 42, 1–6. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.52>
- Muniz, E.G., Noronha, M. das D.N., Saraiva, M. das G.G., Monteiro, W.M., Oliveira, S.S., 2021. Neutralization of hemostatic disorders induced by *Lachesis muta* venom using Brazilian antivenoms. *Toxicon* 191, 44–47.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.12.013>

Naserzadeh, P., Shahi, F., Shahbazzadeh, D., Ghanei, M., Ashtari, K., Panahi, Y., Hosseini, M.-J., Izadi, M., 2017. Protective Effect of Ozone against Hemiscorpius lepturus Envenomation in Mice. *Biomed. Environ. Sci.* 30, 581–590. <https://doi.org/10.3967/bes2017.077>

Pereira, L.G., 2021. Óleo de girassol ozonizado favorece a cicatrização de feridas induzidas pelo veneno de Lachesis muta muta em ratos wistar. Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, SP. <http://bdtd.unoeste.br:8080/jspui/handle/jspui/1343>

Pinho, F.M., Pereira, I.D., 2001. Snake bites. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 47, 24–9. <https://doi.org/10.1590/s0104-42302001000100026>

Raeissadat, S.A., Rayegani, S.M., Sadeghi, F., Rahimi Dehgolan, S., 2018. Comparison of ozone and lidocaine injection efficacy vs dry needling in myofascial pain syndrome patients. *J. Pain Res.* Volume 11, 1273–1279. <https://doi.org/10.2147/JPR.S164629>

Recio, L.E., Pino, D., Maritza, L., Serrano, A., Magalys Rodríguez Del Río, T., María De Los, D., Garrido, A., 1999. Aspectos de la ozonoterapia en pacientes con neuropatía periférica epidémica. *Rev. Cuba. Enfermer* 15, 114–122. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03191999000200010

Rucavado, A., Flores-Sánchez, E., Franceschi, A., Magalhaes, A., Gutiérrez, J.M., 1999. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from Lachesis muta muta snake venom. *Toxicon* 37, 1297–1312. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00268-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00268-2)

Ryska, P., Jandura, J., Hoffmann, P., Dvorak, P., Klimova, B., Valis, M., Vajda, M., 2021. Comparison of Pulsed Radiofrequency, Oxygen-Ozone Therapy and Epidural Steroid Injections for the Treatment of Chronic Unilateral Radicular Syndrome. *Medicina (B. Aires)*. 57, 136. <https://doi.org/10.3390/medicina57020136>

Sagai, M., Bocci, V., 2011. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med. Gas Res.* 1, 29. <https://doi.org/10.1186/2045-9912-1-29>

Sánchez, E.F., Costa, M.I.E., Chavez-Olortegui, C., Assakura, M.T., Mandelbaum, F.R., Diniz, C.R., 1995. Characterization of a hemorrhagic factor, LHF-I, isolated from the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) venom. *Toxicon* 33, 1653–1667. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00097-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00097-6)

Sánchez, E.F., Magalhães, A., Mandelbaum, F.R., Diniz, C.R., 1991. Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the Bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1074, 347–

356. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(91\)90084-T](https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90084-T)

- Saneshigue dos Santos, I.K.N., Iziqoe Goiozo, P.F., De Brito, A.F., De Melo, G.H., Pereira, C. de P., Nogueira, R.M.B., 2019. Fractal Dimension in Liver Histological Findings of Wistar Rats Experimentally Intoxicated with Venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Sci. Vet.* 47, 1662. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.91990>
- Sanz, L., Escolano, J., Ferretti, M., Biscoglio, M.J., Rivera, E., Crescenti, E.J., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2008. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. *J. Proteomics* 71, 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2007.10.004>
- Seyam, O., Smith, N., Reid, I., Gandhi, J., Jiang, W., Khan, S., 2018. Clinical utility of ozone therapy for musculoskeletal disorders. *Med. Gas Res.* 8, 103–110. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.241075>
- Shete, A. V, Subramaniam, A. V, Sable, D.M., Patil, S. V, Chavan, M.S., Shete, M. V, Diwan, N.N., 2016. Ozone Therapy: Healing Properties of the Blue Gas. *Int. J. Oral Heal. Dent.* 2, 35. <https://doi.org/10.5958/2395-499X.2016.00011.3>
- Travagli, V., Zanardi, I., Bocci, V., 2009. Topical applications of ozone and ozonated oils as anti-infective agents: an insight into the patent claims. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 4, 130–42. <https://doi.org/10.2174/157489109788490271>
- Travagli, V., Zanardi, I., Valacchi, G., Bocci, V., 2010. Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. *Mediators Inflamm.* 2010, 610418. <https://doi.org/10.1155/2010/610418>
- Trench, C.,O., J., 2007. Revisão sistemática de literatura sobre o uso terapêutico do ozônio em feridas. Universidade de São Paulo, São Paulo. https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/7/7139/tde-20122007-094050/publico/Juliana_Trench.pdf
- Ugazio, E., Tullio, V., Binello, A., Tagliapietra, S., Dosio, F., 2020. Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. Their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25020334>
- Waldez, F., Vogt, R.C., 2009. Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, Amazonas, Brasil. *Acta Amaz.* 39, 681–692. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672009000300025>
- Wiesel, G.A., Bordon, K.C., Silva, R.R., Gomes, M.S., Cabral, H., Rodrigues, V.M., Ueberheide, B., Arantes, E.C., 2019. Subproteome of *Lachesis muta rhombeata* venom and preliminary studies on LmrSP-4, a novel snake venom serine proteinase. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 25, e147018. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-1470-18>

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Efeito sistêmico da ozonioterapia na intoxicação experimental pelo veneno de *Lachesis muta muta* em ratos Wistar

Gabriela Haro de Melo^a, Liliane Giroto Pereira^a, Matheus Barreto dos Santos^b, Elisângela Olegário da Silva^c, Arnaldo Farina^d, Rafael Stuani Floriano^e, Cecília Laposy Santarem^e, Luis Souza Lima de Souza Reis^e, Rosa Maria Barilli Nogueira^e

^a*Discente do Programa de Pós-graduação de Fisiopatologia e Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares Km 572, B2-205, 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brasil.*

^b*Discente da Faculdade de Farmácia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, Cidade Universitária, CEP 19050-920, Presidente Prudente, SP, Brasil.*

^c*Laboratório de Anatomia Patológica, Hospital Veterinário, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares Km 572, 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brasil.*

^d*Médico Veterinário, Especialista em Fisioterapia e Ozonioterapia Veterinária.*

^e*Docente do Programa de Pós-graduação de Fisiopatologia e Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares Km 572, B2-205, 19067-175, Presidente Prudente, SP, Brasil.*

Resumo

Neste estudo, avaliamos os efeitos sistêmicos da terapia com ozônio (O₃) em associação com um antiveneno polivalente para reduzir os efeitos sistêmicos agudos induzidos pelo veneno de *Lachesis muta muta* em ratos. Foram utilizados 140 ratos Wistar machos; 20 para o grupo controle e 120 foram expostos ao veneno laquétrico (1,0mg/kg – IM) e posteriormente tratados com antiveneno polivalente (soro anti-*Bothrops/Lachesis* - 6h após) e gás ozônio (30mg/mL – IP) + óleo de girassol ozonizado tópico (3h, 6h, 24h e 72 horas pós exposição ao veneno). Vinte animais por grupo foram anestesiados para coleta de sangue por punção intracardíaca e depois eutanasiados para coleta de sangue e tecido. As análises hematológico-bioquímica e histopatológica foram realizadas por métodos convencionais. O veneno laquétrico produziu aumento de creatina quinase (CK), ureia, creatinina, leucócitos, neutrófilos, fibrinogênio, lesão renal degenerativa, congestão, hemorragia e necrose tubular aguda. A liberação de (CK) foi significativamente prevenida pelo ozônio em combinação com soro antiofídico; a associação também foi parcialmente efetiva para

reduzir os biomarcadores séricos de ureia e creatinina e neutrófilos; o tratamento associado foi mais eficaz na redução da necrose, congestão, degeneração renal e hemorragia. Em conclusão, a terapia com ozônio em associação com um antiveneno polivalente tem o potencial de reduzir uma série de efeitos sistêmicos causados pelo veneno laquétrico em rato.

Palavras-chave: *Lachesis muta muta*; Ozonioterapia sistêmica; Antiveneno; Toxicidade sistêmica; Rato

Destaques

Ozonioterapia, pode ser um tratamento eficaz no acidente provocado por *Lachesis muta muta*.

Associada ao antiveneno, a ozonioterapia é eficaz na prevenção da miotoxicidade sistêmica.

A terapia de ozônio reduz, progressivamente, a hemorragia causada por envenenamento.

A ozonioterapia é um fator protetivo no combate a lesão renal aguda causada pelo veneno de *L. m. muta*.

Corresponding author.

E-mail address: gabrielamelo@unoeste.br (G.H.Melo).

1. INTRODUÇÃO

Acidentes ofídicos são relevantes uma vez que podem causar incapacidades permanentes, gerando transtornos econômico e psicológico e assim, constituem um problema de saúde pública mundial (Ochoa-Avilés et al., 2020). A preocupação é tão representativa que a Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu o acidente envolvendo serpentes na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (Chippaux, 2017).

As principais serpentes peçonhentas de interesse médico em nosso país, causadoras de acidentes, são as dos gêneros *Bothrops* (jararacas) com 86,8%, *Crotalus* (cascavel) com 8,9%, *Lachesis* (surucucu) com 3,5% e *Micrurus* (coral) com 0,8% dos acidentes, no período de 2003 a 2012, presentes na região da Amazônia e Mata Atlântica (Matos and Ignotti, 2020).

As toxinas conhecidas da *Lachesis muta muta* são as serinoproteinases, L-aminoácido oxidase, fosfolipases A₂, hialuronidase e lecitina tipo C (Sanz et al., 2008; Chippaux, 2017; Wiezel et al., 2019). Alguns autores relatam no acidente laquétrico ações proteolítica, coagulante e hemorrágica com ação necrosante, atividade do tipo trombina e ação de hemorragias com sinais clínicos locais e sistêmicos como infecção bacteriana, insuficiência renal, manifestações hemorrágicas diversas, síndrome vagal (manifestada por vômitos, dores abdominais, diarreia e bradicardia) o que pode ser grave e provocar o óbito do paciente (Diniz-Sousa et al., 2020; Leão-Torres et al., 2021). Contudo, a gravidade do acidente, além de outros fatores, se relaciona principalmente com o tempo da ocorrência até o atendimento (Mise et al., 2018; Pinho and Pereira, 2001).

Em geral o tratamento do acidente ofídico consiste na aplicação do antiveneno o mais rápido possível, pois a soroterapia neutraliza o veneno circulante e impede novas lesões. Contudo, as lesões que já ocorreram são geralmente irreversíveis e mais propensas às complicações (Muniz et al., 2021; Pinho and Pereira, 2001).

No Brasil, os antivenenos para *Lachesis muta muta* são polivalentes e consistem em imunoglobulinas produzidas a partir de equinos hiperimunizados com um *pool* de venenos de cinco espécie de serpentes *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) e *Lachesis muta*. Embora a aplicação do antiveneno seja o tratamento convencional, possui pouca ação de neutralização sobre os efeitos locais, possibilidade de reação de hipersensibilidade

imediate e tardia, problemas de regionalização das espécies das serpentes, falta de disponibilidade em regiões distantes e alto custo de produção com baixa margem de lucro, o que reduz o interesse das indústrias farmacêuticas (Albuquerque et al., 2013; Colombini et al., 2001; Domingos et al., 2012; Waldez and Vogt, 2009). Diante disso, o emprego de um tratamento adjuvante, com o intuito de minimizar os efeitos sistêmicos provocados pelo veneno, pode apresentar efeitos positivos, como observado no estudo de Leão-Torres et al., (2021).

A ozonioterapia tem sido utilizada em várias situações, pois estimula uma série de mecanismos que contribuem para a normalização da disponibilidade de O₂, que conseqüentemente resulta em melhora nas doenças relacionadas a falta do mesmo, como: isquemias, má cicatrização, infecções, estresse oxidativo (Bocci et al., 2011; Bocci, 2006; Cho et al., 2021; Elvis and Ekta, 2011; Travagli et al., 2010, 2009; Ugazio et al., 2020), no tratamento da dor e distúrbios musculoesqueléticos (Babaei-Ghazani et al., 2019; Ryska et al., 2021; Seyam et al., 2018).

Considerando que a eficácia de adjuvantes terapêuticamente úteis para tratar os efeitos induzidos por esses venenos precisam ser mais investigados, a terapia com ozônio tornou-se objeto de estudo para esta pesquisa, cujo objetivo foi avaliar os efeitos sistêmicos da ozonioterapia como tratamento adjuvante do anti-veneno polivalente em casos de envenenamento por *Lachesis muta muta* em ratos Wistar, através de uma abordagem bioquímica, hematológica e histopatológica.

2. METODOLOGIA

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista, sob protocolo nº 5487, desenhado e monitorado de acordo com os princípios éticos preconizados pela Resolução Normativa 33 do CONCEA (Brasil, 2016) e as diretrizes ARRIVE (du Sert et al., 2020).

2.1. Modelo experimental

Foram utilizados 140 ratos Wistar, machos, com peso médio de 350g, mantidos em gaiolas individuais, com água e ração à vontade, em ambiente climatizado com temperatura de 22°C ± 2°C, em fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, aclimatados uma semana antes de iniciar o experimento.

2.2 Veneno bruto e antiveneno

No primeiro dia de experimento 120 ratos foram submetidos a tricotomia em membro posterior esquerdo e inoculados com 1,0mg/Kg de veneno de serpente *Lachesis muta muta*, por via intramuscular (IM) (Saneshigue et al., 2019). A amostra liofilizadas do "Pool" de venenos de *Lachesis muta muta* foram fornecidas pelo Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da PUC de Goiás e mantidas congeladas a -20°C até o momento de uso. Após seis horas procedeu a aplicação intraperitoneal (IP) do antídoto comercial, soro antiofídico polivalente Master Soro Plus® (Vencofarma), na dose preconizado pelo fabricante, para neutralizar a toxina inoculada. Os 20 animais restantes não sofreram qualquer intervenção – não receberam veneno, ou, antiveneno – e foram eutanasiados, sendo este grupo destinado à avaliação dos valores basais e comparação com os demais.

2.3 Tratamento

Para o tratamento (Fig.1), os animais foram randomizados e distribuídos em dois grupos com 60 animais cada, sendo: O grupo veneno – (GV) recebeu tratamento com solução fisiológica (NaCl 0,9%), 2 gotas em membro inferior esquerdo – via tópica, e 3mL por via IP. O grupo Ozônio – (GO3) foi tratado com aplicação IP de gás ozônio na concentração de 30µg/mL e óleo de girassol ozonizado, por via tópica em membro posterior esquerdo. Foram instiladas duas gotas (cerca de 0,1mL) no local de inoculação do veneno e com auxílio de hastes de algodão para espargir, padronizou-se 5 movimentos circulares. O óleo de girassol ozonizado, contendo índice de peróxido equivalente padronizado de 700meq/kg, foi adquirido pronto para uso da Ozone&Life® - Tecnologia em Geradores de Ozônio. O gás aplicado por via IP é uma mistura de gás oxigênio (95%) e ozônio (5%) (O₂-O₃) que foi gerado com auxílio de aparelho Gerador na concentração de 30µg/mL (de Sire et al., 2021; Diao et al., 2018; El-Mehi and Faried, 2020), captado com seringa de 3mL e aplicado com auxílio de agulhas descartáveis no tamanho 25x8mm (21G), marca BD®. Os tratamentos ocorreram, às 3h, 6h, 24h e 48 horas após inoculação do veneno

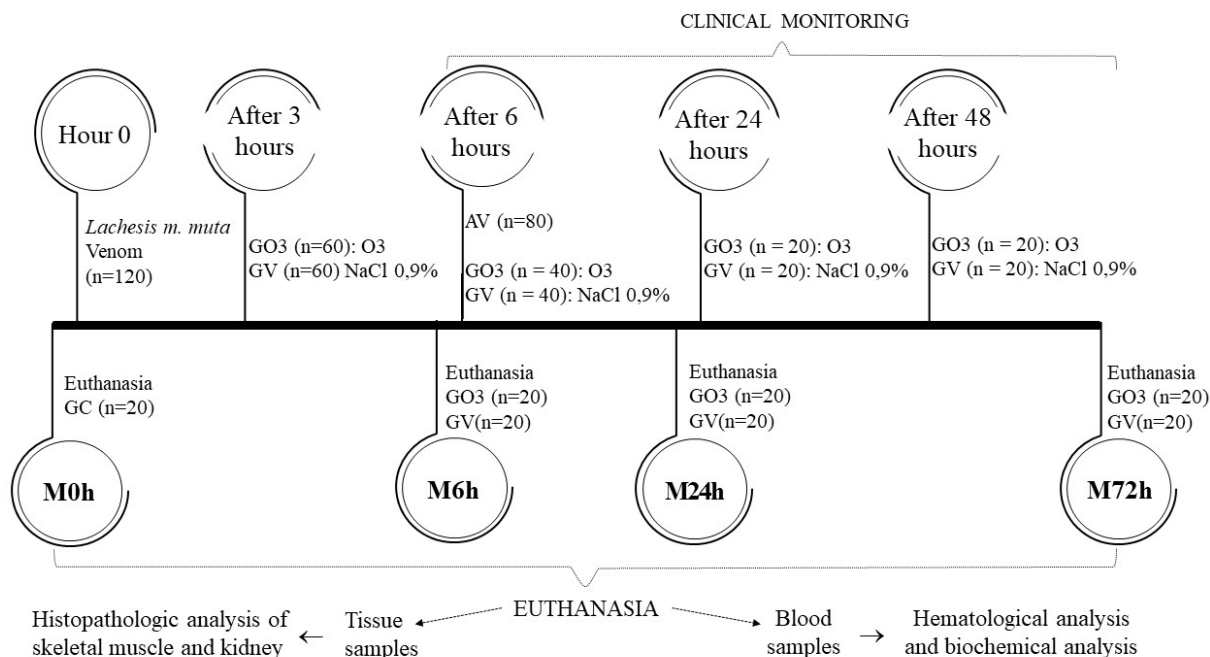


Fig. 1. Desenho experimental. Antiveneno (AV); Terapia com ozônio (O3); Grupo veneno (GV); Grupo ozônio (GO3); Grupo controle “basal” (GC). Momento 0 (M0); Momento 6 horas (M6h), após inocular o veneno; Momento 24 horas (M24h), após inocular o veneno; Momento 72 horas (M72h), após inocular o veneno.

Com o intuito de avaliar o efeito de cada tratamento, a eutanásia ocorreu de forma gradativa com 20 animais de cada grupo nos momentos 6h (avaliação dos efeitos até 3h); momento 24h (avaliação dos efeitos após 3h e 6h); momento 72h (avaliação dos efeitos após 3h, 6h, 24h e 48h). A eutanásia do grupo C ocorreu no momento 0 (M0h) (Fig. 1).

2.4 Eutanásia

Os animais foram anestesiados por via IP com a aplicação de cloridrato de Xilazina 2% (Xilazin[®]) na dose de 10mg/Kg e a Cetamina (Ketamina[®]) na dose de 60mg/Kg, segundo protocolo de (Kanashiro and Cassu, 2008). Posteriormente ocorreu punção intracardíaca, para coleta das amostras de sangue, onde foram utilizados adaptadores e agulhas - 25x8mm (21G) -, descartáveis e tubos a vácuo, com anticoagulante EDTA para realizar o hemograma, e tubo sem anticoagulante para avaliação sorológica de ureia, creatinina e creatina quinase (CK), ambos da marca BD Vacutainer[®]. O óbito dos animais ocorreu por exsanguinação e foi confirmado pela ausência de movimentos respiratórios e batimentos cardíacos.

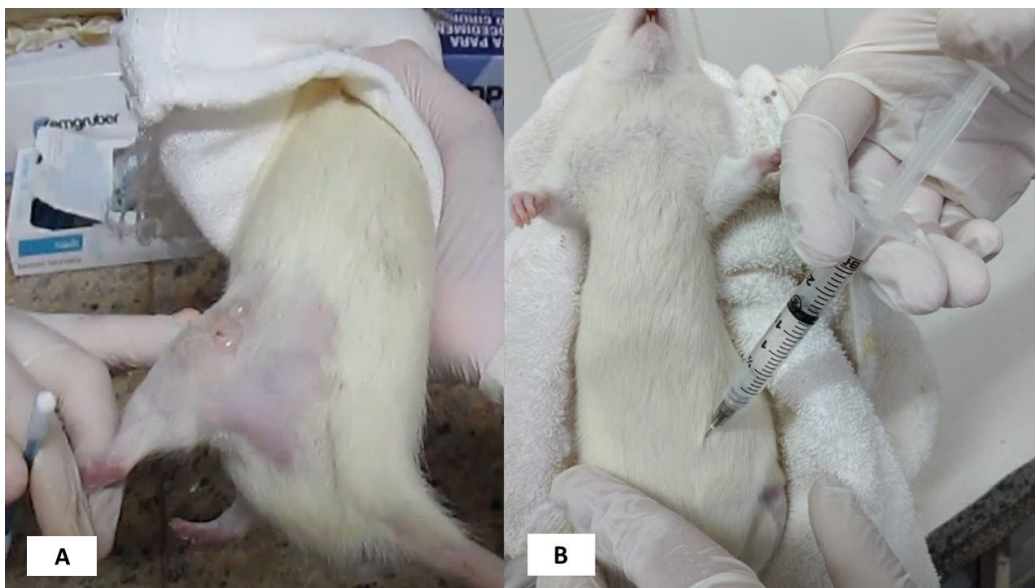


Fig. 2. Tratamento dos animais do grupo ozônio (GO_3). Aplicação do óleo de girassol ozonizado em membro posterior esquerdo e de gás ozônio por via intraperitoneal. **(A)** Aplicação de óleo de girassol ozonizado, em membro posterior esquerdo dos animais do grupo ozônio (GO_3). **(B)** Aplicação de gás ozônio ($30\mu\text{g}/\text{mL}$), por via intraperitoneal dos animais do grupo ozônio

2.5 *Análise bioquímica sérica*

Para analisar a atividade miotóxica e nefrotóxica do veneno de *L. m. muta*, foram utilizados os biomarcadores séricos creatina quinase (CK), ureia (Ur) e creatinina (Cr). Os ensaios foram realizados utilizando-se um analisador automático Cobas C111 (Roche Holding AG[®], Basel, Suíça), no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Unoeste, com amostras de soro e plasma, armazenadas após coleta. O analisador bioquímico utilizado é automático e os kits utilizados para testes diagnósticos também foram da marca Roche[®], seguindo as especificações do fabricante.

2.6 *Análise hematológica*

O Hemograma foi processado no aparelho POCH-100, modelo iV DIFF, (Sysmex do Brasil Indústria e Comércio Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil), cujo reagentes utilizados nas análises pertencem a mesma fabricante do aparelho. Foram determinados os parâmetros de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de

hemoglobina corpuscular média (CHCM), largura de distribuição de glóbulos vermelhos (RDW) e contagem total de leucócitos. Os valores relativos para reticulócitos foram determinados como uma porcentagem do total de glóbulos vermelhos (Bessman, 1990; Brandow, 2018). Para contagem diferencial de leucócitos, esfregaços sanguíneos foram corados com Diff-Quick (Panótico® - Laborclin Produtos para Laboratorios Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil) e, em seguida, analisados sob um microscópio óptico E- 200 Nikon (Nikon Inc., Tóquio, Japão), em aumento de 100x. A concentração de fibrinogênio foi determinada usando um refratômetro ATC-ITREF-200 (Instrutemp Instrumentos de Medição Ltda., São Paulo, SP, Brasil), por técnica calorimétrica e os resultados foram expressos em mg/dL. A concentração de proteína plasmática total (PPT) foi quantificada pelo mesmo refratômetro e os resultados foram expressos em g/dL.

2.7 *Análise histopatológica*

A histologia renal ocorreu a partir de biópsia de fragmentos dos rins direito e esquerdo. Os fragmentos dos tecidos renais foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas e posteriormente inclusos em parafina. Foram obtidos cortes de 5µm de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). A pontuação utilizada na avaliação histológica para estabelecer critérios lesão renal e muscular esquelético foi adaptada de estudos anteriores (Gerez et al., 2015; Grenier et al., 2011), assim, o escore de cada lesão foi obtido multiplicando-se o fator gravidade com a extensão da lesão. O escore do órgão foi então obtido pela soma de cada escore da lesão. Fator de gravidade (grau de gravidade): 1-lesões leves, 2-lesões moderadas, e, 3-lesões graves. A extensão de cada lesão (intensidade ou frequência observada) foi avaliada e pontuada como: 0-sem lesão, 1-baixa extensão (25% do tecido afetado), 2-intermediária (50% do tecido afetado) e 3-grande extensão (75% ou mais do tecido afetado).

2.8 *Análise estatística*

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

existência de associação entre variáveis qualitativas foi aplicado o Teste Qui-Quadrado ou, em algumas situações, o Teste Exato de Fisher. Para análise do score de lesão histopatológica foi aplicado o teste de normalidade dos dados (Shapiro Wilk), que obteve p-value menor que 0,01, portanto, foi constatado que os dados não seguem uma distribuição normal. Sendo assim, foi necessário aplicar um teste não-paramétrico (Kruskal-Wallis) para comparar os grupos.

3. RESULTADOS

3.1. Perfil hematológico de ratos Wistar inoculados com veneno de *Lachesis muta muta* e tratados com antiveneno e ozonioterapia

Tabela1

Parâmetros hematológicos de ratos *Wistar* inoculados com veneno de *Lachesis muta muta* e tratados com antiveneno e ozonioterapia.

Parâmetros	C	M6h		M24h		M72h		p
		GO3	GV	GO3	GV	GO3	GV	
Eritrócitos 10 ⁶ /mm ³	8,9 ^b	9,9 ^a	12 ^a	8,4 ^c	8,4 ^c	8,9 ^b	8,9 ^b	< 0,01
Hemoglobina g/dL	17,3 ^b	19,4 ^a	19,5 ^a	16,3 ^c	16,4 ^c	16,9 ^{bc}	16,5 ^{bc}	< 0,01
Hematócrito %	48,7 ^b	53,4 ^a	55,8 ^a	46 ^c	47,3 ^{bc}	47,8 ^{bc}	46,7 ^{bc}	< 0,01
VCM fL	54,4 ^{bc}	53,9 ^{cd}	54,8 ^{ab}	54,8 ^{bc}	56,2 ^a	53,5 ^d	54 ^{bcd}	< 0,01
HCM	18,64 ^{ab}	19,6 ^{ab}	19,6 ^a	19,4 ^{ab}	19,5 ^{ab}	19,1 ^b	19,1 ^{ab}	< 0,01
CHCM %	35,6 ^b	36,3 ^a	34,4 ^{ab}	35,5 ^b	34,7 ^c	35,7 ^b	35,4 ^b	< 0,01
RDW %	12,32 ^a	12,4 ^a	12,6 ^a	11,4 ^b	11,4 ^b	12,4 ^a	12,5 ^a	< 0,01
PPT g/dL	6,97 ^{ab}	5,3 ^c	5,5 ^c	6,8 ^b	7 ^{ab}	7 ^{ab}	7,1 ^a	< 0,01
Fibrinogênio mg/dL	240 ^b	276,2 ^b	295 ^b	485,7 ^a	495,2 ^a	409 ^a	390,9 ^a	< 0,01
Plaquetas/mm ³	119,8 ^a	1218,8 ^a	1241,6 ^a	934,9 ^b	943,9 ^b	1243,3 ^a	1288,9 ^a	< 0,01
Leucócitos	8340 ^b	14933,3 ^a	13461,9 ^a	8510 ^b	8219 ^b	8338 ^b	8236,4 ^b	< 0,01
N. Bastonetes	0 ^a	1 ^b	1 ^b	0 ^a	1 ^b	0 ^a	0 ^a	< 0,01
N. Segmentados	28,75 ^c	75,3 ^a	72,1 ^a	37 ^b	35 ^{bc}	29 ^c	28,9 ^c	< 0,01
Eosinófilos	1,25 ^a	1 ^{ab}	1 ^{ab}	1 ^b	1 ^b	2 ^{ab}	1,3 ^b	< 0,01
Linfócitos	63,9 ^{ab}	19,8 ^d	22,1 ^d	56 ^c	57,3 ^{bc}	66 ^a	63,5 ^{ab}	< 0,01
Monócitos	6,2 ^d	4,6 ^d	5,1 ^{bcd}	7 ^{abc}	7,5 ^a	5 ^{cd}	7,2 ^{ab}	< 0,01

Nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística; Letras iguais indicam momentos estatisticamente iguais.

Os animais inoculados com veneno (tanto GV, quanto GO3), quando comparados com o grupo controle (sem veneno), apresentaram alterações significativas ($p < 0,01$) caracterizadas pelo aumento de eritrócitos, hemoglobina e

hematócritos no M6h e redução no M24h, os valores de RDW e proteína plasmática total reduziram ($p<0,01$) nos momentos M6h e M24h. No momento M72h não foram identificadas alterações com significância estatística, nestes parâmetros. O fibrinogênio aumentou em todos os momentos, porém, com significância estatística ($p<0,01$) nos M24h e M72h. Quanto as plaquetas, ocorreu um leve aumento no M6h, quando comparado com o controle.

Durante avaliação microscópica do hemograma foi identificada hemólise discreta em 35% dos animais do GV, que não recebeu tratamento às 3h após inoculação do veneno.

O leucograma, dos grupos que receberam veneno, demonstram alterações quando comparados com o controle, ocorreu pronunciada leucocitose ($p<0,01$) no M6h com incremento de neutrófilos segmentados ($p<0,01$) e bastonetes ($p<0,01$), e, linfopenia ($p<0,01$) no M6h (Tabela 1) e posterior normalização.

3.2. Perfil bioquímico de ratos Wistar expostos ao veneno de *Lachesis muta muta* e tratados com antiveneno e ozonioterapia

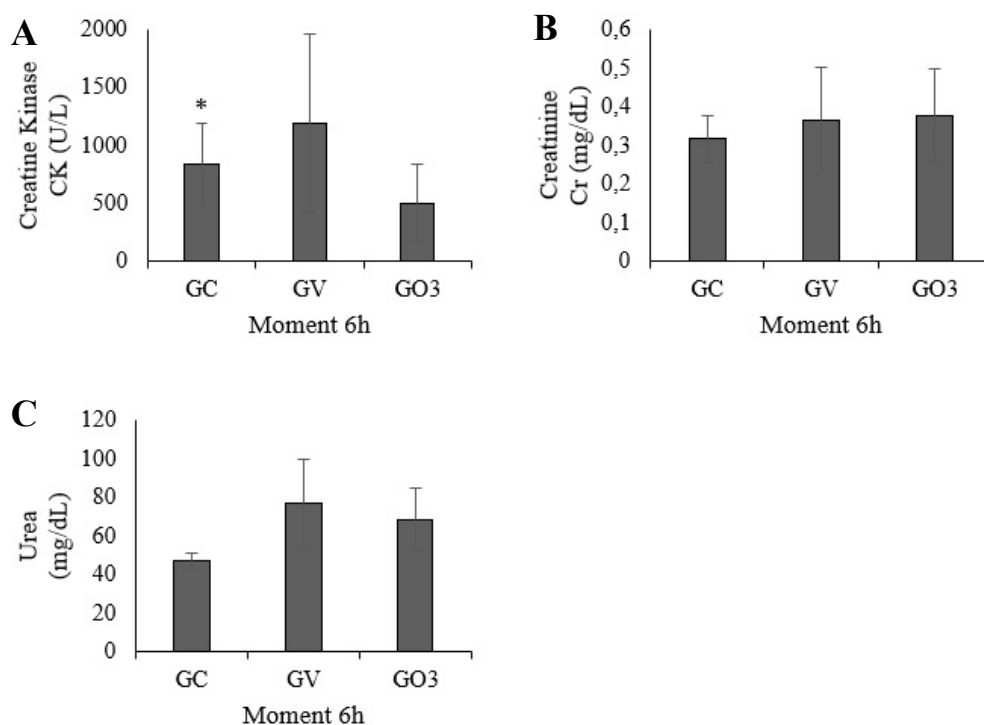


Fig. 3. Parâmetros bioquímicos, nos grupos controle (GC), veneno (GV), tratado somente com antiveneno, e grupo ozônio (GO3), tratado com antiveneno associado a ozonioterapia, no momento 6h, quando houve diferença entre os grupos. **(A)** valores de creatina-quinase (CK) com diferença significativa entre GC e GV, e GC e GO3; **(B)** Creatinina e; **(C)** Uréia.

Nos animais expostos à inoculação intramuscular de veneno de *L. m. muta*, houve aumento da liberação sérica de CK nas primeiras 6 horas após envenenamento, em comparação com controle ($p < 0,001$). O ozônio administrado às 3h após inoculação do veneno (GO3) mostrou-se eficaz ao evitar a liberação de CK ($p < 0,001$) quando comparado com o GV. Nos momentos de 24h e 72h não houve diferença significativa do nível sérico de CK entre os grupos (Fig. 3A).

O veneno causou um pequeno aumento dos níveis séricos de creatinina, sem diferença estatística significativa entre os grupos (Fig. 3B) em todos os momentos. Os níveis de ureia aumentaram significativamente ($p < 0,001$) nos grupos expostos, porém, o ozônio aplicado as 3h (GO3) conseguiu impedir a elevação de ureia ($p < 0,005$) quando comparado com o GV (Fig. 3C). Nos demais momentos (M24h e M72h) não ocorreram alterações estatísticas significativas no nível séricos dos marcadores.

3.3. Alterações histopatológicas do tecido renal provocadas por veneno de *Lachesis muta muta* e tratamento com antiveneno e ozonioterapia em ratos Wistar

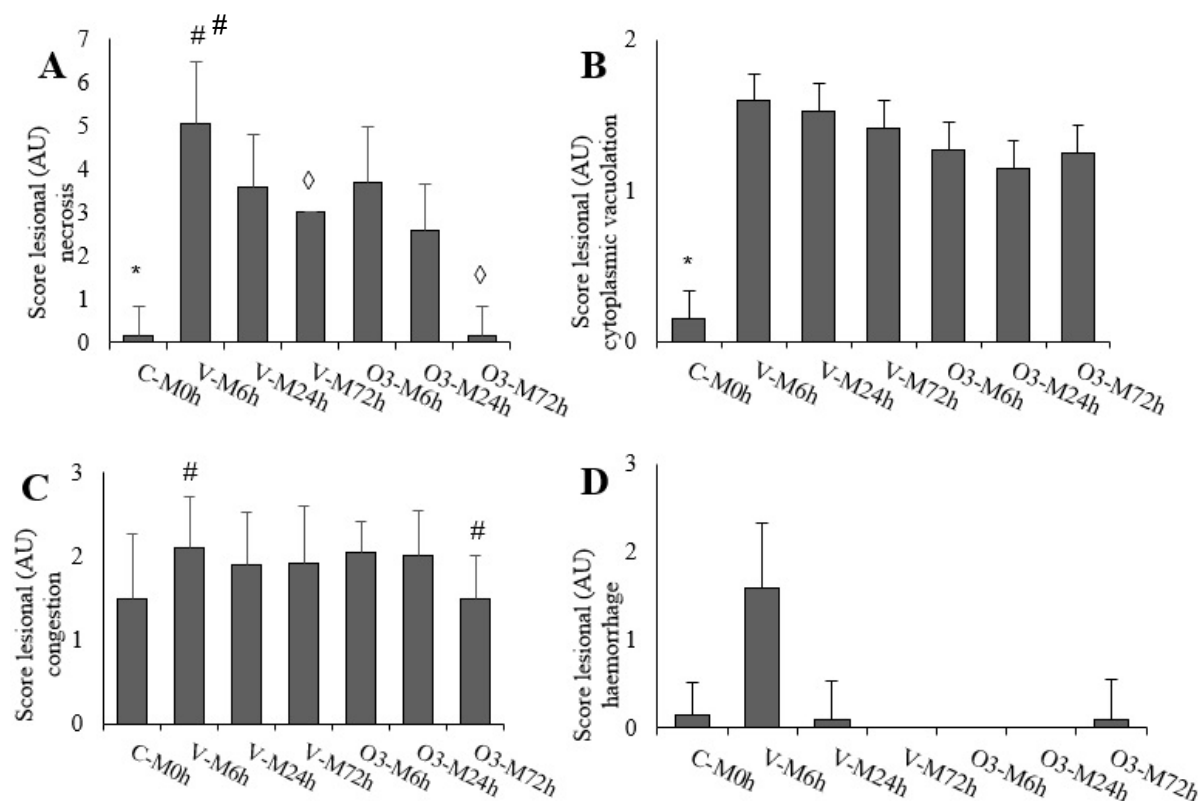


Fig. 4. Score lesional dos rins. **(A)** necrose tubular aguda nos grupos V e O3, comparados com basal *(C-M0h) $p < 0,001$ e menor no grupo O3. #V-M6h x O3-M6h

($p = 0,04$) e $\diamond V-M72h \times O3-M72h$ ($p < 0,001$). **(B)** degeneração citoplasmática nos grupos V e O3, comparados com controle *(C-M0h) $p < 0,001$ e redução mais significativa da média do score lesional nos momentos do grupo O3. **(C)** redução da congestão no grupo ozônio #O3-M72h x V-M6h ($p 0,04$). **(D)** média maior de hemorragia no grupo tratado somente com antiveneno (V) no momento 6h.

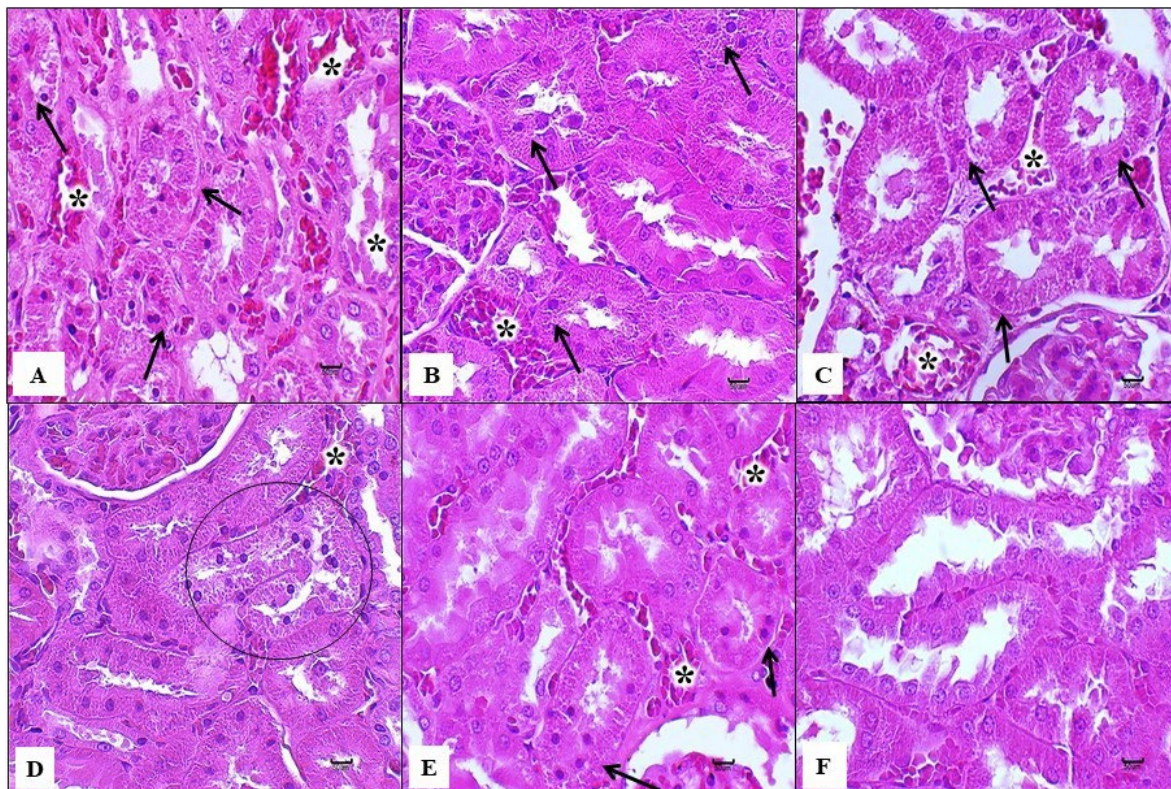


Fig. 5. Efeitos do veneno de *Lachesis muta muta* e do tratamento com antiveneno e ozônio na morfologia renal de ratos. **(A)** GV-M6h: congestão intensa (*) e necrose tubular aguda moderada (setas). HE, barra 50µM. **(B e C)** GV-M24h e GV-M72h: congestão (*) e intensa necrose tubular aguda (setas) semelhante ao observado no grupo GV-M6h. HE, bar50µM. **(D)** Grupo GO3-M6h: necrose tubular aguda grave (círculo) e congestão moderada (*). HE, barra 50µM. **(E)** GO3-M24h: necrose tubular aguda (setas) e congestão moderada (*). HE, barra 50µM. **(F)** GO3-M72h: diminuição da necrose tubular aguda e congestão. HE, barra 50µM.

3. DISCUSSÃO

Neste estudo, a ozonioterapia demonstrou grande potencial terapêutico em alguns aspectos sistêmicos do envenenamento por *L. m. muta* em ratos, como: redução significativa da formação de mionecrose após associação com antiveneno; capacidade de prevenir a miotoxicidade sistêmica, tanto isolada como em associação com soro antiofídico, efeito observado através da dosagem sérica de CK; e reduziu parcialmente as respostas inflamatórias de forma semelhante à ação do antiveneno isolado.

O envenenamento por *Lachesis sp.* pode produzir efeitos locais e sistêmicos devido as várias enzimas e proteínas que compõem o veneno. Miotoxicidade (Damico et al., 2006, 2005), edema, úlcera (Ferreira et al., 2009; Pereira, 2021), atividade proteolítica (Cordeiro et al., 2018) distúrbios hemorrágicos e hemodinâmicos (Bard et al., 1994; Cordeiro et al., 2015; Diniz-Sousa et al., 2020; Muniz et al., 2021; Rucavado et al., 1999; Sánchez et al., 1995, 1991) e renais (Alves, 2010; Damico et al., 2007; Leão-Torres et al., 2021) são comuns em casos de acidente laquético, porém, podem ser debelados ou até evitados quando tratados em tempo hábil e com um antiveneno adequado. Contudo, a falta ou dificuldade de acesso ao serviço de saúde e demora no atendimento em determinadas regiões, podem resultar em morte por acidentes envolvendo serpentes *Lachesis sp.* (Mise et al., 2018).

O estudo bioquímico revelou que os animais tratados somente com antiveneno polivalente, sofreram acentuadas alterações circulatórias, edema intersticial, congestão e hemorragia, infiltrado inflamatório neutrofilico, necrose e degeneração de miócitos. Somente no M72h houve redução das alterações circulatórias e mudança da composição inflamatória, passando a ter predomínio de macrófagos e discreta proliferação de tecido conjuntivo e neovascularização, porém o antiveneno sozinho não foi capaz de reduzir a mionecrose. Vale ressaltar que a concentração sérica de CK no grupo submetido a ozonioterapia foi consideravelmente inferior à do GV.

Os animais tratados com a associação de ozônio e antiveneno, apresentaram melhora já no M24h, caracterizada por discreta redução das lesões teciduais e presença de infiltrado inflamatório misto (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) e, ao final do tratamento, M72h, uma acentuada redução das alterações morfológicas, caracterizada por diminuição da hemorragia, edema, congestão, degeneração e necrose tecidual. O infiltrado inflamatório, neste momento, apresentou predomínio de macrófagos, com grande proliferação de tecido conjuntivo e neovascularização para reparo tecidual. Neste sentido, vale ressaltar que a concentração plasmática de fibroblastos neste momento foi maior no grupo tratado com a ozonioterapia. Leão-Torres et al., (2021), obtiveram resultados semelhantes em relação ao aumento de fibrinogênio e plaquetas, observado 2 horas após inoculação do veneno. O aumento de fibrinogênio pode ser devido a lesão tecidual causada pela toxina laquética que

apresenta alta ação proteolítica e hemorrágica (Rucavado et al., 1999; Sánchez et al., 1995, 1991).

No M72h os animais do GO3 mantiveram um valor mais alto de fibrinogênio o que segundo Haddad et al., (2009), que avaliaram os constituintes sanguíneos de equinos após aplicações intravenosa de ozônio, reflete um efeito transitório consequente da administração da mistura do gás, não sendo mais observados 24 horas após a administração do último tratamento. O aumento desta proteína é importante nos processos de cicatrização, tanto que, o tratamento tópico com ozônio vêm sendo estudado acerca do efeito cicatricial na redução do tempo de retração de feridas em diferentes espécies (Shete et al., 2016)

Em relação aos parâmetros hematológicos, não houve diferença entre os tratamentos com ozonioterapia e com antiveneno. A concentração de ozônio (30µg/mL) utilizada neste estudo não causou distúrbios hemodinâmicos, mostrando-se segura. Naserzadeh et al., (2017) e Sagai & Bocci, (2011) mostram que a eficácia terapêutica do ozônio está relacionada ao estresse oxidativo controlado e moderado como resultado de reações de ozônio com componentes biológicos e que, a linha tênue entre a eficácia e toxicidade do ozônio pode ser dose dependente.

Quanto à avaliação renal, os biomarcadores e a histopatologia demonstraram que as principais alterações observadas nos animais do GV foram degeneração citoplasmática, congestão e necrose tubular aguda (epitélio tubular) e, somente no M72h, observou-se redução da necrose tubular aguda, semelhante as alterações observadas nos animais GO3 no M6h. A melhora do aspecto morfológico dos animais do GO3, no M6h em relação ao GV no M72h pode ser atribuída a ozonioterapia realizada às 3h após aplicação do veneno. Ao final do tratamento (M72h) observou-se uma redução ainda maior da necrose tubular aguda no GO3. A nefrotoxicidade causada pelo veneno de *L. m. muta* pode, além das alterações tissulares, ser caracterizada pelo aumento sérico dos biomarcadores creatinina e ureia, contudo, ao observarmos os níveis séricos de ureia no M6h, notamos que a ozonioterapia foi mais bem sucedida ao impedir a elevação deste marcador, indicando que o tratamento precoce, às 3h após inoculação do veneno, retardou o dano tecidual. Assim, a histologia renal relacionada aos biomarcadores séricos ureia e creatinina, demonstrou que a associação de ozônio com antiveneno produziu maior proteção à nefrotoxicidade induzida pelo veneno. Estudos realizados com cultura de célula renal (Alves, 2010; Damico et al., 2007) identificaram que o veneno

laquético exerce efeitos tóxicos em células renais e são mediados por metaloproteinases, desintegrinas e outros componentes do veneno.

Sagai and Bocci, (2011) sugerem que o ozônio pode estimular o sistema antioxidante, regular respostas inflamatórias, melhorar a reologia vascular, aumentar o fluxo sanguíneo e a oxigenação em tecidos em hipóxia. No estudo de Cisterna et al., (2021), a administração da ozonioterapia induziu múltiplos efeitos como ativação de fibroblastos, resposta antioxidante e secreção de interleucina-6 (IL-6) e fator de crescimento beta (TGF- β 1).

Naserzadeh et al., (2017) Investigaram o potencial terapêutico da ozonioterapia, em diferentes concentrações, em diversos tecidos e observaram que o ozônio (na concentração de 30 μ g) não só impediu a toxicidade mitocondrial causada pelo veneno de escorpião (*Hemiscorpius lepturus*), mas também inibiu a formação de espécies reativas de oxigênio, o colapso do potencial de membrana mitocondrial, e o esgotamento de adenosina-trifosfato (ATP), o que pode levar à morte celular.

Existem algumas hipóteses acerca dos mecanismos de ação do ozônio no metabolismo (Bocci, 2006; Borrelli and Bocci, 2018). Segundo Shete et al., (2016) o mecanismo pode estar relacionado com o aumento da metabolização do oxigênio (O₂) pois o O₃ estimula o aumento da taxa de glicólise nas hemácias, aumentando a síntese do 2,3-difosfoglicerato, que por consequência aumenta a oferta de O₂ para os tecidos, promovendo uma melhor cicatrização e recuperação do tecido injuriado. Uma outra hipótese está relacionada a ativação do sistema imunológico. O O₃ quando administrado nas doses entre 30 e 55 μ g/mL causa elevação da síntese de interferons, diminuição da interleucina-2, e fator de necrose tumoral, atuando como imunomodulador, diminuindo a intensidade das reações imunológicas posteriores (Shete et al., 2016).

O ozônio atua modulando os sistemas oxidantes e antioxidantes do organismo (Martínez-sánchez, 2013), após penetrar no organismo o O₃ é capaz de promover a melhora da oxigenação que por sua vez favorece o metabolismo celular com aumento de importantes mediadores dos efeitos terapêuticos da aplicação de ozônio (Ozler et al., 2011) , como interleucinas e interferon (Cisterna et al., 2021), o que contribui para excreção de produtos tóxicos gerados pelo catabolismo celular, além de contribuir para a regulação dos mecanismos de defesa imunológica, inclusive

com efeito imunomodulador (Erario et al., 2021; Recio et al., 1999; Sagai and Bocci, 2011).

O processo de ozonização que ocorre no sangue e intramuscular representa um estresse oxidativo agudo que, desde que seja precisamente calculado de acordo com uma dosagem criteriosa, não é deletério, mas é capaz de provocar uma infinidade de respostas biológicas úteis e, possivelmente, pode reverter o estresse oxidativo e restaurar a homeostase, bem como, estimular fatores de crescimento liberados de plaquetas e células endoteliais (Bocci, 2006). Esses efeitos benéficos podem depender da capacidade do estresse oxidativo leve de sustentar as vias citoprotetoras pela ativação do fator de transcrição nuclear eritróide 2 (Nrf2), um importante regulador dos genes que protegem as células dos efeitos de agressões endógenas e exógenas, como xenobióticos e estresse oxidativo nas vias de sinalização intracelular da inflamação. O estudo de Gàlie et al. (2018) demonstra que a exposição a baixas concentrações de ozônio estimula as vias de proteção celular e a transcrição nuclear por meio da ativação de uma resposta antioxidante mediada principalmente por Nrf2. Evidência corroborada por de Sire et al., (2021), que observou que a ativação da sinalização do antioxidante Nrf2 pode atenuar o fator nuclear kappa b (NF-κB), um regulador chave da inflamação.

Após anos de pesquisa sobre as propriedades medicinais da terapia com ozônio, Borrelli and Bocci, (2018) recomendam o emprego da ozonioterapia para tratar diversas desordens inflamatórias. Nosso estudo é o primeiro a demonstrar a ação protetora da ozonioterapia sobre o envenenamento experimental por *Lachesis muta muta*. Acreditamos que a terapia com ozônio pode desempenhar um papel fundamental, isolada ou em associação, no combate aos efeitos do envenenamento por *Lachesis sp*, sendo uma intervenção conservadora e minimamente invasiva.

Para concluir, a ozonioterapia demonstrou sua eficácia no tratamento adjuvante do anti-veneno polivalente em casos de envenenamento por *Lachesis muta muta* e também isoladamente nas primeiras horas logo após envenenamento. A ozonioterapia na dose de 30µg/mL pode contribuir para minimizar os efeitos sistêmicos causados pela toxina laquética.

Declaração de crédito autoral

Gabriela Haro de Melo: Conceituação, metodologia, experimento, investigação, redação - rascunho original, recursos; **Lilliane Giroto Pereira:** Experimento e

Investigação; **Matheus Barreto dos Santos**: Experimento e Investigação; **Elisângela Olegário da Silva**: Investigação, redação - rascunho original; **Arnaldo Farina**: Investigação e recursos; **Rafael Stuaní Floriano**: Investigação e recursos; **Cecília Braga Laposy**: Investigação; **Rosa Maria Barilli Nogueira**: Conceituação, metodologia, redação - revisão, recursos, supervisão e coordenação da pesquisa

Declaração de conflitos de interesse

Os autores declaram não haver nenhuma empresa com conflito de interesses financeiro, ou, relações pessoais que poderiam ter para influenciar o trabalho relatado neste artigo.

Agradecimentos

Os autores agradecem Dr. Nelson Jorge da Silva Jr e a Pontifícia Universidade Católica de Goiás pela doação do *pool* de veneno utilizado neste experimento; a Gracielle V. Gonçalves, Ana Maria S. S. Wehbe, Cleonice Trevisan e Gabrielle G. S. Ribeiro pela assistência técnica. Este trabalho foi financiado por recursos institucionais da Universidade do Oeste de São Paulo (UNOESTE) Presidente Prudente, SP, Brasil).

REFERÊNCIAS

- Abegão, K.G.B., Bracale, B.N., Delfim, I.G., Santos, E.S. dos, Laposy, C.B., Nai, G.A., Giuffrida, R., Nogueira, R.M.B., 2015. Effects of heterologous platelet-rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits. *Acta Cir. Bras.* 30, 209–15. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020150030000008>
- Albuquerque, P.L.M.M., Silva Junior, G.B., Jacinto, C.N., Lima, C.B., Lima, J.B., Veras, M.D.S.B., Daher, E.F., 2013. Epidemiological profile of snakebite accidents in a metropolitan area of northeast Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 55, 347–351. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500009>
- Alves, C.D., 2010. Estudo dos efeitos renais do veneno da serpente *Lachesis muta muta*. Msc dissertation. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil. <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/2269>
- Babaei-Ghazani, A., Fadavi, H.R., Eftekharsadat, B., Ebadi, S., Ahadi, T., Ghazaei, F., Khabbaz, M.S., 2019. A Randomized Control Trial of Comparing Ultrasound-

- Guided Ozone (O₂-O₃) vs Corticosteroid Injection in Patients With Shoulder Impingement. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 98, 1018–1025. <https://doi.org/10.1097/PHM.0000000000001240>
- Bard, R., De Lima, J.C.R., Pereira De Sa Neto, R., Guedes De Oliveira, S., Dos Santos, M.C., 1994. Ineficacia do antiveneno botropico na neutralizacao da atividade coagulante do veneno de *Lachesis muta muta*. Relato de caso e comprovacao experimental. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 36, 77–81. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651994000100012>
- Barrionuevo, D. V., Laposy, C.B., Abegão, K.G.B., Nogueira, R.M.B., Nai, G.A., Bracale, B.N., Delfim, I.G., 2015. Comparison of experimentally-induced wounds in rabbits treated with different sources of platelet-rich plasma. *Lab. Anim.* 49, 209–14. <https://doi.org/10.1177/0023677214567747>
- Bocci, V., Zanardi, I., Travagli, V., 2011. Ozone: A new therapeutic agent in vascular diseases. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 11, 73–82. <https://doi.org/10.2165/11539890-000000000-00000>
- Bocci, V.A., 2006. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Arch. Med. Res.* 37, 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.08.006>
- Borrelli, E., Bocci, V., 2018. The Use of Ozone in Medicine, *Annals of Medical and Health Sciences Research.* 8, 117–119. <https://www.amhsr.org/articles/the-use-of-ozone-in-medicine-4493.html>
- Brasil, C.N. de C. de E.A. (CONCEA), 2016. Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016. Brasil. [https://ceua.ib.usp.br/images/Legislacao/32-Resolucao Normativa 33181116.pdf](https://ceua.ib.usp.br/images/Legislacao/32-Resolucao%20Normativa%2033181116.pdf)
- Cisterna, B., Costanzo, M., Lacavalla, M.A., Galiè, M., Angelini, O., Tabaracci, G., Malatesta, M., 2021. Low Ozone Concentrations Differentially Affect the Structural and Functional Features of Non-Activated and Activated Fibroblasts In Vitro. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 10133. <https://doi.org/10.3390/ijms221810133>
- Chippaux, J.P., 2017. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 23. <https://doi.org/10.1186/S40409-017-0127-6>
- Cho, K.-H., Kang, D.-J., Nam, H.-S., Kim, J.-H., Kim, S.-Y., Lee, J.-O., Kim, B.-J., 2021. Ozonated Sunflower Oil Exerted Protective Effect for Embryo and Cell Survival via Potent Reduction Power and Antioxidant Activity in HDL with Strong Antimicrobial Activity. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 10. <https://doi.org/10.3390/antiox10111651>
- Colombini, M., Fernandes, I., Cardoso, D.F., Moura-da-Silva, A.M., 2001. *Lachesis muta muta* venom: immunological differences compared with *Bothrops atrox* venom and importance of specific antivenom therapy. *Toxicon* 39, 711–719. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00201-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00201-4)
- Cordeiro, F., Perini, T., Bregge-Silva, C., Cremonez, C., Rodrigues, R., Boldrini-França, J., C.F. Bordon, K., De Souza, D., Ache, D., M. Rodrigues, V., dos

- Santos, W., Rosa, J., Arantes, E., 2015. A New Phospholipase A2 from *Lachesis muta rhombeata*: Purification, Biochemical and Comparative Characterization with Crotoxin B. *Protein Pept. Lett.* 22, 816–827. <https://doi.org/10.2174/0929866522666150706112431>
- Cordeiro, F.A., Coutinho, B.M., Wiezel, G.A., Bordon, K. de C.F., Bregge-Silva, C., Rosa-Garzon, N.G., Cabral, H., Ueberheide, B., Arantes, E.C., 2018. Purification and enzymatic characterization of a novel metalloprotease from *Lachesis muta rhombeata* snake venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 2018 241 24, 1–11. <https://doi.org/10.1186/S40409-018-0171-X>
- Damico, D.C.S., Bueno, L.G.F., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S., da Cruz-Höfling, M.A., Novello, J.C., 2006. Functional characterization of a basic D49 phospholipase A2 (LmTX-I) from the venom of the snake *Lachesis muta muta* (bushmaster). *Toxicon* 47, 759–765. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.02.007>
- Damico, D.C.S., Bueno, L.G.F., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S., da Cruz-Höfling, M.A., Novello, J.C., 2005. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. *Toxicon* 46, 222–9. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.04.011>
- Damico, D.C.S., Nascimento, J.M., Lomonte, B., Ponce-Soto, L.A., Joazeiro, P.P., Novello, J.C., Marangoni, S., Collares-Buzato, C.B., 2007. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells. *Toxicon* 49, 678–692. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.014>
- de Sire, A., Agostini, F., Lippi, L., Mangone, M., Marchese, S., Cisari, C., Bernetti, A., Invernizzi, M., 2021. Oxygen–Ozone Therapy in the Rehabilitation Field: State of the Art on Mechanisms of Action, Safety and Effectiveness in Patients with Musculoskeletal Disorders. *Biomolecules* 11, 356. <https://doi.org/10.3390/biom11030356>
- de Sire, A., Stagno, D., Minetto, M.A., Cisari, C., Baricich, A., Invernizzi, M., 2020. Long-term effects of intra-articular oxygen-ozone therapy versus hyaluronic acid in older people affected by knee osteoarthritis: A randomized single-blind extension study. *J. Back Musculoskelet. Rehabil.* 33, 347–354. <https://doi.org/10.3233/BMR-181294>
- Diao, E., Ren, D., Liu, T., Zhang, J., Hu, W., Hou, H., 2018. Ozone detoxification of patulin in aqueous solution and cytotoxic evaluation using human hepatic carcinoma cells. *Toxicon* 155, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.10.004>
- Diniz-Sousa, R., Moraes, J. do N., Rodrigues-da-Silva, T.M., Oliveira, C.S., Caldeira, C.A. d. S., 2020. A brief review on the natural history, venomics and the medical importance of bushmaster (*Lachesis*) pit viper snakes. *Toxicon X* 7, 100053. <https://doi.org/10.1016/J.TOXCX.2020.100053>

- Domingos, T.F.S., Ortiz-Ramírez, F.A., Villaça, R.C., Cavalcanti, D.N., Sanchez, E.F., Teixeira, V.L., Fuly, A.L., 2012. Inhibitory effect of a Brazilian marine brown alga *Spatoglossum schröderi* on biological activities of *Lachesis muta* snake venom. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 741–747. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000049>
- du Sert, N.P., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., Browne, W.J., Clark, A., Cuthill, I.C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S.T., Howells, D.W., Hurst, V., Karp, N.A., Lazic, S.E., Lidster, K., MacCallum, C.J., Macleod, M., Pearl, E.J., Petersen, O.H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E.S., Silberberg, S.D., Steckler, T., Würbel, H., 2020. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol.* 18, e3000411. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411>
- El-Mehi, A.E., Faried, M.A., 2020. Controlled ozone therapy modulates the neurodegenerative changes in the frontal cortex of the aged albino rat. *Ann. Anat. - Anat. Anzeiger* 227. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.151428>
- Elvis, A., Ekta, J., 2011. Ozone therapy: A clinical review. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2, 66–70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312702/>
- Erario, M. de los Á., Croce, E., Moviglia Brandolino, M.T., Moviglia, G., Grangeat, A.M., 2021. Ozone as Modulator of Resorption and Inflammatory Response in Extruded Nucleus Pulposus Herniation. Revising Concepts. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 9946. <https://doi.org/10.3390/ijms22189946>
- Ferreira, T., Camargo, E.A., Ribela, M.T.C.P., Damico, D.C., Marangoni, S., Antunes, E., De Nucci, G., Landucci, E.C.T., 2009. Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. *Toxicon* 53, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.10.016>
- Galiè, M., Costanzo, M., Nodari, A., Boschi, F., Calderan, L., Mannucci, S., Covi, V., Tabaracci, G., Malatesta, M., 2018. Mild ozonisation activates antioxidant cell response by the Keap1/Nrf2 dependent pathway. *Free Radic. Biol. Med.* 124, 114–121. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.05.093>
- Gerez, J.R., Pinton, P., Callu, P., Grosjean, F., Oswald, I.P., Bracarense, A.P.F.L., 2015. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. *Exp. Toxicol. Pathol.* 67, 89–98. <https://doi.org/10.1016/J.ETP.2014.10.001>
- Grenier, B., Loureiro-Bracarense, A.-P., Lucioli, J., Pacheco, G.D., Cossalter, A.-M., Moll, W.-D., Schatzmayr, G., Oswald, I.P., 2011. Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 761–771. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000402>
- Haddad, M.A., Souza, M. V., Hincapie, J.J., Ribeiro, J.I., Ribeiro Filho, J.D., Benjamin, L.A., 2009. Comportamento de componentes bioquímicos do sangue em equinos submetidos à ozonioterapia. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 61,

539–546.

<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/8zRQhCvHJTQxm3hxF5D4wRN/?format=pdf>

Kanashiro, G.P., Cassu, R.N., 2008. Anestesia em animais selvagens e de laboratório. In: Andrade, S.F. Manual de terapêutica veterinária, third ed. Roca, São Paulo, SP

Leão-Torres, A.G., Pires, C. V., Ribelato, A.C., Zerbinatti, M.C., Santarém, C.L., Nogueira, R.M.B., Giometti, I.C., Giuffrida, R., Silva, E.O., Gerez, J.R., Silva, N.J., Rowan, E.G., Floriano, R.S., 2021. Protective action of N-acetyl-L-cysteine associated with a polyvalent antivenom on the envenomation induced by *Lachesis muta muta* (South American bushmaster) in rats. *Toxicon* 198, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.04.018>

Martínez-sánchez, G., 2013. La ozonoterapia gana evidencias científicas en el campo clínico. *Rev Cuba. Farm* 47, 1–4. <https://www.ozonoterapia.pt/wp-content/uploads/2018/10/EvidenciasCientificasOzono.pdf>

Matos, R.R., Ignotti, E., 2020. Incidência de acidentes ofídicos por gêneros de serpentes nos biomas brasileiros. *Cien. Saude Colet.* 25, 2837–2846. <https://doi.org/10.1590/1413-81232020257.31462018>

Melchionda, D., Milillo, P., Manente, G., Stoppino, L., Macarini, L., 2012. Treatment of radiculopathies: a study of efficacy and tollerability of paravertebral oxygen-ozone injections compared with pharmacological anti-inflammatory treatment. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 26, 467–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23034266>

Mise, Y., Lira-da-Silva, R., Carvalho, F., 2018. Time to treatment and severity of snake envenoming in Brazil. *Rev. Panam. Salud Pública* 42, 1–6. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.52>

Muniz, E.G., Noronha, M. das D.N., Saraiva, M. das G.G., Monteiro, W.M., Oliveira, S.S., 2021. Neutralization of hemostatic disorders induced by *Lachesis muta* venom using Brazilian antivenoms. *Toxicon* 191, 44–47. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.12.013>

Naserzadeh, P., Shahi, F., Shahbazzadeh, D., Ghanei, M., Ashtari, K., Panahi, Y., Hosseini, M.-J., Izadi, M., 2017. Protective Effect of Ozone against *Hemiscorpius lepturus* Envenomation in Mice. *Biomed. Environ. Sci.* 30, 581–590. <https://doi.org/10.3967/bes2017.077>

Ochoa-Avilés, A., Heredia-Andino, O.S., Escandón, S.A., Celorio-Carvajal, C.A., Arias-Peláez, M.C., Zaruma-Torres, F., Caldeira, C.A. d. S., Soares, A.M., Da Silva, S.L., 2020. Viperidae snakebites in Ecuador: A review of epidemiological and ecological aspects. *Toxicon X* 7, 100051. <https://doi.org/10.1016/J.TOXCX.2020.100051>

Ozler, M., Akay, C., Oter, S., Ay, H., Korkmaz, A., 2011. Similarities and differences

- of hyperbaric oxygen and medical ozone applications. *Free Radic. Res.* 45, 1267–1278. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.627331>
- Pereira, L.G., 2021. Óleo de girassol ozonizado favorece a cicatrização de feridas induzidas pelo veneno de *Lachesis muta muta* em ratos wistar. Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, SP. <http://bdtd.unoeste.br:8080/jspui/handle/jspui/1343>
- Pinho, F.M., Pereira, I.D., 2001. Snake bites. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 47, 24–9. <https://doi.org/10.1590/s0104-42302001000100026>
- Raeissadat, S.A., Rayegani, S.M., Sadeghi, F., Rahimi Dehgolan, S., 2018. Comparison of ozone and lidocaine injection efficacy vs dry needling in myofascial pain syndrome patients. *J. Pain Res.* Volume 11, 1273–1279. <https://doi.org/10.2147/JPR.S164629>
- Recio, L.E., Pino, D., Maritza, L., Serrano, A., Magalys Rodríguez Del Río, T., María De Los, D., Garrido, A., 1999. Aspectos de la ozonoterapia en pacientes con neuropatía periférica epidémica. *Rev. Cuba. Enfermer* 15, 114–122. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03191999000200010
- Rucavado, A., Flores-Sánchez, E., Franceschi, A., Magalhaes, A., Gutiérrez, J.M., 1999. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon* 37, 1297–1312. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00268-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00268-2)
- Ryska, P., Jandura, J., Hoffmann, P., Dvorak, P., Klimova, B., Valis, M., Vajda, M., 2021. Comparison of Pulsed Radiofrequency, Oxygen-Ozone Therapy and Epidural Steroid Injections for the Treatment of Chronic Unilateral Radicular Syndrome. *Medicina (B. Aires)*. 57, 136. <https://doi.org/10.3390/medicina57020136>
- Sagai, M., Bocci, V., 2011. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med. Gas Res.* 1, 29. <https://doi.org/10.1186/2045-9912-1-29>
- Sánchez, E.F., Costa, M.I.E., Chavez-Olortegui, C., Assakura, M.T., Mandelbaum, F.R., Diniz, C.R., 1995. Characterization of a hemorrhagic factor, LHF-I, isolated from the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) venom. *Toxicon* 33, 1653–1667. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00097-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00097-6)
- Sánchez, E.F., Magalhães, A., Mandelbaum, F.R., Diniz, C.R., 1991. Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the Bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1074, 347–356. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(91\)90084-T](https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90084-T)
- Saneshigue dos Santos, I.K.N., Iziqo Goiozo, P.F., De Brito, A.F., De Melo, G.H., Pereira, C. de P., Nogueira, R.M.B., 2019. Fractal Dimension in Liver

- Histological Findings of Wistar Rats Experimentally Intoxicated with Venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Acta Sci. Vet.* 47, 1662. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.91990>
- Sanz, L., Escolano, J., Ferretti, M., Biscoglio, M.J., Rivera, E., Crescenti, E.J., Angulo, Y., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Calvete, J.J., 2008. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. *J. Proteomics* 71, 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2007.10.004>
- Seyam, O., Smith, N., Reid, I., Gandhi, J., Jiang, W., Khan, S., 2018. Clinical utility of ozone therapy for musculoskeletal disorders. *Med. Gas Res.* 8, 103–110. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.241075>
- Shete, A. V, Subramaniam, A. V, Sable, D.M., Patil, S. V, Chavan, M.S., Shete, M. V, Diwan, N.N., 2016. Ozone Therapy: Healing Properties of the Blue Gas. *Int. J. Oral Heal. Dent.* 2, 35. <https://doi.org/10.5958/2395-499X.2016.00011.3>
- Travagli, V., Zanardi, I., Bocci, V., 2009. Topical applications of ozone and ozonated oils as anti-infective agents: an insight into the patent claims. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 4, 130–42. <https://doi.org/10.2174/157489109788490271>
- Travagli, V., Zanardi, I., Valacchi, G., Bocci, V., 2010. Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. *Mediators Inflamm.* 2010, 610418. <https://doi.org/10.1155/2010/610418>
- Ugazio, E., Tullio, V., Binello, A., Tagliapietra, S., Dosio, F., 2020. Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. Their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25020334>
- Waldez, F., Vogt, R.C., 2009. Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, Amazonas, Brasil. *Acta Amaz.* 39, 681–692. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672009000300025>
- Wiesel, G.A., Bordon, K.C., Silva, R.R., Gomes, M.S., Cabral, H., Rodrigues, V.M., Ueberheide, B., Arantes, E.C., 2019. Subproteome of *Lachesis muta rhombeata* venom and preliminary studies on LmrSP-4, a novel snake venom serine proteinase. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 25, e147018. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-1470-18>

ANEXO A – APROVAÇÃO ÉTICA

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

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

Ativar o V
Acesse Confi

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "OZONIOTERAPIA NA CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO DE FERIDAS INDUZIDAS PELO VENENO DE LACHESIS MUTA EM RATOS WISTAR", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 5487 e tendo como participante(s) GABRIELA HARO DE MELO (discente), LUARA EVANGELISTA SILVA (discente), CARINA VIVIAN PIRES (discente), LAIS MAYUMI OSHIRO (discente), DIOGO SANTOS DA SILVA (participante externo), CECILIA LAPOSY SANTAREM (docente), ELISANGELA OLEGÁRIO DA SILVA (docente), RAFAEL STUANI FLORIANO (docente), ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 07/08/2019.


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

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

Presidente Prudente, 8 de Agosto de 2019.



Prof. Doutor Rodrigo Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI



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

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

Validar este documento em www.unoeste.br/app informando o código de segurança 4548284917430706488015191797176

ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA



Toxicon

Guide for Authors



[Download Guide for Authors in PDF](#)

[Aims and scope](#)

[• Your Paper Your Way](#)

INTRODUCTION

[• Types of paper](#)

[• Submission checklist](#)

BEFORE YOU BEGIN

[• Ethics in publishing](#)

[• Declaration of competing interest](#)

[• Submission declaration and verification](#)

[• Use of inclusive language](#)

[• Changes to authorship](#)

[• Copyright](#)

[• Role of the funding source](#)

[• Open access](#)

[• Submission](#)

[• Referees](#)

PREPARATION

[• Queries](#)

[• NEW SUBMISSIONS](#)

[• Peer review](#)

[• REVISED SUBMISSIONS](#)

[• Article structure](#)

[• Essential title page information](#)

[• Highlights](#)

[• Abstract](#)

[• Keywords](#)

[• Artwork](#)

[• Tables](#)

[• References](#)

[• Taxonomy and toxin nomenclature](#)

[• Video](#)

[• Data visualization](#)

[• Supplementary material](#)

[• Research data](#)

AFTER ACCEPTANCE

[• Online proof correction](#)

[• Offprints](#)

AUTHOR INQUIRIES

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication

of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.



Introduction

[TOXICON] has an open access mirror journal, [TOXICON: X]

Official Journal of The International Society on Toxinology

(<http://www.toxinology.org/>), *Toxicon's* "aims and scope" are laid down in the journal as:

To publish:

- articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms
- papers on novel findings related to the chemical, pharmacological, toxicological, and immunological properties of natural toxins
- molecular biological studies of toxin and other genes from poisonous and venomous organisms that advance understanding of the role or function of toxins
- clinical observations on poisoning and envenoming where a new therapeutic principle has been proposed or a decidedly superior clinical result has been obtained. *Toxicon* will not accept single-case reports unless they describe new, previously unreported, clinical features; envenomings or poisonings by rare animals, plants, fungi or microorganisms for which there is little or no clinical information in the literature; or treatment that employs a new therapeutic principle for which effectiveness is convincingly demonstrated. Such case reports must include: (1) expert species identification; (2) meticulous clinical documentation of symptoms, signs, laboratory data, treatment and clinical outcomes; (3) originality (adding to knowledge of the clinical phenotype); (4) where feasible, photographic documentation of clinical signs.
- material on the use of toxins as tools in studying biological processes and material on subjects related to venom-antivenom problems
- articles on the translational application of toxins, for example as drugs and insecticides
- epidemiological studies on envenoming or poisoning, so long as they highlight a previously unrecognised medical problem or provide insight into the prevention or medical treatment of envenoming or poisoning. Retrospective surveys of hospital records, especially those lacking species identification, will not be considered for publication. Properly designed prospective community-based surveys are strongly encouraged.
- articles describing well-known activities of venoms, such as antibacterial, anticancer, and analgesic activities of venoms, without any attempt to define the mechanism of action or purify the active component, will not be considered for publication in *Toxicon*
- review articles on problems related to toxinology.

And

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

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

Full-Length Research Papers: Articles containing the results of original research on problems related to toxins derived from animals, plants and microorganisms.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).



Before You Begin

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Although prospective studies are generally preferable to retrospective studies, in some situations the latter may provide valuable information that is otherwise unobtainable. Retrospective reviews of existing medical records that are intended for publication require prior approval from an appropriate Institutional Review Board (IRB). These must protect the anonymity of patients involved. In single case reports, the patient's consent is required if they are identifiable. In all clinical prospective or retrospective studies, the approval number of the relevant IRB should be quoted in the manuscript.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. For all experiments involving humans or animals, details of the appropriate ethics committee approval(s) must be provided

Declaration of competing interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. All authors, including those *without* competing interests to declare, should create a declaration of competing interest statement (which, where relevant, may specify they have nothing to declare). To do so, authors should use [this tool](#) and upload to the submission system at the Attach Files step. **Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.**

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify

originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

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

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/TOXCON/default.aspx>.

Referees

The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to five

individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.



Preparation

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

All manuscripts must have double or 1.5-line spacing, and must contain **both page numbers and consecutive line numbering**. Articles must be divided into clearly numbered sections as outlined below. Aside from this, there are no strict formatting requirements, but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey the details of the study, including Abstract, Keywords, Highlights, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, and Figures/Tables with Captions.

If your article includes Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

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

LaTeX

You are recommended to use the [latest Elsevier article class](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography.

Our [Guidelines](#) has full details.

Article structure

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

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

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Experimental

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Experimental procedures

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. ***All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines. More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.***

Theory/calculation

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Appendices

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

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be

indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the major findings of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please take a look at the examples here: [example Highlights](#). Highlights should not be used to provide a summary of background information or methods.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 125 characters, including spaces, per bullet point). Highlights should NOT contain abbreviations/acronyms

Abstract

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

Graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

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

Keywords

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

Abbreviations

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

Acknowledgements

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

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork***Electronic artwork******General points***

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

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

Formats

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

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

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

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

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

Color artwork

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

Figure captions

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

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with

either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

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

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

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

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s),

journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

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

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

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. *Cancer statistics reports for the UK*. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Taxonomy and toxin nomenclature

Authors should ensure that they are using the most up-to-date taxonomic description of any animal or plant described in their manuscript. For some taxa, up-to-date taxonomic information is readily available online (e.g., for spiders at <http://www.wsc.nmbe.ch>). For new, unidentified, or potentially cryptic species, a voucher specimen should be deposited in a natural history museum, or other facility, as appropriate.

Authors are encouraged to use rational nomenclature for all toxins described in their manuscript. *Ad hoc* naming schemes only serve to introduce confusion and make it difficult to compare toxins and establish evolutionary relationships. Suggested nomenclature has been published for spider toxins (King et al., *Toxicon* 52, 264-276, 2008; PMID 18619481), centipede toxins (Undheim et al., *Mol. Biol. Evol.* 31, 2124-2148, 2014; PMID 24847043), sea anemone toxins (Oliveira et al., *Toxicon* 60, 539-550, 2012; PMID 22683676), and some classes of scorpion toxins (Tytgat et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 444-447, 1999; PMID 10542442).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous

version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and

made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).



After Acceptance

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying,

as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via [Elsevier's Author Services](#).