



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

REGINA RAFAEL TEIXEIRA

**EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDANTES EM TESTÍCULOS DE RATOS
SUBMETIDOS AO ENVENENAMENTO EXPERIMENTAL AGUDO POR *LACHESIS
MUTA MUTA* (SURUCUCU SUL-AMERICANA) EM RATOS TRATADOS COM N-
ACETILCISTEÍNA E ANTIVENENO**



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

REGINA RAFAEL TEIXEIRA

**EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDANTES EM TESTÍCULOS DE RATOS
SUBMETIDOS AO ENVENENAMENTO EXPERIMENTAL AGUDO POR *LACHESIS
MUTA MUTA* (SURUCUCU SUL-AMERICANA) EM RATOS TRATADOS COM N-
ACETILCISTEÍNA E ANTIVENENO**

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

Orientadora:
Profa. Dra. Ines Cristina Giometti

Presidente Prudente - SP
2023

636.089
T266e

Teixeira, Regina Rafael.

Expressão de genes antioxidantes em testículos de ratos submetidos ao envenenamento experimental agudo por *Lachesis muta muta* (Surucucu Sul-Americana) em ratos tratados com n-acetilcisteína e antiveneno / Regina Rafael Teixeira. – Presidente Prudente, 2023.

39f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2023.

Bibliografia.

Orientador: Ines Cristina Giometti

1. Estresse oxidativo. 2. Enzima oxidante. 3. Glutathione, 4. NAC. 5. Serpentes. 6. Soro antiofídico 7. Fertilidade masculina. I. Título.

REGINA RAFAEL TEIXEIRA

**EXPRESSÃO DE GENES ANTIOXIDANTES EM TESTÍCULOS DE RATOS
SUBMETIDOS AO ENVENENAMENTO EXPERIMENTAL AGUDO POR *LACHESIS
MUTA MUTA* (SURUCUCU SUL-AMERICANA) EM RATOS TRATADOS COM N-
ACETILCISTEÍNA E ANTIVENENO**

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

Presidente Prudente, 22 de setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ines Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Rafael Stuani Floriano
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof. Dr. Isabela Bazzo da Costa
Universidade de Marília - UNIMAR
Marília – SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino.

A minha querida mãe (*in memoriam*), que esteve sempre ao meu lado, me apoiando em cada momento de minha vida.

Ao meu marido, pelo suporte e apoio essencial.

A minha irmã, que tanto admiro, dedico o resultado do esforço realizado ao longo deste percurso.

A minha orientadora, sem o qual não teria conseguido concluir esta difícil tarefa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa. Dra. Ines Cristina Giometti, minha orientadora e sobretudo, uma querida amiga, pelo qual levarei para toda a vida.

Um obrigado especial a todos os profissionais do departamento de Pós-Graduação em Ciências Animal e a Universidade do Oeste Paulista (Uoeste), pelo cuidado e atenção para as necessidades de cada aluno. Principalmente a coordenação da pós-graduação Prof. Dr. Anthony Castilho e Profa. Dra. Cecília Laposy.

Aos professores do curso, em que me forneceram todas as bases necessárias para a realização deste trabalho, muito obrigada.

Em especial, agradeço Profa. Dra. Cecília Laposy Santarém, no qual sem sua ajuda, em um momento de dificuldade pessoal, se mobilizou sem pensar duas vezes, para me ajudar, sem ela, provavelmente, não conseguiria finalizar meu curso.

Sou imensamente grata, pela colaboração de minha colega e técnica do Laboratório de Genética Molecular da Unoeste, Mayara Vidotto, com sua ajuda os experimentos do meu trabalho foram realizados com perfeição e carinho.

Expresso minha gratidão ao Prof. Dr. Rafael Stuani Floriano, pelo suporte e pela colaboração essencial para este trabalho.

Quero também agradecer minha amiga a qual este curso me trouxe, Me. Aline de Oliveira Santos, e futura doutora, pelo carinho, dedicação, esforço em me ajudar e ensinar à cada etapa nova.

Por fim, este trabalho só foi possível, graças ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001.

“Quando você é curioso, você aprende. Quando você é desperto, você descobre”. (Mooji)

RESUMO

Expressão de genes antioxidantes em testículos de ratos submetidos ao envenenamento experimental agudo por *Lachesis muta muta* (Surucucu Sul-Americana) em ratos tratados com n-acetilcisteína e antiveneno

Há evidências na literatura que o acidente ofídico pode provocar alterações na espermatogênese, aumento do estresse oxidativo testicular, atrofia testicular e alterações endócrinas. Apesar disso, não há estudos sobre o envenenamento por *Lachesis* e suas consequências reprodutivas para os homens. O tratamento do envenenamento laquéutico está condicionado à soroterapia e existem poucos registros acerca do uso de outras estratégias terapêuticas. A N-acetilcisteína (NAC) é um antioxidante que poderia auxiliar na redução do estresse oxidativo testicular, porém ainda não foi testada com essa finalidade. O presente estudo teve o objetivo de avaliar a eficiência do uso de NAC, associada ou não ao soro anti-*Bothrops/Lachesis*, na expressão de genes antioxidantes nos testículos de ratos submetidos ao envenenamento experimental por *Lachesis muta muta* (Surucucu Sul-Americana). Os trinta ratos Wistar foram divididos em cinco grupos experimentais (n=6): V = veneno; V + S = veneno e soro antiveneno; NAC = só NAC sem veneno; V+NAC = veneno e NAC (V+NAC); e V+S+NAC = veneno, NAC e soro antiveneno. O veneno foi aplicado em única dose de 1,5 mg/kg (intramuscular), o NAC foi usado na dose de 150 mg/kg (intraperitoneal) e o soro antiveneno na razão 1:3 (v/p) (intraperitoneal). Os ratos foram eutanasiados e os órgãos reprodutivos foram colhidos e pesados. A expressão gênica dos testículos foi verificada por RT-qPCR para os genes de enzimas antioxidantes, glutiona sintetase (*Gss*), catalase (*Cat*) e superóxido dismutase 2 (*Sod2*). O grupo V apresentou menor peso de epidídimo que os grupos V+S e V+NAC (P=0,0079). Não houve diferença significativa na expressão gênica relativa de *Gss* e *Sod2* nos testículos entre os grupos experimentais. Já os grupos V+S, NAC e V+NAC apresentaram maior expressão gênica relativa do gene da *Cat* quando comparados ao grupo V (P=0,0114). Conclui-se que a NAC aumenta a expressão do gene da catalase nos testículos de ratos, assim como o antiveneno, apresentando um potencial antioxidante para o tratamento ofídico.

Palavras-chave: estresse oxidativo; enzima antioxidante; fertilidade masculina; glutatona; NAC; serpentes; soro antiofídico.

ABSTRACT

Expression of antioxidant genes in testes of rats submitted to acute experimental envenoming by *Lachesis muta muta* (Surucucu Sul-Americana) in rats treated with n-acetylcysteine and antivenom

There is evidence in the literature that the snakebite can cause changes in spermatogenesis, increased testicular oxidative stress, testicular atrophy and endocrine changes. Despite this, there are no studies about reproductive consequences for men on envenomation by *Lachesis*. The treatment of envenomation is conditioned to serum therapy and there are few studies about the use of other therapeutic strategies. N-acetylcysteine (NAC) is an antioxidant that could help reduce testicular oxidative stress, but it has not yet been tested for this purpose. The aim of this study was to evaluate the use of NAC, associated or not with anti-Bothrops/Lachesis serum, on the expression of antioxidant genes in the testicles of rats submitted to experimental envenomation by *Lachesis muta muta* (Surucucu Sul-Americana). Wistar rats were divided into 5 groups (n=6): V = venom; V + S = venom and serum; NAC = only NAC without venom; V+NAC = venom and NAC (V+NAC); and V+S+NAC = venom, NAC and antivenom serum. The venom was applied in a single dose of 1.5 mg/kg (intramuscular), the NAC was used in a dose of 150 mg/kg (intraperitoneal) and the antivenom serum in the ratio 1:3 (v/w) (intraperitoneal). Testicular gene expression was verified by RT-qPCR for the genes of antioxidant enzymes: glutone synthetase (*Gss*), catalase (*Cat*) and superoxide dismutase 2 (*Sod2*). V group had lower epididymal weight than groups V+S and V+NAC (P=0.0079). There was no significant difference in the relative gene expression of *Gss* and *Sod2* in the testicles among the experimental groups. V+S, NAC and V+NAC groups showed higher relative gene expression of the *Cat* gene when compared to the V group (P=0.0114). It is concluded that NAC increases the gene expression of *Cat* in testicles of rats, as well as the antivenom, presenting an antioxidant potential for snakebite treatment.

Keywords: oxidative stress; antioxidant enzyme; male fertility; glutathione; NAC; serpents; Snake antivenom.

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	- Análise de variância
°C	- Graus Celsius
CAT	- Catalase
CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EPM	- Erro padrão da média
EUA	- Estados Unidos da América
GAPDH	- Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GSH	- Glutathiona reduzida
GSS	- Glutathiona sintetase
HPRT1	- Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1
Kg	- Quilo
LAO	- Lectinas tipo-C e L-aminoácido oxidase
Mg	- Miligramas
NAC	- N-acetilcisteína
qPCR	- Seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa
pb	- Pares de bases
PLA2	- Fosfolipase A2
RNA	- Ácido Ribonucleico
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
RPS18	- Proteína ribossomal S18
RT	- Transcrição reversa
SABL	- Soro antiveneno Bothrops-Lachesis
SP	- São Paulo
SOD2	- Superóxido dismutase 2
SVMPs	- Metaloproteases de veneno de cobra
SVSPs	- Proteases de serina de veneno de cobra
µg	- Miligramas
µl	- Microlitros
UNOESTE	- Universidade do Oeste Paulista

- V - Grupo veneno
- V+NAC - Grupo veneno +NAC
- V+S - Grupo veneno + soro
- V+S+NAC - Grupo veneno + soro + NAC

SUMÁRIO

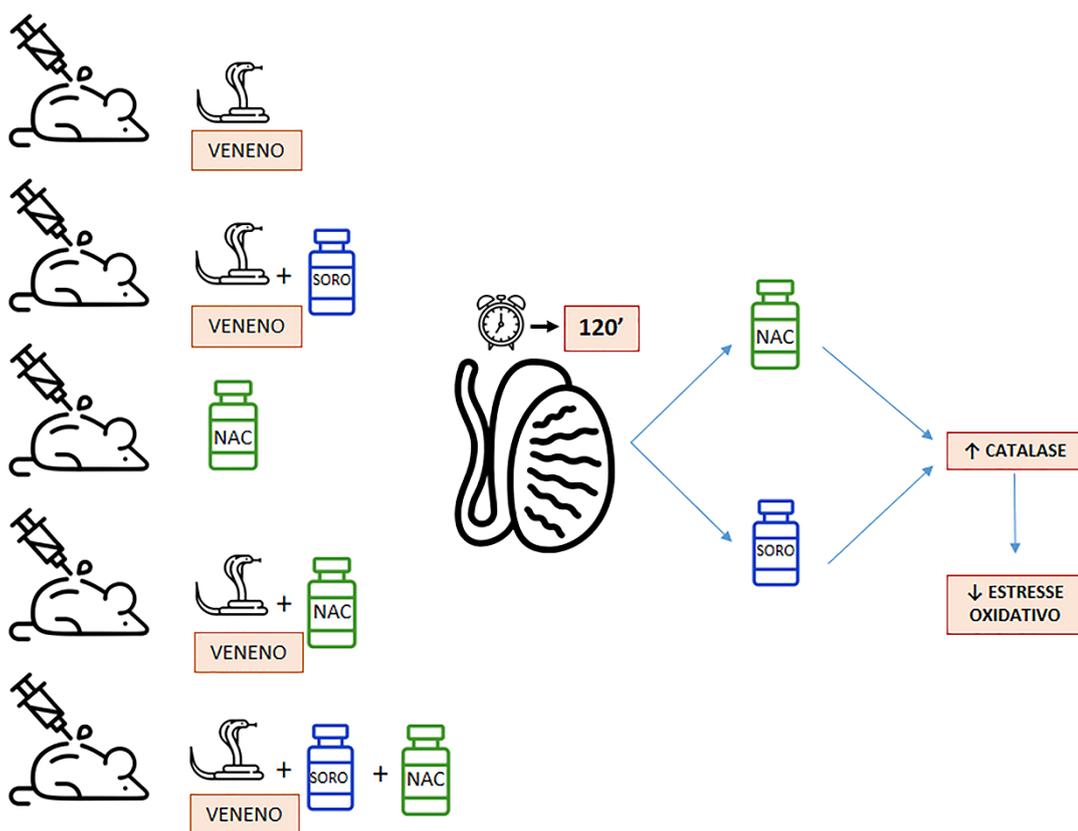
1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	12
	ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.....	31
	ANEXO B- NORMAS DE PUBLICAÇÃO.....	32

1 ARTIGO CIENTÍFICO

ARTIGO NAS NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF VENOMOUS ANIMALS AND
TOXINS INCLUDING TROPICAL DISEASES

(Fator de Impacto = 2.293, Qualis A2 na Medicina Veterinária)

Graphical Abstract:



A N-acetilcisteína aumenta a expressão gênica de catalase em testículos de ratos submetidos ao envenenamento experimental por *Lachesis muta muta* (Surucucu Sul-Americana)

Regina Rafael Teixeira¹, Rafael Stuani Floriano¹, Aline de Oliveira Santos¹, Caliê Castilho¹, Mayara de Oliveira Vidotto Figueiredo¹, Ines Cristina Giometti¹

1 Laboratório de Genética Molecular e Experimentação em Reprodução Animal, Universidade do Oeste Paulista - Unoeste, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

Agradecimentos: Ao Dr. Nelson J. da Silva Jr. Por gentilmente ceder o veneno de *Lachesis muta muta* para o nosso experimento.

Disponibilidade dos dados e materiais: Todos os dados gerados e analisados nesse estudo, estão incluídos no artigo.

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001.

Conflito de interesse: Os autores declaram que não há qualquer conflito de interesse.

Contribuições dos autores: Os autores ICG e RSF conceberam a ideia e organizaram o experimento. RRT, AOS e MOVF coletaram o material e fizeram as análises. ICG, RSF, RRT, CC discutiram os dados e escreveram o artigo.

Aprovação ética: Comitê Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente (SP), número de protocolo 7959.

1 **Resumo**

2 Há evidências na literatura que o acidente ofídico pode provocar alterações na
3 espermatogênese, aumento do estresse oxidativo testicular, atrofia testicular e
4 alterações endócrinas. Apesar disso, não há estudos sobre o envenenamento por
5 Lachesis e suas consequências reprodutivas para os homens. O tratamento do
6 envenenamento está condicionado à soroterapia e existem poucos registros acerca
7 do uso de outras estratégias terapêuticas. A N-acetilcisteína (NAC) é um
8 antioxidante que poderia auxiliar na redução do estresse oxidativo testicular, porém
9 ainda não foi testada com essa finalidade. O objetivo deste estudo foi avaliar o uso
10 de NAC, associada ou não ao soro anti-Bothrops/Lachesis, na expressão de genes
11 antioxidantes nos testículos dos ratos submetidos ao envenenamento experimental
12 por *Lachesis muta muta*. Os ratos Wistar foram divididos em 5 grupos (n=6): V =
13 veneno; V + S = veneno e soro; NAC = só NAC sem veneno; V+NAC = veneno e
14 NAC (V+NAC); e V+S+NAC = veneno, NAC e soro antiveneno. Após a eutanásia
15 dos ratos, os órgãos reprodutivos foram colhidos e pesados. Os testículos foram
16 utilizados para a RT-qPCR de genes antioxidantes (*Gss*, *Cat* e *Sod2*). O grupo V
17 apresentou menor peso de epidídimo que o V+S e o V+NAC (P=0,0079). Não houve
18 diferença na expressão gênica de *Gss* e *Sod2* nos testículos entre os grupos. Já os
19 grupos V+S, NAC e V+NAC apresentaram maior expressão gênica da catalase
20 quando comparados ao grupo V (P=0,0114). Conclui-se que o NAC é aumenta a
21 expressão da catalase nos testículos de ratos, assim como o antiveneno,
22 apresentando potencial antioxidante para o tratamento ofídico.

23 **Palavras-chave:** estresse oxidativo; enzima antioxidante; fertilidade masculina;
24 glutathiona; NAC; serpentes; soro antiofídico

25

26 1. Introdução

27 Os acidentes por picadas de cobras têm alta incidência no mundo todo, com
28 uma estimativa de 1,8 a 2,7 milhões por ano, que levam à morte de 81 a 138 mil
29 pessoas [1–3]. No Brasil, a média de acidentes ofídicos é de 26 mil casos por ano
30 [4]. A *Lachesis muta muta* é popularmente conhecida como surucucu e é a maior
31 serpente peçonhenta das Américas, podendo chegar a 3,5 metros de comprimento
32 [5,6], habitam áreas florestais como a Amazônia, a Mata Atlântica e algumas
33 enclaves de matas úmidas do Nordeste [6,7].

34 O veneno laquético possui ações proteolíticas, coagulantes, hemorrágicas e
35 neurotóxicas, que dependendo da quantidade de veneno introduzido vão ser
36 responsáveis pela gravidade e manifestações clínicas. Os sintomas e sinais se
37 caracterizam por dor, edema, bolhas, necrose, distúrbios da coagulação,
38 manifestações hemorrágicas diversas e uma síndrome vagal, que se manifesta por
39 vômitos, dores abdominais, diarreia, tontura, visão turva, bradicardia e hipotensão
40 [6,8]. O único tratamento do envenenamento por serpentes é o uso de soro
41 antiofídico que é ineficaz contra danos nos tecidos locais e não podem reverter os
42 danos aos sistemas orgânicos [9]. Dentre os soros antiofídicos utilizados no Brasil,
43 foi observado que o antiveneno Bothrops-Lachesis (SABL) foi o que demonstrou
44 melhor capacidade de neutralizar as atividades hemorrágicas da picada de *Lachesis*
45 *muta muta* [10].

46 O veneno de cobra causa redução do peso corporal e do peso testicular e há
47 evidências do efeito direto da toxicidade do veneno nos testículos e também em
48 epidídimos pelo aumento dos marcadores de estresse oxidativo, como o
49 malonaldeído [11]. Há também aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) na
50 membrana plasmática dos espermatozoides pela incapacidade de eliminá-los por

51 redução de enzimas antioxidantes, como glutathione e catalase (CAT), causando
52 redução na motilidade espermática e aumento das patologias espermáticas [11].

53 A NAC é um fármaco conhecido por eliminar efetivamente uma grande
54 variedade de ROS e aumentar os níveis de glutathione intracelular [12]. Em um
55 envenenamento experimental de ratos com veneno de *Lachesis muta muta*, a NAC
56 sozinha e associada ao anti-veneno foi capaz de atenuar as lesões musculares
57 necróticas e em associação preveniu a ocorrência de hemorragia subcutânea, além
58 disso, a NAC foi capaz de reduzir a creatina quinase e parcialmente o aumento de
59 células de defesa induzidos pelo veneno [13].

60 O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência do uso de NAC,
61 associada ou não ao soro anti-Bothrops/Lachesis, na expressão de genes
62 antioxidantes, *Cat*, glutathione sintetase (*Gss*) e superóxido dismutase 2 (*Sod2*) nos
63 testículos dos ratos submetidos ao envenenamento experimental por *Lachesis muta*
64 *muta* (Surucucu Sul-Americana).

65

66 **2. Métodos**

67 Todos os protocolos experimentais que foram utilizados estavam em
68 conformidade com os princípios de cuidados com animais de laboratório formulado
69 pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e de acordo com o
70 *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo *National Research*
71 *Council*. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética
72 em Pesquisa da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente
73 (SP), número de protocolo 7959.

74 O soro polivalente anti-Bothrops/Lachesis produzido pelo Instituto Butantan
75 (São Paulo, SP) foi obtido do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da Pontífica

76 Universidade Católica de Goiás (Goiânia, GO) e foi mantido sob refrigeração até ser
77 utilizado nos protocolos experimentais. O antioxidante NAC (5 g) foi obtido de
78 *Sigma-Aldrich Chemical Co. Ltd. (St. Louis, MO, EUA)*. A peçonha de *Lachesis muta*
79 *muta* foi fornecida pelo Dr. Nelson J. da Silva Jr. do Centro de Estudos e Pesquisas
80 Biológicas da Universidade Católica de Goiás (Goiânia, GO) na forma liofilizada e
81 estocada a -20 °C; soluções estoques foram preparadas em água ultra-pura e
82 estocadas a -20 °C até serem usadas nos protocolos experimentais.

83 Os ratos machos Wistar de 75 dias, de 200 a 300 g, foram mantidos no
84 Biotério de Experimentação da UNOESTE em caixas plásticas com cama de
85 maravalha (3 animais/caixa), sob ciclo de luz/escuro de 12 h a 23–25 °C. Os animais
86 tiveram livre acesso à comida (Supralab®) e água, até o momento dos
87 experimentos.

88 Os ratos foram mantidos no Biotério de Experimentação da UNOESTE para
89 ambientalização por no mínimo duas semanas. Em seguida, os animais foram
90 selecionados randomicamente nos seguintes grupos (n=6): V = injeção
91 intramuscular de veneno de *L. m. muta* (1,5 mg de veneno/kg dissolvido em 100 µl
92 de solução fisiológica); V+S = injeção intramuscular de veneno de *L. m. muta* (1,5
93 mg de veneno/kg dissolvido em 100 µl de solução fisiológica), seguida por injeção
94 intraperitoneal de antiveneno (razão 1 ml de soro para 1,5 mg de veneno); NAC =
95 injeção intraperitoneal de 150 mg de NAC dissolvida em 1000 µl de solução
96 fisiológica; V+NAC = injeção intramuscular de veneno de *L. m. muta* (1,5 mg de
97 veneno/kg dissolvido em 100 µl de solução fisiológica), seguida por injeção
98 intraperitoneal de NAC (150 mg de NAC dissolvida em 1000 µl de solução
99 fisiológica); V+S+NAC = injeção intramuscular de veneno de *L. m. muta* (1,5 mg de

100 veneno/kg dissolvido em 100 μ l de solução fisiológica), seguida por injeção de
101 antiveneno (razão 1:1,5) e NAC (150 mg/kg) [13].

102 Após 120 minutos, os ratos foram anestesiados com uma dose não-letal de
103 tiopental (1,8 mg/kg) e então eutanasiados por exsanguinação. Os testículos,
104 epidídimos e ductos deferentes foram pesados e os testículos foram imediatamente
105 congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C.

106 Para a análise da RT-qPCR, os testículos congelados no freezer a -80°C
107 foram triturados em homogeneizador de tecidos e submetidos ao protocolo de
108 extração do TRIzol® (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific Inc., Carlsbad,
109 California, EUA). A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por
110 espectrofotometria por NanoDrop™ Lite (Fischer Scientific™, ThermoFisher Scientific
111 Inc., Wilmington, Delaware, EUA). Todas as amostras de RNA total foram tratadas
112 com DNase antes de serem submetidas à transcrição reversa (RT) seguida da
113 reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), conforme as instruções do
114 protocolo DNase I Amplification Grade (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific Inc.,
115 Foster City, Califórnia, EUA).

116 A RT foi realizada utilizando o protocolo da High-Capacity cDNA Reverse
117 Transcription Kit (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific Inc., Vilnius,
118 Lituânia), seguindo protocolo do fabricante com oligonucleotídeos iniciadores
119 randômicos.

120 A qPCR foi realizada no termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems™,
121 ThermoFisher Scientific Inc., Foster City, California, EUA) para a análise quantitativa
122 da expressão gênica relativa. Como controle interno das reações de qPCR foram
123 utilizados 3 genes referência, a fim de normalizar os resultados obtidos para o gene-
124 alvo. Os oligonucleotídeos iniciadores foram obtidos a partir de ensaios já

125 padronizados FAM-MGB TaqMan® (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific
126 Inc., Foster City, Califórnia, EUA), conforme descrição a seguir, catalase (*Cat*):
127 Rn00560930_m1, produto: 107 pb; superóxido dismutase 2 (*Sod2*):
128 Rn00690588_g1, produto: 64pb; e glutathiona sintetase (*Gss*): Rn00564188_m1,
129 produto: 67 pb.

130 Como controle interno das reações de qPCR foram testados 3 genes
131 referência para os seguintes ensaios TaqMan®: proteína ribossomal S18 (*Rps18*):
132 Rn01428913_gH, Produto: 62 pb; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*):
133 Rn017775763_g1, produto: 174 pb; e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1
134 (*Hprt1*): Rn01527840_m1, produto: 64 pb. O gene referência escolhido foi o mais
135 estável utilizando o programa NormFinder™ Software ([https://moma.dk/normfinder-](https://moma.dk/normfinder-software)
136 [software](https://moma.dk/normfinder-software), MOMA, Dinamarca).

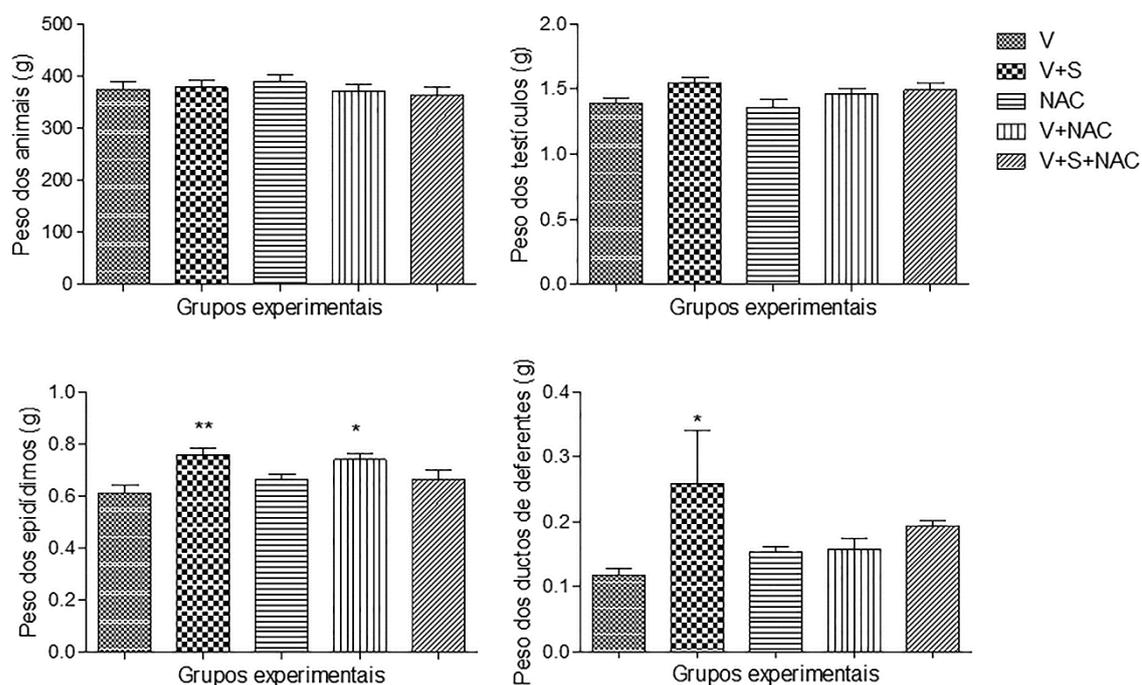
137 As reações de qPCRs foram conduzidas em duplicatas para cada amostra e a
138 expressão gênica foi determinada pela quantificação em relação ao gene referência.
139 O cálculo das eficiências para os genes alvo e controle foi realizado por meio da
140 curva padrão relativa com diluições seriadas. Para quantificação relativa das
141 amplificações foi empregado o método de Pfaffl [14], considerando a média
142 aritmética do ΔCt do grupo controle como calibrador de reação.

143 Todos os resultados foram analisados quanto ao pressuposto de normalidade
144 empregando-se o teste de Shapiro-Wilk. Os dados são apresentados em média \pm
145 EPM. As variáveis foram então submetidas ao teste análise de variância (ANOVA)
146 para comparar as médias dos quatro grupos, seguida do teste de Dunnett,
147 comparando todos os grupos ao grupo V. O nível de significância adotado para
148 todas as comparações foi de 5%.

149

150 3. Resultados

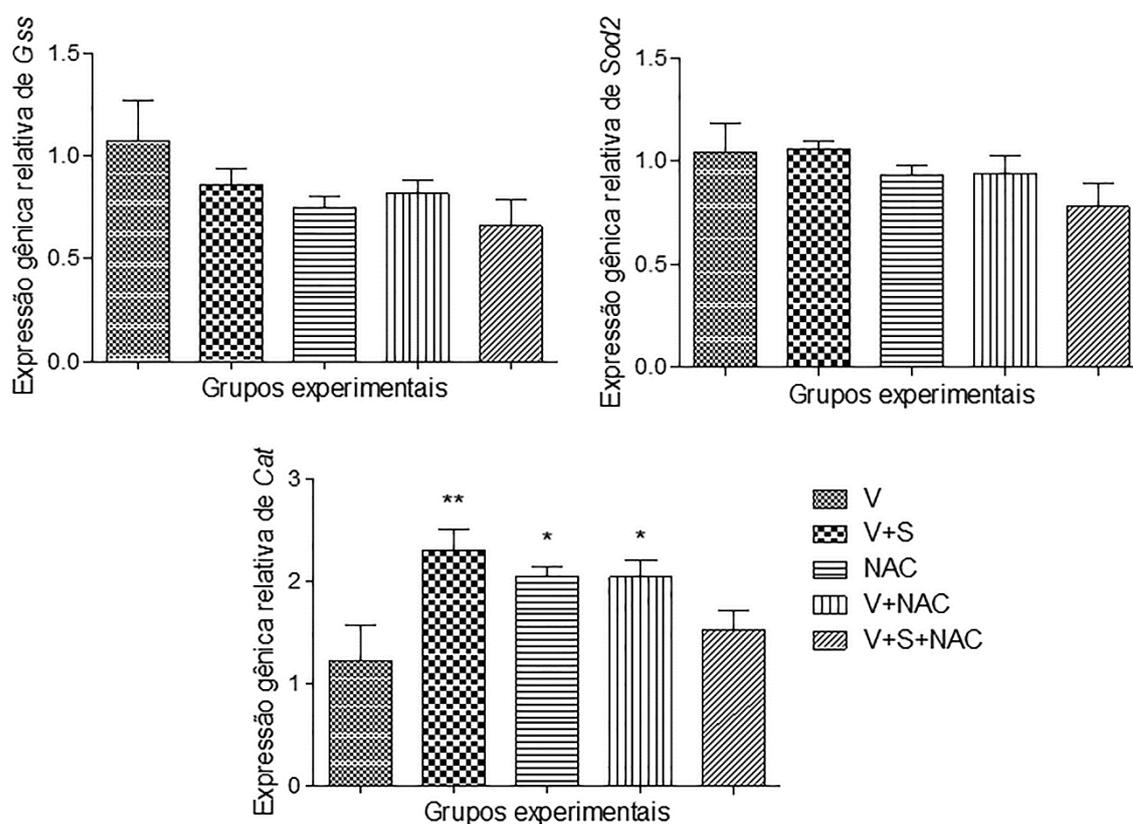
151 Os grupos experimentais não diferiram estatisticamente ao grupo V no peso
 152 corporal, nem ao peso dos testículos (Figura 1). O V+S e o V+NAC apresentaram
 153 maiores valores de epidídimo que o V ($P=0,0079$) e o V+S diferiu estatisticamente
 154 do V no peso do ducto deferente também (Figura 1).



155

156 **Figura 1.** Média \pm EPM do peso dos animais, dos testículos, dos epidídimos e dos
 157 ductos deferentes de ratos Wistar dos seguintes grupos experimentais ($n=6$): V =
 158 injeção intramuscular de veneno de *L. m. muta*; V+S = injeção intramuscular de
 159 veneno de *L. m. muta*, seguida por injeção intraperitoneal de soro antiveneno; NAC
 160 = injeção intraperitoneal de de NAC; V+NAC = injeção intramuscular de veneno de *L.*
 161 *m. muta*, seguida por injeção intraperitoneal de NAC; V+S+NAC = injeção
 162 intramuscular de veneno de *L. m. muta*, seguida por injeção de antiveneno. Os
 163 asteriscos indicam diferença significativa comparado ao grupo V, * $P<0,05$, ** $P<0,01$.
 164 ANOVA seguido de Dunnett.

165 Entre os genes-referência estudados, o *Hprt1* foi o mais estável para o
 166 testículo neste delineamento experimental e por isso foi o normalizador da reação.
 167 Mas qualquer um poderia ser usado porque os três apresentaram valor abaixo de
 168 0,5 no o programa NormFinder™ Software. Houve diferença significativa na
 169 expressão gênica relativa de *Cat* V (P=0,0114), os grupos V+S, NAC e V+S+NAC
 170 apresentaram maior expressão de *Cat* que o grupo V (Figura 2). Os grupos não
 171 diferiram do grupo veneno (P>0,05) na expressão relativa de *Gss* e *Sod2* (Figura 2).



172

173 **Figura 2.** Expressão gênica relativa de *Gss*, *CAT* e *Sod2* nos testículos de ratos
 174 Wistar dos seguintes grupos experimentais (n=6): V = injeção intramuscular de
 175 veneno de *L. m. muta*; V+S = injeção intramuscular de veneno de *L. m. muta*,
 176 seguida por injeção intraperitoneal de soro antiveneno; NAC = injeção intraperitoneal
 177 de de NAC; V+NAC = injeção intramuscular de veneno de *L. m. muta*, seguida por

178 injeção intraperitoneal de NAC; V+S+NAC = injeção intramuscular de veneno de *L.*
179 *m. muta*, seguida por injeção de antiveneno. O gene referência utilizado foi o *Hprt1*.
180 Os asteriscos indicam diferença significativa comparado ao grupo V, *P<0,05,
181 **P<0,01. ANOVA seguido de Dunnett.

182 **4. Discussão**

183 Esse estudo é pioneiro em investigar os efeitos de NAC no estresse oxidativo
184 testicular em ratos ao envenenamento experimental por *Lachesis muta muta*. A
185 exposição experimental em ratos aos venenos de *Naja nigricollis* e *Echis ocellatus*
186 diminuiu a concentração e motilidade espermáticas e aumentou as patologias
187 espermáticas, provocou aumento dos radicais livres no espermatozoide e induziu o
188 estresse oxidativo nos espermatozoides e testículos, aumentando as enzimas
189 inflamatórias testiculares, com redução nos hormônios reprodutivos séricos [9,11].

190 O peso dos testículos não foi alterado com o veneno de cobra *Lachesis muta*
191 *muta*, provavelmente devido ao pouco tempo experimental de efeito do veneno
192 (duas horas). O veneno da cobra *Echis ocellatus*, pode causar atrofia testicular com
193 redução no peso testicular pelo efeito direto da toxicidade do veneno nos testículos e
194 também pelo aumento dos marcadores de estresse oxidativo, como o malonaldeído
195 [11]. Envenenamento experimental com *Crotalus durissus* (25 µg/kg) causa
196 alteração na condensação de cromatina, aumenta o número de espermatozoides
197 com morfologia anormal e a contagem espermática [15].

198 Há um relato de caso na literatura de um homem que sofreu de
199 hipogonadismo após picada acidental no tornozelo de uma serpente Taipan
200 (*Oxyuranus scutellatus*) da família Elapidae. Apesar de se tratar de condições
201 diferentes do presente estudo, já que não foi um envenenamento acidental e não
202 experimental e com gênero de serpente diferente, este relato de caso demonstra

203 uma provável ação direta do veneno nos testículos [16]. A vítima apresentou
204 ginecomastia dois meses após a picada da serpente, devido a uma atrofia testicular
205 bilateral (verificada por ultrassom) e diminuição de testosterona sérica,
206 acompanhada de aumento de hormônio luteinizante e hormônio folículo-estimulante
207 [16]. Nesse caso, o hipogonadismo foi sem hipopituitarismo associado, por efeito
208 direto do veneno da Taipan [16]. Há outros relatos na literatura de hipogonadismo
209 secundário a um hipopituitarismo devido ao envenenamento por picadas de serpente
210 do gênero *Daboia* (Viperidae), esses pacientes tipicamente irão apresentar
211 hipoadrenalismo, hipotireoidismo e hipogonadismo secundários à falência da
212 pituitária anos após o acidente ofídico [17,18], denotando diferentes efeitos tóxicos
213 entre os venenos de espécies diferentes.

214 O peso do epidídimo foi menor nos ratos que só receberam veneno do que
215 nos grupos de animais que receberam veneno e soro e que receberam veneno e
216 NAC. Porém, o peso do ducto deferente só foi menor no V em relação ao V+S. O
217 peso desses órgãos tem relação com a produção espermática, quanto menor a
218 produção espermática, menor o peso dos órgãos. Aparentemente, houve uma
219 redução na liberação de espermatozoides no epidídimo e no ducto deferente pela
220 toxicidade do veneno, que foi compensada em parte pela aplicação do NAC e nos
221 dois órgãos pela aplicação do soro. Foi demonstrado que a o veneno da *Naja*
222 *nigricollis* é capaz de aumentar as citocinas inflamatórias em testículos, epidídimos e
223 cérebro [9].

224 Tanto o soro quanto a NAC foram capazes de aumentar a expressão gênica
225 da enzima CAT nos testículos de ratos, mostrando uma tentativa de controle do
226 estresse oxidativo causado pelo veneno nos testículos. Envenenamento
227 experimental por *Naja haje* (0,025 µg/kg de peso corporal) em ratos Wistar

228 aumentou a peroxidação lipídica e a produção de óxido nítrico no soro e no fígado
229 concomitante com a redução da atividade das enzimas: CAT, glutathione redutase e
230 glutathione S-transferase [19]. Uma toxina isolada de *Daboia russelii* foi denominada
231 de Reprotoxina, por seu potente efeito com tropismo para órgão reprodutivo,
232 aumentando as atividades de fosfatases ácida e alcalina e do óxido nítrico nos
233 testículos de camundongos que receberam injeção da toxina purificada, além disso,
234 ocorreu degeneração das células de Leydig e germinativas [20].

235 O veneno das cobras *Lachesis* (família Viperidae) possuem muitas proteínas
236 biologicamente ativas, entre elas estão as proteínas enzimáticas, metaloproteases
237 (snake venom metalloproteases 'SVMPs'), fosfolipase A2 (PLA2), serino proteases
238 (snake venom serine proteases 'SVSPs'), lectinas tipo-C e L-aminoácido oxidase
239 (LAAO) [21]. Sabe-se que PLA2 e SVMP, presentes no veneno das Elapidae e
240 Viperidae, diretamente contribuem para respostas inflamatórias locais e sistêmicas
241 [22,23]. Os processos inflamatórios sistêmicos, aumentam a permeabilidade
242 vascular, a infiltração das células imunes e mediadores bioativos como histamina,
243 serotonina, bradicinina, fator ativador de plaquetas, prostaglandinas, óxido nítrico e
244 outras [24]. Um importante aspecto da patogênese do envenenamento de serpentes
245 é a geração de ROS que podem diretamente provocar danos teciduais e
246 potencializar os efeitos deletérios da inflamação, tanto a inflamação quanto o
247 estresse oxidativo participam dos efeitos destrutivos do veneno [24]. Os venenos
248 tanto de Elapidae quanto de Viperidae provocam a produção de geração superóxido,
249 de peróxido de oxigênio, e a ativação de NAPH oxidase em animais e modelos *in*
250 *vitro* [25–27].

251 Uma limitação do presente estudo é que só foi avaliada a expressão gênica
252 da CAT, futuros estudos devem verificar também a expressão proteica, atividade

253 enzimática e histologia testicular. Um importante dado que deve ser ressaltado é que
254 o soro associado com NAC não apresentou aumento na abundância relativa de
255 CAT, visto nos outros grupos só com soro ou só com NAC, pode ser que a
256 associação não seja benéfica. Por outro lado, na clínica médica, nem sempre o soro
257 está disponível para o tratamento imediato de picada de cobra, então a NAC pode
258 ser uma opção para uma redução do estresse oxidativo até o soro ser
259 disponibilizado.

260

261 **5. Conclusão**

262 Conclui-se que a NAC aumenta a expressão do gene da catalase nos
263 testículos de ratos e o peso dos epidídimos, assim como o antiveneno,
264 apresentando um potencial antioxidante e de melhora da produção espermática no
265 tratamento ofídico.

266

267 **Referências**

- 268 1. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA.
269 Snakebite envenoming. Nature Reviews Disease Primers [Internet]. 2017;3:17063.
270 Available from: <https://www.nature.com/articles/nrdp201763>
- 271 2. Alberto-Silva C, Franzin CS, Gilio JM, Bonfim RS, Querobino SMH. Toxicological
272 effects of bioactive peptide fractions obtained from Bothrops jararaca snake venom
273 on the structure and function of mouse seminiferous epithelium. Journal of
274 Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases. 2020;26:1–11.
- 275 3. Sarkar S, Sinha R, Chaudhury AR, Maduwage K, Abeyagunawardena A, Bose N,
276 et al. Snake bite associated with acute kidney injury. Pediatric Nephrology [Internet].
277 2021;36:3829–40. Available from: [https://link.springer.com/10.1007/s00467-020-](https://link.springer.com/10.1007/s00467-020-04911-x)
278 [04911-x](https://link.springer.com/10.1007/s00467-020-04911-x)
- 279 4. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SINAN [Internet]. Sistema de Informação de
280 Agravos de Notificação (SINAN). 2020. Available from:
281 <http://portalsinan.saude.gov.br/acidente-por-animais-peconhentos>
- 282 5. Melgarejo AR. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso et al., editor.
283 Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São
284 Paulo: Sarvier; 2003. p. 33–61.
- 285 6. Pardal PP de O, Bezerra IS, Rodrigues L da S, Pardal JS de O, Farias PHS de.
286 Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta muta*) in Belém-Pará: a case report.
287 Revista Paraense de Medicina. 2007;21:37–42.
- 288 7. FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais
289 peçonhentos. 2nd ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

- 290 8. da Silva Souza A, de Almeida Gonçalves Sachett J, Alcântara JA, Freire M,
291 Alecrim M das GC, Lacerda M, et al. Snakebites as cause of deaths in the Western
292 Brazilian Amazon: Why and who dies? Deaths from snakebites in the Amazon.
293 *Toxicon* [Internet]. 2018;145:15–24. Available from:
294 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010118300849>
- 295 9. Ajisebiola BS, Adeniji OB, James AS, Ajayi BO, Adeyi AO. Naja nigricollis venom
296 altered reproductive and neurological functions via modulation of pro-inflammatory
297 cytokines and oxidative damage in male rats. *Metabolism Open*. 2022;14:100188.
- 298 10. Muniz EG, Noronha M das DN, Saraiva M das GG, Monteiro WM, Oliveira SS.
299 Neutralization of hemostatic disorders induced by *Lachesis muta* venom using
300 Brazilian antivenoms. *Toxicon* [Internet]. 2021;191:44–7. Available from:
301 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010120309661>
- 302 11. Ajisebiola BS, Alamu PI, James AS, Adeyi AO. Echis ocellatus Venom-Induced
303 Reproductive Pathologies in Rat Model; Roles of Oxidative Stress and Pro-
304 Inflammatory Cytokines. *Toxins* [Internet]. 2022;14:378. Available from:
305 <https://www.mdpi.com/2072-6651/14/6/378>
- 306 12. Briguori C, Quintavalle C, De Micco F, Condorelli G. Nephrotoxicity of contrast
307 media and protective effects of acetylcysteine. *Archives of Toxicology*. 2011;85:165–
308 73.
- 309 13. Leão-Torres AG, Pires C V., Ribelato AC, Zerbinatti MC, Santarém CL, Nogueira
310 RMB, et al. Protective action of N-acetyl-L-cysteine associated with a polyvalent
311 antivenom on the envenomation induced by *Lachesis muta muta* (South American
312 bushmaster) in rats. *Toxicon* [Internet]. 2021;198:36–47. Available from:
313 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010121001288>

- 314 14. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-
315 PCR. *Nucleic acids research* [Internet]. 2001;29:e45. Available from:
316 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
- 317 15. Fernandes FH, Bustos-Obregon E, Matias R, Dourado DM. *Crotalus durissus* sp.
318 rattlesnake venom induces toxic injury in mouse sperm. *Toxicon* [Internet].
319 2018;153:17–8. Available from:
320 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010118303520>
- 321 16. Van Der Meer E, Conway L, Little M, Hanson J. A case of acute hypogonadism
322 following taipan (*Oxyuranus scutellatus*) envenomation. *Toxicon* [Internet].
323 2020;180:28–30. Available from:
324 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010120301094>
- 325 17. Tun-Pe, Warrell Da, Tin-Nu-Swe, Phillips Re, Moore Ra, Myint-Lwin. Acute and
326 chronic pituitary failure resembling sheehan's syndrome following bites by russell's
327 viper in burma. *The Lancet* [Internet]. 1987;330:763–7. Available from:
328 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673687925001>
- 329 18. Waidyanatha S, Silva A, Siribaddana S, Isbister G. Long-term Effects of Snake
330 Envenoming. *Toxins* [Internet]. 2019;11:193. Available from:
331 <https://www.mdpi.com/2072-6651/11/4/193>
- 332 19. Al-Quraishy S, Dkhil MA, Abdel Moneim A. Hepatotoxicity and oxidative stress
333 induced by *Naja haje* crude venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins*
334 including Tropical Diseases [Internet]. 2014;20:42. Available from:
335 <http://jvat.biomedcentral.com/articles/10.1186/1678-9199-20-42>
- 336 20. Kumar JR, Basavarajappa BS, Arancio O, Aranha I, Gangadhara NS, Yajurvedi

- 337 HN, et al. Isolation and characterization of “Reprotoxin”, a novel protein complex from
338 Daboia russelii snake venom. *Biochimie*. 2008;90:1545–59.
- 339 21. Wiezel GA, Bordon KC, Silva RR, Gomes MS, Cabral H, Rodrigues VM, et al.
340 Subproteome of Lachesis muta rhombeata venom and preliminary studies on
341 LmrSP-4, a novel snake venom serine proteinase. *Journal of Venomous Animals and*
342 *Toxins including Tropical Diseases* [Internet]. 2019;25. Available from:
343 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992019000100307&tlng=en)
344 [91992019000100307&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992019000100307&tlng=en)
- 345 22. Alsolaiss J, Evans CA, Oluoch GO, Casewell NR, Harrison RA. Profiling the
346 Murine Acute Phase and Inflammatory Responses to African Snake Venom: An
347 Approach to Inform Acute Snakebite Pathology. *Toxins* [Internet]. 2022;14:229.
348 Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6651/14/4/229>
- 349 23. Bickler PE. Amplification of Snake Venom Toxicity by Endogenous Signaling
350 Pathways. *Toxins* [Internet]. 2020;12:68. Available from: [https://www.mdpi.com/2072-](https://www.mdpi.com/2072-6651/12/2/68)
351 [6651/12/2/68](https://www.mdpi.com/2072-6651/12/2/68)
- 352 24. Resiere D, Mehdaoui H, Neviere R. Inflammation and Oxidative Stress in
353 Snakebite Envenomation: A Brief Descriptive Review and Clinical Implications.
354 *Toxins* [Internet]. 2022;14:802. Available from: [https://www.mdpi.com/2072-](https://www.mdpi.com/2072-6651/14/11/802)
355 [6651/14/11/802](https://www.mdpi.com/2072-6651/14/11/802)
- 356 25. de Souza CA, Kayano AM, Setúbal SS, Pontes AS, Furtado JL, Kwasniewski FH,
357 et al. Local and systemic biochemical alterations induced by Bothrops atrox snake
358 venom in mice. *Journal of venom research* [Internet]. 2012;3:28–34. Available from:
359 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23487552>

360 26. Swethakumar B, NaveenKumar SK, Girish KS, Kemparaju K. The action of Echis
361 carinatus and Naja naja venoms on human neutrophils; an emphasis on NETosis.
362 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects [Internet].
363 2020;1864:129561. Available from:
364 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416520300519>

365 27. Setubal S da S, Pontes AS, Nery NM, Bastos JSF, Castro OB, Pires WL, et al.
366 Effect of Bothrops bilineata snake venom on neutrophil function. Toxicon [Internet].
367 2013;76:143–9. Available from:
368 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010113003851>

369

ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EXPRESSIONAMENTO DE GENES ANTI-ÓXIDANTES EM TESTÍCULOS DE RATOS SUBMETIDOS AO ENVENENAMENTO EXPERIMENTAL POR LACHESIS MUTA MUTA (SURUCUCU SUL-AMERICANA) EM RATOS TRATADOS COM N-ACETILCISTEÍNA E ANTIVENENO", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 7959 e tendo como participante(s) REGINA RAFAEL TEIXEIRA (discente), RONIVANIA JENUÁRIO SILVA NESPOLI (discente), OLGA ROBERTA SILVA NESPOLI (discente), RAFAEL STUANI FLORIANO (discente), INES CRISTINA GIOMETTI CEDA (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ACESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

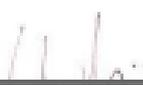
Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.089, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 12/04/2023.

MATERIAL ARMAZENADO/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
5808	13/11/2019	UNOESTE	SIM	freezer -80C do laboratório de genética molecular, bloco Q, Campus II

Presidente Prudente, 5 de Maio de 2023.


Prof. Dr. Luis Rodrigo Garcia Jr.
Discente Responsável pela CPDI


Prof. Dr. Felipe Rydygier de Rossetto
Coordenador da CEUA - UNOESTE

ANEXO B- NORMAS DE PUBLICAÇÃO



0

 [Submit your manuscript \(https://mc04.manuscriptcentral.com/jvatitd-scielo\)](https://mc04.manuscriptcentral.com/jvatitd-scielo)

Guide for Authors

[Submission guidelines \(/guide-for-authors/index/submission-guidelines#15698745\)](#)

[Peer-review policy \(/guide-for-authors/index/peer-review-policy #292\)](#)

Submission guidelines

- [Article types \(/guide-for-authors/index/article-types #394\)](#)
- [Submission \(/guide-for-authors/index/submission #393\)](#)
- [Formatting guidelines \(/guide-for-authors/index/formatting-guidelines #392\)](#)

JVATITD has no restrictions on the length of articles; however, the text is expected to be concise and complete. Moreover, there are no restrictions on the number of figures, tables, or amount of supporting information. Manuscripts submitted to the journal should be in English and neither been published before nor be under consideration for publication elsewhere. Full experimental details must be provided so that the results can be reproduced. Authors should publish all experimental controls and make full datasets available where possible.

JVATITD uses double-blind review, which means that both the reviewer and author identities are concealed from each other throughout the review process. Because of this, authors need to ensure that their manuscripts are prepared in a way that does not give away their identity.

~ TOP

Therefore, it is necessary to remove names and affiliations of authors from the main manuscript file. Such information as well as all authors' declarations must be included in the title page.

Articles must be submitted through our online submission system (<https://mc04.manuscriptcentral.com/jvatitd-scielo>). It guides the authors stepwise through the process of entering manuscript details and uploading files. The system converts the article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (such as Word) are required to typeset the article for final publication.

The article-processing charge (APC) (<https://www.jvat.org/about/index/article-processing-charge#338>) is payable when the manuscript is editorially accepted and before publication.

Article types

JVATITD publishes the following article types:

- **Letter to the editor:** a letter to the editor may contain a re-analysis of a previously published article; a study that may not cover 'standard research' but that is of general interest to the journal; or a brief report of research findings adequate for the journal's scope.
- **Review:** review articles provide concise and precise updates on the latest progress made in specific research areas within the scope of *JVATITD*.
- **Research:** articles containing the results of original research (work reporting scientifically sound experiments and providing a substantial amount of new information).
- **Short report:** studies on important preliminary research findings, ongoing research projects or results of limited significance.
- **Case report:** a detailed report of the diagnosis, treatment, and follow-up of an individual patient.

Submission

Manuscripts should be submitted through our online submission system (<https://mc04.manuscriptcentral.com/jvatitd-scielo>). The submitting author is responsible for the manuscript during the submission and peer-review process. He/she must ensure that all eligible co-authors have been included in the author list and that they have all read and approved the submitted manuscript.

In order to submit a manuscript, the following files are required:

- The main manuscript file that **must not** include the names of authors or co-authors (an anonymous file, since the journal uses double-blind peer review). References and

smaller tables should be included in this file.

- A title page that must contain the names of all authors and co-authors, their affiliations, their e-mails as well as all authors' declarations (see item 3.3 below).
- A cover letter.
- Figure files.
- Any additional files as supplemental material to the manuscript.

Title page

Since *JVATTD* operates double-blind peer review, please include in the title page the following information:

- Personal information of all authors and their institutions such as names, affiliations and e-mails.
- The journal encourages that the ORCID number of all authors is provided.
- A list of statements must be included in the manuscript (item 3.2, authors' declarations). These declarations should be provided in the title page. The topics are: 'Acknowledgments' (if applicable), 'Availability of data and materials', 'Funding', 'Competing interests', 'Authors' contributions', 'Ethics approval/Ethics approval and consent to participate', 'Consent for publication'.

Cover letter

The following information is expected to be included in the cover letter:

- An explanation of why your manuscript is suitable for publishing in *JVATTD*.
- Confirmation that the content of the manuscript is original and has not been published nor is being considered for publication elsewhere.
- If you are submitting a manuscript to a particular special issue please refer to its specific name in the cover letter.
- If your article reports the results of a health care intervention on human participants, *JVATTD* strongly recommends the registration in an appropriate registry. The registration number and date of registration should be in stated in this letter.

Formatting guidelines

1. File formats

The file formats acceptable for the main manuscript document are '.doc' and '.docx' (Microsoft Word). Editable files are required for processing in production. Figures must be submitted as separate image files, not as part of the submitted manuscript file, in the following file formats:

'.jpeg', '.jpg', '.tif' or '.png'.

2. Main manuscript text

The main text of the article should: use double line spacing; include line and page numbering; use SI units; avoid page breaks; and embed special characters the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.

Since JVAITD adopts double-blind peer review, information that allows identification of authors or institution should NOT be included in the manuscript main document.

3. Manuscript sections

Manuscripts are divided into sections depending on their types:

- **Letter to the editor:** should include 'Abstract', 'Keywords', main text that may be broken into subsections with headings, 'Abbreviations' and authors' declarations.
- **Review:** should include 'Abstract', 'Keywords', 'Background', main text broken into subsections with headings, 'Conclusion', 'Abbreviations' and authors' declarations.
- **Research:** should include 'Abstract', 'Keywords', 'Background', 'Methods', 'Results', 'Discussion', 'Conclusion', 'Abbreviations' and authors' declarations.
- **Short report:** should include 'Abstract', 'Keywords', 'Background', 'Methods', 'Results', 'Discussion', 'Conclusion', 'Abbreviations' and authors' declarations.
- **Case report:** should include 'Abstract', 'Keywords', 'Background', 'Case Presentation', 'Discussion', 'Conclusion', 'Abbreviations' and authors' declarations.

3.1. Abstract and keywords

The abstract should not exceed 300 words. Abbreviations and references must be avoided in the abstract. According to the type of paper, the abstract can be structured or unstructured. In the case of research and short reports, it should be divided into the following sections: 'Background', 'Methods', 'Results' and 'Conclusion'. The abstract of a case report should be structured into: 'Background', 'Case Presentation' and 'Conclusion'. Reviews and letters to the editor have unstructured abstracts.

All types of articles must include four to ten keywords representing the main content of the study. The journal encourages the use of MeSH terms (<https://meshb.nlm.nih.gov/search>) as keywords for articles.

3.2. Main text sections

- 'Background' explains the context of the study, its aims, a summary of the existing literature and why this work was necessary.
- 'Methods' describes how the study was performed and statistical tests used.
- 'Results' includes the main findings of the study.
- 'Discussion' analyzes the implications of the findings in the context of existing research and highlights limitations of the study.
- 'Conclusion' states the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study to the field.

~ TOP

- 'Case presentation' contains a description of the patient's demographic details, medical history, symptoms and signs, treatment, outcomes, and other significant information.
- 'Abbreviations' if abbreviations are used in the article they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided.

3.3. Authors' declarations

The following final statements must be included in the final version of the manuscript. These declarations are expected to be in the cover letter during submission since *JVATTD* adopts double-blind peer review.

- 'Acknowledgments' – list of people who contributed towards the article (and does not meet the criteria for authorship) including contributors who provided professional writing services or materials.
- 'Availability of data and materials' – availability statements contain information on where data supporting the results reported in the article can be found, such as hyperlinks to publicly archived datasets. Example sentences are: 'All data generated or analyzed during this study are included in this article'; 'The datasets generated and/or analyzed during the current study are available in the [NAME] repository', 'The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request' or 'Not applicable' if no new data were created or analyzed in the study.
- 'Funding' – all sources of funding of the study should be disclosed; it is necessary to indicate grants that authors have received in support of the research work.
- 'Competing interests' – all financial and non-financial competing interests must be declared in this section. If the authors do not have any competing interests, it is necessary to state 'The authors declare that they have no competing interests'.
- 'Authors' contributions': Each author is expected to have made substantial contributions to the manuscript, which should be specified in this section. Please use initials to refer to each authors' contribution. For example: 'AB, CD and EF conceived this research and designed experiments. GH participated in the design and interpretation of the data. IJ performed experiments and analysis. KL and MN wrote the paper and participated in the revisions of it. All authors read and approved the final manuscript'.
- 'Ethics approval/Ethics approval and consent to participate': manuscripts reporting studies involving human participants or human data must include a statement on ethics approval and consent; and include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number. Studies involving animals must include a statement on ethics approval. If the manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data, it is necessary to state 'Not applicable'.
- 'Consent for publication': if the manuscript contains any individual person's data in any form, consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

Please follow these instructions for figures: they should be provided as separate files, not embedded in the main manuscript file, at a sufficiently high resolution; figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text; multi-panel figures (those with parts A, B, C, D etc.) should be submitted as a single composite file that contains all parts of the figure; figure legends should be provided in the main manuscript, not in the graphic file; it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures that have previously been published elsewhere. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list. The following file formats for figures are accepted: '.jpeg', '.jpg', '.tif' or '.png'.

5. Tables

When preparing tables, please follow these formatting instructions: tables should be numbered and cited in the text in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, Table 2 etc.); small tables can be placed in the appropriate location within the manuscript; larger tables can be placed at the end of the document text file; table titles should be included above the table, and legends should be included underneath the table; and tables should NOT be embedded as figures or spreadsheet files, but should be formatted using 'Table object' function in your word processing program.

6. Additional files

Authors can provide datasets, tables, movies, or other information as additional files. Additional files will be published along with the accepted article. Results that would otherwise be indicated as 'data not shown' should be included as additional files. Each additional file should be cited in sequence within the main body of text. Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail (see Additional file 1)'.

7. References

References must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, including any tables or legends. Example: "According to Lourenço [2], scorpion venoms have been studied for more than a century, and some interesting results were revealed since then [3, 4, 5]". Unpublished data and personal communications should not be included in the reference list. *JVATITD* follows the reference standards summarized in the NLM's International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals: Sample References (https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html) webpage and detailed in the NLM's Citing Medicine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>), 2nd edition. Examples of reference style are shown below:

Article with a Digital Object Identifier (DOI)

Zhang M, Holman CD, Price SD, Sanfilippo FM, Preen DB, Bulsara MK. Comorbidity and repeat admission to hospital for adverse drug reactions in older adults: retrospective cohort study. *BMJ*. 2009 Jan 7;338:a2752. doi: 10.1136/bmj.a2752.

*For works without DOIs from websites, provide a URL in the reference (as long as the URL will work for readers).

Journal article with several authors (all cited) and e-location ID instead of page number
Tchaou BA, de Tové KS, N'Vènonfon CFT, Mfin PK, Aguemon AR, Chobli M, Chippaux JP. Acute kidney failure following severe viper envenomation: clinical, biological and ultrasonographic aspects. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2020 Dec 7;26:e20200059. doi: 10.1590/1678-9199-JVATID-2020-0059.

Issue with supplement

Glauser TA. Integrating clinical trial data into clinical practice. *Neurology*. 2002;58(12 Suppl 7):S6-12. doi: 10.1212/wnl.58.12_suppl_7.s6.

Book: authors and editors

Breedlove GK, Schorfheide AM. Adolescent pregnancy. 2nd ed. Wieczorek RR, editor. White Plains (NY): March of Dimes Education Services; 2001.

Chapter in a book

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

Conference paper

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editors. *Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming*; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

Dissertation

Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertation]. Mount Pleasant (MI): Central Michigan University; 2002.

Part of website

World Health Organization [Internet]. Venomous snakes distribution and species risk categories [cited 2019 Oct 14]. Available from: <http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/>.

Patent

King GF, Mukherjee AK, Wikel SK, McFarland BS, inventors. University of Connecticut, assignee. Acaricidal compositions and methods of use thereof. United States patent US 7,575,758B2. 2009 Aug 18.

Part of a database on the Internet

The Reptile Database [Internet]. Ostrava (Czech Republic): Reptarium. 1995-. *Callisophis bivirgatus* (BOIE, 1827); [cited 2021 July 20]; [about 3 screens]. Available from: <https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Callisophis&species=bivirgatus> (<https://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Callisophis&species=bivirgatus>).

Peer-review is the system used to evaluate the quality of a manuscript before its publication. Independent researchers in the research area assess submitted manuscripts for originality, validity and significance to help editors determine whether the manuscript should be published. *JVATITD* operates using a double-blind peer-review system, where the reviewers do not know the names or affiliations of the authors and the reviewer reports provided to the authors are anonymous. The suitability of a manuscript for publication will be assessed solely on criteria of scientific excellence. Final decisions will be made by the editor-in-chief.



Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases

(<https://jvat.org.br/>)

-  CEVAP/UNESP, Rodovia Alcides Soares, km 3, portaria 2, Fazenda Experimental Lageado, Botucatu, SP, CEP 18519-002, Brasil
-  +55 14 3880 7693
-  editorial.jvatitd@unesp.br

© Copyright - 1995 / 2023 - JVATITD