

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

INGESTÃO DE FRUTOS DE *Enterolobium contortisiliquum*
CAUSA FOTOSSENSIBILIZAÇÃO HEPATÓGENA EM
BOVINOS

Paula Velozo Leal

CAMPO GRANDE, MS
2017

Lombada

2017		INGESTÃO DE FRUTOS DE <i>ENTEROLOBIUM</i> <i>CONTORTISILIQUUM</i> CAUSA FOTOSSENSIBILIZAÇÃO HEPATÓGENA EM BOVINOS		Leal
------	--	---	--	------

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**INGESTÃO DE FRUTOS DE *Enterolobium contortisiliquum*
CAUSA FOTOSSENSIBILIZAÇÃO HEPATÓGENA EM
BOVINOS**

Ingestion of the pods of *Enterolobium contortisiliquum* causes hepatogenous photosensitization in cattle

Paula Velozo Leal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Amaral de Lemos

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Produção
Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2017

Certificado de aprovação (fornecido pela secretaria)

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente este trabalho a meu amigo Renan Rios que se despediu desse mundo justamente no dia da minha defesa e olha por nós lá de cima agora, ficou o exemplo de força, perseverança e fé. Também dedico a minha mãe, meu pai, meus irmãos Thiago, Laura e Emmanuel e a minha sobrinha Manuela.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pois só a fé nos meus sonhos e objetivos e a força que Deus me deu fizeram disso realidade.

Agradeço a minha mãe Zélia, meu maior exemplo de amor, dedicação e dignidade e que esteve comigo em todos os momentos para me apoiar e consolar, ela é a maior razão de todo meu esforço e dedicação. Ao meu pai Ruy, pois mesmo distante tenho certeza que sempre torceu por mim. Ao Manu e a Laura por me aguentarem, mesmo eu tendo um humor de uma velha e estando tão ausente neste último ano, e cuidaram mamãe e da Manu, que é a razão de toda felicidade na nossa casa. Ao Thiago, Cris e minhas sobrinhas por sempre torcerem pelo nosso sucesso. Ao meu namorado Victor por estar comigo em todos os momentos, por não medir esforços pra me apoiar, e cuidar de mim nesse ano de tantas turbulências.

Aos professores Ricardo, Claudio, Danilo e Tessie, por todo ensinamento e apoio. Em particular ao professor Ricardo que há seis anos acredita e apoia todas as nossas escolhas e hoje torna possível a realização de mais uma etapa na minha formação.

As minhas amigas e companheiras de laboratório Rayane, Stephanie, Gleice e Juliana por que melhor equipe não conheço, sem nossa união nada disso seria possível. A Nickolly pela amizade, ajuda e por estar sempre pronta para tudo que precisamos. Ao Gerson, pela disposição e atenção. Ao Marcelo, que independente de não ser oficialmente do laboratório, faz parte da nossa equipe e topa qualquer das nossas loucuras sem medir esforços para nos ajudar. Aos estagiários e não menos amigos, Carol, Amanda, Hugo e Westerlly por toda ajuda e companheirismo.

A equipe do laboratório de Patologia Clínica da UFMS por realizar prontamente os exames e sempre estarem disponíveis quando precisei de ajuda, principalmente quando meu computador apagou todas minhas tabulações e eles fizeram de tudo até que recuperassem todos os dados da minha dissertação.

Agradeço aos meus amigos e família por entender e apoiar minha ausência em muitos momentos importantes, só este apoio e compreensão me fizeram ter forças para conseguir meus sonhos.

Na vida, todos somos semeadores...
Uns semeiam flores e descobrem belezas, perfumes e frutos.
Outros semeiam espinhos e se ferem nas suas pontas agudas.
Ninguém vive sem semear, seja o bem, seja o mal...
Felizes são aqueles que, por onde passam, deixam sementes de amor, de bondade, de afeto
(Divaldo Franco).

Resumo

LEAL, P.V. Ingestão de frutos de *Enterolobium contortisiliquum* causa fotossensibilização hepatógena em bovinos. Ano. 2017 f. 55 Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

Enterolobium contortisiliquum (Leg. Mimosoidae) é uma planta tóxica responsabilizada por quadros de fotossensibilização e fotodermatite, distúrbios digestivos e abortos. Até o momento a reprodução clínica de fotossensibilização não foi bem sucedida ou apenas foi relacionada a apresentações muito discretas. O objetivo deste estudo foi reproduzir em bovinos o quadro de fotossensibilização associada a ingestão de favas de *E. contortisiliquum*. Os frutos foram coletados de uma propriedade com histórico de surtos de fotossensibilização e aborto em bovinos. Seis bovinos de 24 meses de idade, canulados foram utilizados no experimento, sendo destes dois utilizados como controle negativo. Os frutos foram administrados por via intrarruminal por meio de cânula ruminal. Na primeira fase do experimento doses diárias de 30g/kg/PV e 20g/kg/PV foram administradas aos bovinos 1 e 2 respectivamente, por três dias consecutivos. Na segunda fase, iniciada após quatro dias após o termino da primeira, estes foram desafiados com a mesma dose e outros dois (Bovinos 3 e 4) receberam doses 15g/kg/PV, todos por três dias consecutivos. Diariamente mensurava-se a frequência cardíaca, frequência respiratória, pH ruminal, avaliação de mucosas e realizava coleta de sangue para hemograma e exame bioquímico além de inspeções diárias para avaliação de lesões na pele. Nas duas fases os bovinos apresentaram sinais clínicos compatíveis com acidose ruminal, sendo mais graves os quadros na segunda fase do experimento. Três e cinco dias após o termino da administração dois bovinos apresentaram sinais de fotossensibilização, caracterizados por hiperemia e edema da pele do dorso do pescoço, na pele tricotomizada ao redor da cânula, na mufla e na orelha. As lesões evoluíram para necrose da pele, com posterior desprendimento, retração cicatricial e espessamento da pele. Ulceração da mucosa exposta ao sol foi observada. Todos os bovinos que receberam frutos tiveram alterações significativas de gama-glutamil transferase (GGT) e aspartato-amino transferase (AST). Os valores mantiveram-se elevados por até 12 dias após a administração da planta. Alterações histopatológicas hepáticas detectadas por biópsias hepáticas foram tumefação e necrose hepatocelular individual aleatória e multifocal. O presente estudo apresenta confirmação experimental de que a ingestão de *E. contortisiliquum* induz lesões de fotossensibilização hepatógena em bovinos.

Palavras chaves: doenças de ruminantes, plantas tóxicas, fotodermatite, *Enterolobium contortisiliquum*.

Abstract

LEAL, P.V. Ingestion of the pods of *Enterolobium contortisiliquum* causes hepatogenous photosensitization in cattle. Ano. 2017 f. 55 Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

Enterolobium contortisiliquum (Leg. Mimosoidae) is reported as a poisonous plant related to photosensitization and photodermatitis, digestive disturbs and abortion. To date, the clinical and pathological features of photosensitization has not been reproduced or only reproduced associated with very mild presentations. The objective of this study was to reproduce in cattle the clinicopathological features of photosensitization associated with the ingestion of the pods of *E. contortisiliquum*. The pods were harvested from a property with a history of an ongoing outbreak photosensitization and abortion in cattle. Six 24-month steers were cannulated and used in the experiment, two of them served as negative controls. *E. contortisiliquum* pods were administered to four steers through ruminal cannula. In the first phase of the experiment, daily doses of 30 g/kg/body weight (bw) and 20g/kg/bw were administered to Bovines 1 and 2 respectively, for three consecutive days. In the second phase, starting four days after the last daily feeding of the pods, these two bovines were challenged with the same doses of the pods for three consecutive days and another two steers (Bovines 3 and 4) were fed 15g/kg/bw each for three consecutive days. In the two phases, the steers developed signs compatible with ruminal acidosis which were more severe during the second phase. Three and five days after the administration of the pods, two steers presented photodermatitis characterized by hyperemia and edema on the skin of the dorsum of the neck, of the shaved skin around the cannula, of muzzle and ear. Lesions evolved to dermal necrosis with sloughing and subsequent scar retraction and dermal thickening. Ulceration of mucosae exposed to sunlight was also observed. All the steers which received the pods had significant elevations in the serum activities of gamma-glutamyl transferase (GGT) and aspartate aminotransferase (AST). The levels of GGT and AST remained elevated for up to 12 days after the administration of the pods was discontinued. Histopathological hepatic changes detected by liver biopsies were hepatocellular swelling and randomly scattered individual hepatocellular necrosis. The current study presents solid experimental evidence that the ingestion of *E. contortisiliquum* definitely induces the classical lesions of hepatogenous photosensitization in cattle.

Key words: Diseases of ruminants, poisonous plants, photodermatitis, *Enterolobium contortisiliquum*

Lista de ilustrações

Figura 1. Atividades séricas de aspartato aminotransferase em quatro bovinos intoxicados com <i>Enterolobium contortisiliquum</i> e nos controles.	23
Figura 2. Atividades séricas de gamma-glutamil transferase em quatro bovinos intoxicados com <i>Enterolobium contortisiliquum</i> e nos controles.	24
Figura 3. Bovinos 3. Fotodermatite focal com necrose dérmica e descamação da porção necrótica do focinho. Áreas sem desprovidas de pelos são mais vulneráveis à ação dos raios solares.	25
Figura 4. Bovinos 2. Fotodermatite focal com necrose dérmica e descamação da porção necrótica na parede torácica lateral direita. O formato geométrico da lesão é devido à perda da proteção de pelo na área tricotomizada para a realização da biópsia hepática.	25
Figura 5. Bovinos 3. Lesão crônica. Cicatriz por fibrose causou retração da ponta da orelha, que apresenta espessamento dérmico dorsal	26
Figura 6. Bovinos 3. Fotodermatite da pele da orelha. A porção necrótica da ponta da orelha é separada do tecido viável por área inflamada vermelha irregular. A porção necrótica é seca e de aspecto coriáceo. Esta porção eventualmente se desprende.	26
Figura 7. Soros bovinos. O soro de Bovino 3 (à direita) é marcadamente amarelo contrastando com o soro incolor do animal controle (à esquerda)	27

Lista de tabelas

Tabela 1. Introdução - Experimentos realizados com <i>Enterolobium contortisiliquum</i>	6
Tabela 1 – Artigo - Delineamento experimental e resultados obtidos.....	22

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1. Intoxicação por <i>Enterolobium contortisiliquum</i>	2
2. Tabela 1	6
Referências.....	7
Artigo - Ingestão de frutos de <i>Enterolobium contortisiliquum</i> causa fotossensibilização hepatógena em bovinos	10
Resumo	11
Abstrat.....	12
1. Introdução.....	13
2. Materiais e Métodos.....	14
3. Resultados	15
4. Discussão	16
Referências	18
Legenda das figuras	20
Tabela 1.....	22
Figura 1	23
Figura 2	24
Figura 3	25
Figura 4.....	25
Figura 5	26
Figura 6	26
Figura 7.....	27
Instruções aos autores – Toxicon.....	28

INTRODUÇÃO

Plantas tóxicas de interesse pecuário são plantas que sob condições naturais, causam danos à saúde ou a morte em animais. Para serem incluídas como planta que causam intoxicação em animais, estas devem ser comprovadas experimentalmente na espécie em que ocorreram originalmente casos de intoxicação (Tokarnia et al. 2012). Plantas tóxicas são importantes causas de perdas econômicas diretas e indiretas em animais de produção (Rissi et al. 2007). As perdas diretas estão relacionadas ao desempenho produtivo e mortes dos animais, e as indiretas com o manejo que deve ser realizado para o controle da intoxicação (Riet-correa & Medeiros, 2001).

As plantas toxicas são classificadas quanto ao mecanismo de ação das lesões que elas causam aos animais. Um importante grupo são as plantas e micotoxinas fotossensibilizantes (Tokarnia et al. 2012). Fotossensibilização são injurias a pele resultado da ativação de pigmentos fotodinâmicos pela luz ultravioleta de raios solares (Smith & Megdesian 2015), sendo estes raios solares de comprimento de onda longo, acima de 200 a 400nm, e os pigmentos estarem depositados entre os limites da derme superficial (Mauldin & Peters-Kennedy, 2016, Cullen & Stalker 2016). Para que as lesões ocorram é necessário que as substancias fotodinâmicas presentes na pele estejam em quantidades suficientes para causar lesões quando expostas a luz. Agentes fotodinâmicos, podem ser diretamente ingeridas (fotossensibilização primária) ou são produtos metabólicos normais que quando acumulados na pele devido à falha de excreção hepática (fotossensibilização secundária ou hepatógena) (Radostits et al. 2007, Cullen & Stalker 2016, Mauldin & Peters-Kennedy, 2016).

A fotoporfirina (antes denominada filioeritrina) é um pigmento fotodinâmico produzido pela digestão da clorofila pelas bactérias gastrointestinais, esta normalmente é absorvida no intestino, captada pelos hepatócitos e secretada na bile. Quando há disfunção hepatocelular ou obstrução biliar, este pigmento se acumula na circulação sanguínea e se deposita no tecido subcutâneo (McGavin et al 2012, Cullen & Stalker 2016). Uma vez o pigmento depositado no tecido, quando é exposto a radiação ultravioleta solar, com onda longa que absorvidas pela pele resulta na liberação de energia que produz moléculas reativas de oxigênio, inclusive radicais livres. A geração destas moléculas reativas, leva a degranulação de mastócitos e a produção de mediadores inflamatórios, causando danos as membranas celulares, ácidos nucleicos, proteínas e organelas celulares (McGavin et al. 2012). Estas alterações causam inflamação e intensa irritação e consequente edema que

progride para necrose e gangrena de extremidades nos estágios finais da lesão (Smith & Megdesian 2015, Radostits et al. 2007).

No Brasil as principais plantas relacionadas com surtos de fotossensibilização hepatógena são *Brachiaria* spp (Albernaz et al. 2012, Brum et al. 2007, Souza et al. 2010, Faccin et al. 2014, Pupin et al. 2016), *Enterolobium contortisiliquum* (Grecco et al. 2002, Olinda et al 2015), *Stripnodendrom fissuratum* (Ferreira et al. 2009), *Lantana* spp (Rissi et al. 2007) e *Panicum* spp (Riet-correa et al. 2007).

Intoxicação por *Enterolobium contortisiliquum*

Enterolobium contortisiliquum pertence à família Leguminosae - Mimosoideae e é conhecido popularmente como timbaúva (Tokarnia et al 2012, Lorenzi 1992), ximbuva (Purisco & Lemos 2008, Cullen & Stalker 2016), tamboril, orelha de macaco (Costa et al. 2009). É uma árvore com ampla distribuição no Brasil, estendendo-se do Pará ao Rio Grande do Sul (Matos et al. 2011) e sua madeira pode ser utilizada na fabricação de barcos e canoas de tronco inteiro, brinquedos, compensados, armações de móveis, miolo de portas e caixotaria em geral (Lorenzi 1992). É amplamente utilizada para reflorestamento de áreas degradadas de preservação permanente em plantios mistos, principalmente por seu rápido crescimento inicial (Lorenzi 1992, Matos et al.,2011).

Há relatos de intoxicação espontânea em bovinos (Grecco et al.,2002, Mendonça et al. 2009, Sant'ana et al. 2014, Olinda et al. 2015), caprinos (Assis et al. 2009) e ovinos (Bezerra et al. 2012). Bovinos são observados quadros de fotossensibilização, abortos e sinais digestivos (Tokarnia et al. 1999, Grecco et al. 2002, Mendonça et al. 2009, Sant'Ana et al. 2014, Olinda et al. 2015), quadros digestivos em caprinos (Assis et al. 2009) e fotossensibilização em ovinos (Bezerra et al. 2012). Nos quadros espontâneos, relata-se que os animais ingerem os frutos avidamente quando tem acesso a estes caídos ao chão, não necessariamente há privação de alimento no momento da ingestão (Grecco et al.,2002, Mendonça et al. 2009, Assis et al. 2009, Dias et al. 2012, Sant'ana et al. 2014, Olinda et al. 2015). Apenas em um surto, bovinos tiveram acesso aos frutos após poda de árvores no período da frutificação (Grecco et al. 2002).

A ingestão de frutos de *E. contortisiliquum*, é associada a surtos de intoxicação de fotossensibilização, sinais digestivos e abortos em ruminantes. Seu efeito tóxico, para bovinos, foi primeiramente demonstrado experimentalmente por Tokarnia et al. (1960). A reprodução dos quadros de fotossensibilização e aborto não foram bem-sucedidas, pois os animais desenvolveram com sinais digestivos, progredindo para recuperação ou morte,

ou não apresentaram alterações (Tokarnia et al., 1999). Estudos posteriores demonstraram quadros digestivos em caprinos (Dias et al., 2011), abortos em cobaias (Bonel-Raposo et al. 2008) e sinais de fotodermatite discreta foram reproduzidos em bovinos, 15 dias após o termino do experimento (Grecco et al. 2002, Shons 2011). Nos experimentos realizados por Bacha et al. 2016, administraram-se frutos na tentativa de se reproduzir fotossensibilização, porém os animais morreram com sinais digestivos compatíveis com acidose ruminal, constatou-se a presença de carboidratos altamente fermentescíveis nas favas de *E. contortisiliquum*, de modo que a administração de altas doses da planta para ovinos resultam em quadros de acidose láctica ruminal aguda, os quais são responsáveis pela morte antes do aparecimento das manifestação de insuficiência hepática.. Tal hipótese foi comprovada em estudo subsequente em ovinos (Pupin et al. 2017). Os dados dos experimentos realizados até o momento estão dispostos na Tabela 1.

Clinicamente os animais apresentam sinais digestivos, fotossensibilização e abortos. Os quadros digestivos são caracterizados por diarreia acentuada e fétida, inapetência (Purisco et al. 1998) atonia ruminal, fezes ressequidas com muco e sangue (Grecco et al. 2002). A fotossensibilização caracterizada por inquietação, edema de orelha, lesões crostosas na pele e desprendimento (Mendonça et al, 2009, Olinda et al., 2015). Os abortos são descritos são frequentemente descritos por produtores rurais (Bezerra et al., 2012, Sant'Ana et al., 2014), experimentalmente foram reproduzidos Bonel-raposo et al., 2008, em cobaias. Neste estudo, todos os animais foram necropsiados e apresentavam alguns apresentaram lesões hepáticas discretas, de modo que não foi possível caracterizar se a toxina age sob as cobaias ou se ela causou diretamente o aborto.

Achados de necropsia não são constantes, pois são proporcionais à manifestação clínica que o animal está apresentando. São observadas lesões de fotossensibilização semelhantes às descritas anteriormente, fígado aumentado por vezes com pontilhado esbranquiçado na superfície capsular. Na histologia de casos espontâneos há vacuolização de hepatócitos com picnose, discreta retenção biliar. Experimentalmente se observou necrose em graus variáveis de hepatócitos (Grecco et al 2002, Purisco et al 1998, Mendonça et al, 2008, Olinda et al.2015), necrose balonosa e rúmen com vesículas repletas por neutrófilos e desprendimento das camadas superficiais do epitélio (compatíveis com acidose láctica ruminal aguda) (Bacha et al 2016, Pupin et al.,2017).

Vários princípios tóxicos foram isolados dos frutos de *E. contortisiliquum*: contorsilioides A-G (1-8), os quais demonstraram-se citotóxicos para macrófagos, linfoma murinho e fibroblastos de ratos (Mimaki et al. 2004). Enterolosaponinas A e B, produzem

maiores efeitos citotóxicos sobre macrófagos de ratos, sendo a tipo A que causa maiores lesões (Mimaki et al. 2002). Estudos com isolamento das substâncias químicas presentes no fruto isolaram através do método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de inibidores de tripsina tipo Kunitz (Batista et al. 1996, De Paula et al. 2012). Estes inibidores são utilizados como fatores antitumorais (De Paula et al. 2012). Apesar do isolamento destes princípios tóxicos, não foi comprovada experimentalmente que estes princípios reproduzem os quadros clínicos observados a campo.

Importantes parâmetros para o diagnóstico da intoxicação, e do acompanhamento dos experimentos são as avaliações de enzimas séricas aspartato-amino transferase (AST) e gama-glutamil transferase (GGT) (Grecco et al. 2002, Olinda et al. 2016, Bacha et al. 2016, Pupin et al. 2017).

A GGT está associada a membranas celulares, é responsável por catalisar a transferência de grupos glutamílicos entre peptídeos e está envolvida nas reações de glutatona. O aumento da atividade sérica desta enzima indica colestase ou hiperplasia biliar, concentrações elevadas de ácidos biliares no fígado e plasma na ocorrência de bilestase. Este aumento estimula a produção e liberação de GGT e Fosfatase Alcalina (FA). Em bovinos em geral considera-se que atividade de GGT tem maior sensibilidade para determinar distúrbios biliares do que a FA. Distúrbios associados a atividade aumentada de GGT incluem obstrução do ducto biliar, colangite, coleliscistite, processos tóxicos, intoxicação por plantas, intoxicação por cobre, micotoxicose e fasciolose (Kaneko et al 2008, Stockham, & Scott., 2011, Smith & Megdesian 2015).

A AST é uma enzima citoplasmática e mitocondrial que catalisa uma ligação reversível envolvida na disseminação de aspartato para transformar oxalacetato que poderá ser utilizado no ciclo de Krebs. O aumento no AST pode indicar lesão reversível ou irreversível ao hepatócito em reação a uma variedade de injúrias que incluem inflamação, traumatismo, hipóxia ou em processo regenerativo de doença hepática. Em bovinos e equinos a AST comumente aumenta em função de lesão hepatocelular (Kaneko et al. 2008, Stockham & Scott, 2011, Smith & Megdesian 2015).

Para o diagnóstico de quadros de intoxicação por *E. contortisiliquum* deve-se basear no conjunto de dados, sendo o histórico um dado muito importante (Purisco et al., 1998, Tokarnia et al., 2012). A presença da planta em frutificação, acesso dos bovinos ao fruto no chão (Grecco et al. 2002, Mendonça et al 2008, Sant'ana et al. 2014, Olinda et al 2015) ou após a poda de árvores (Grecco et al., 2002), associada a animais com sinais clínicos de fotossensibilização, sinais digestivos ou relatos de abortos. Como diagnósticos

diferenciais deve se considerar as principais plantas que causam fotossensibilização, lesões digestivas e abortos. Controle e profilaxia incluem retirada dos animais da pastagem que contenham frutos e tratamento sintomático (Tokarnia et al. 2012).

As tentativas de reprodução experimentais da fotossensibilização hepatógena não obtiveram sucesso. No entanto, vários destes estudos ocorreram quadros digestivos seguidos de morte (Tokarnia et al. 1999, Mendonça et al. 2009), embora não sejam descritas lesões características de acidose ruminal láctica aguda, é provável que este quadro clínico patológico deva-se a acidose ruminal conforme demonstrado nos experimentos realizados posteriormente (Bacha et al. 2016, Pupin et al., 2017). Considerando que lesões de fotodermatite discreta reproduzidas experimentalmente ocorreram 15 dias após a manifestação digestiva (Grecco et al., 2002, Shons 2011), estas lesões não poderiam ocorrer devida a rápida evolução da doença, portanto é provável o quadro de fotodermatite ocorra em animais que sobrevivem ao quadro inicial da intoxicação que se caracteriza por quadros digestivos. Portanto o objetivo deste estudo foi estabelecer os aspectos clinicopatológicos das lesões hepáticas e da fotossensibilização hepatógena por meio da administração intrarruminal de frutos de *E. contortisiliquum*, mediante controle da acidose láctica ruminal aguda em bovinos.

Tabela 1. Experimentos realizados com *Enterolobium contortisiliquum*

Autor	Espécie	Doses (g/kg)	Resultados
Tokarnia et al. 1999	Bovinos	1,25; 2,5; 5,0; 10	1,25-2,5 sem alterações >5,0-10 sinais digestivos moderados a graves; morte
Grecco et al. 2002	Bovinos	5,0; 10; 20	2 bovinos (20 e 10) sinais digestivos e morte 2 bovinos (5 e 10) fotodermatite discreta
Bonel-Raposo et al. 2008	Cobaías	5,0; 10,0; ração com 4%	5,0 - 10,0 – morte; ração 4% - aborto (sem lesões no trato reprodutivo, presença de lesões hepáticas severas
Mendonça et al. 2009	Bovinos	5,0; 9,0; 12,0	Sinais digestivos leves a acentuados, todos animais se recuperaram
Shons 2011	Bovinos	4,0; 8,0; 15,0	4,0 - Sinais digestivos 15 dias após fotodermatite leve 8,0 incoordenação, decúbito, emagrecimento icterícia e morte 15,0 sinais digestivos e morte
Dias et al. 2011	Caprinos	2,5; 5,0; 10	Apenas 10g/kg degeneração balonosa no rúmen e degeneração centrolobular
Bacha et al. 2016	Ovinos	10,0 e 12 ,0	Sinais digestivos de leve a acentuados, compatíveis com acidose ruminal, um animal apresentou retenção biliar e elevação de AST e GGT
Pupin et al. 2017	Ovinos	5,0; 10,0; 15,0	Sinais clínicos digestivos, acidose ruminal, progredindo ou não para morte. Elevações significativas em AST e GGT

REFERÊNCIAS

- Albernaz T.T., Silveira J.A.S., Silva N.S., Oliveira C.H.S., Belo Reis A.S., Oliveira C.M.C., Duarte M.D., Barbosa J.D et al. 2010 Fotossensibilização em ovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no estado do Pará. Pesq. Vet. Bras. v.30 n.9 p. 741-748
- Assis T.S., Medeiros R.M.T., Araújo J.A.S., Dantas A.F.M. & Riet-Correa, F. 2009. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano. Pesq. Vet. Bras. V.29 n.11 p.919-924.
- Bacha F.B., Pupin R.C., Leal P.V., Carvalho N.M., Franco G.L., Ítavo C.C.B.F., Riet-Correa F., Lemos R.A.A. 2016. Experimental intoxication by *Enterolobium contortisiliquum* in sheep. Pesq. Vet. Bras. (In Press)
- Batista, I. F. C., Oliva, M.L.C., Araujo, M.S. et al, 1996. Primary Structure Of A Kunitz-Type Trypsin Inhibitor From *Enterolobium Contortisiliquum* Seeds. Phyt., v. 41, n. 4, p. 1017-1022.
- Bezerra, C.W.C., Medeiros, R.M.T., Rivero, B.R.C., Dantas, A.F.M., Amaral, F.R.C., 2012.Plantas toxicas para ruminantes e equídeos na microrregião do Cariri Cearense. Cien. Rur. v.42, p.1070 -1076
- Bonel-Raposo J., Riet-Correa F., Guim T.N., Schuch I.D., Grecco F.G. & Fernandes C.G. 2008. Intoxicação aguda e abortos em cobaias pelas favas de *Enterolobium contortisiliquum* (Leg. Mimosoideae). Pesq. Vet. Bras. v.28 p. 593-596.
- Brum, K. B.; Haraguchi, M.; Lemos, R. A. A.; et al. 2007 Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. Pesq. Vet. Bras..v.27 n.1, p. 39-42
- Costa, R.L.D. da, A. Marini , D. Tanaka¹ et al. 2009 Um Caso De Intoxicação De Bovinos Por *Enterolobium Contortisiliquum* (Timboril) No Brasil,. Arch. Zoo. v. 58 n. 222 p. 313-316.
- Cullen, J.M., Stalker M.J. 2016. Hepatic dysfunction. In: Maxie, M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer, sixth ed. Vol. 2. Elsevier, St. Louis, p. 290-295.
- De Paula,C.A.A., Coulson-Thomas V. , Ferreira J. G., 2012. *Enterolobium contortisiliquum* Trypsin Inhibitor (EcTI), a Plant Proteinase Inhibitor, Decreases in Vitro Cell Adhesion and Invasion by Inhibition of Src Protein-Focal Adhesion Kinase (FAK) Signaling Pathways. The Journal Of Biological Chemistry v. 287, n. 1, p. 170–182.
- Dias A.C.S., Franklin F.L.A.A., Carvalho C.J.S., Fonseca L.S. & Silva M.M.S. 2011. Intoxicação experimental pelas favas de *Enterolobium* sp. em caprinos. Disponível em <http://leg.ufpi.br/20sic/Documentos/RESUMOS/Modalidade/Vida/dc5c768b5dc76a084531934b34601977.pdf>. Acesso dia 07/10/2015.
- Faccin, T. C.; Riet-Correa, f.; Rodrigues, F. S.; et al.2014 Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naïve and experienced sheep. Tox., v.82 p 1-8.
- Ferreira E.V., Boabaid F.M., Arruda L.P.2009. Intoxicação por *Stryphnodendron fissuratum* (Mimosoideae) em bovinos. Pesq. Vet. Bras. v. 29 n. 11 p. 951-957.

- Grecco F.B., Dantas A.F.M., Riet-Correa F., Leite C.G.D. & Raposo J.B. 2002. Cattle intoxication from *Enterolobium contortisiliquum* pods. Vet. Hum.,Tox. v.l. n.44 p.60-162.
- Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. 2008. Clinical biochemistry of Domestic Animals. 6th ed. Academic Press, San Diego. p.882-884.
- Lorenzi H. 1992. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. Plantarum, Nova Odessa. p.177.
- Mac Gavin, M. D. & Zachary, J. F. Bases da patologia em veterinária. Rio de Janeiro, Editora Elsevier. 1496p. 2009.
- Mauldin E.A., J.M., Peters-Kennedy J. 2016. Photosensitization dermatitis. In: Maxie, M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer, sixth ed. Vol. 1. Elsevier, St. Louis p. 578-295.
- Matos F.J.A., Lorenzi H., Santos L.F.L, Matos M.E.O., Silva, M.G.V. & Sousa, M.P. 2011. Plantas tóxicas – Estudo de fitotoxicologia química das plantas brasileiras. Instituto Plantarum de estudos da flora LTDA. Nova Odessa, São Paulo. Brasil. p.106-107.
- Mendonça, F.S., Evencio-Neto, J., Baratella-Evencio, L., Doria, R.G.S., Freitas, S.H., Pelegrini, L.F., Cruz, R.A.S., Ferreira, E.V., Colodel, E.M., 2009. Natural and experimental poisoning of cattle by *Enterolobium contortisiliquum* pods (Fabaceae Mimosoideae) in Central-Western Brazil. Act. Vet. n 78, p. 621 - 625.
- Mimaki Y., Harada H., Sakuma C. et al. 2003. Enterolosaponins A and B, novel triterpene bisdesmosides from *Enterolobium contortisiliquum*, and evaluation for their macrophage-oriented cytotoxic activity. Bioorg. Med. Chem. Letters n. 13 p.623-627.
- Mimaki Y., Harada H., Sakuma C., 2004. 2004. Contortisiliosides A-G: isolation of seven new triterpene bisdesmosides from *Enterolobium contortisiliquum* and their cytotoxic activity. Helvetica Chimica Acta 87:851-865.
- Olinda R.G., Medeiros R.M.T., Dantas A.F.M., Lemos R.A.A. & Riet-Correa F. 2015. Intoxicação por *Enterolobium contortisiliquum* em bovinos na região Nordeste do Brasil. Pesq. Vet. Bras. v.35 p.44-48.
- Pupin R.C, Melo G.K.A., Heckler R.F., Faccin T.C.2, Ítavo C.C.B.F., Fernandes C.E, Gomes D.C. & Lemos R.A.A.. 2015. Detection of Lamb Flocks Susceptible and Resistant to *Brachiaria* Poisoning. Pesq.Vet. Bras. v.36 n.5 p.383-388
- Pupin RC, Leal PV, Lima SC, Melo GKM, Pott A, Araújo MA, Barros CSL, Lemos R.A.A. 2017. *Enterolobium contortisiliquum* is a cause of acute ruminal acidosis in sheep. Tox. 126: 90-95
- Purisco E., Lemos R.A.A, Nakazato, L., Dutra I.S. 1998. Intoxicação por *Enterolobium contortisiliquum*. In: Lemos R.A.A. (Ed.) Principais Enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul. Reconhecimento e Diagnóstico. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. Cap.IV, p. 307-315.
- Purisco E. & Lemos R.A.A. 2008. Plantas que causam fotossensibilização hepatógena, In: Lemos R.A.A. & Leal C.R.B (Eds). Doenças de impacto econômico em bovinos de corte – perguntas

- e respostas. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Editora UFMS, cap III, p231-241.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. Diseases of skin, conjunctiva and external ear. In. Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh. c.14 p .659-661
- Riet- Correa B., Castro M.B., Lemos R.A., Riet-Correa G., Mustafa V. & Riet-Correa F.; et al. 2011. *Brachiaria* spp. Poisoning of ruminants in Brazil. Pesq. Vet. Bras. v.31 n.3, p.183-192.
- Riet-Correa, F. & Medeiros, R. M. T. 2001. Intoxicações por plantas em ruminantes no brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. Pesq. Vet. Bras. v.21 n.1
- Rissi D.R., Rech R.R., Pierezan F. et al. 2007. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. Pesq.Vet. Bras. v.27 n.7 p.261-268.
- Sant'Ana, F.J.F. Reis, J. L, Freitas, A. P. N., Moreira, C. A. J, Vulcani, V. A. S., Rabello, R. E., Terra, J. P. 2014. Plantas tóxicas para ruminantes do Sudoeste de Goiás. Ciên. Rur, v.44, n.5, p.865-871.
- Schons S.V. 2011. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos na região central de Rondônia. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pelotas. 78p.
- Souza R.I.C., Riet-Correa F., Barbosa-Ferreira M., Brum K.B., Fernandes C.E. & Lemos R.A.A..2010. Intoxicação por *Brachiaria* spp. em bovinos no Mato Grosso do Sul. Pesq.Vet. Bras. v.30 n.12 p.1036-1042.
- Smith B.P. & Magdasian K.G, 2015, Alterations in alimentary and hepatic function. In: Smith B.P., Large animal internal medicine. 5th. Elsevier. St. Louis. Missouri, p. 88-105.
- Stockham, S. L & Scott. M.S, 2011. Enzimas. In Stockham, S. L & Scott. M.S, Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. P 552-545.
- Tokarnia C.H., Canella C.F.C. & Döbereiner J. 1960. Intoxicação experimental pela fava “Timbaúba” (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.) em bovinos. Arquivos do Instituto Biológico v.3 n.3 p.81.
- Tokarnia C.H., Dobereiner J., Dutra I.S., Chagas B.R., França T.N. & Brust L.A.G. 1999. Experimentos em bovinos com favas de *Enterolobium cortortisiliquume E. timbouvapara* verificar propriedades fotossensibilizantes e/ou abortivas. Pesq. Vet. Bras. v.19 p.39-45.
- Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas que afetam o trato digestório. In. Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p.139-144.

ARTIGO**Ingestão de frutos de *Enterolobium contortisiliquum* causa fotossensibilização hepatógena em bovinos**

Paula V. Leal, Rayane C. Pupin, Stephanie C. Lima, Gleice Kelli A. Melo, Marcelo A. Araújo, Danilo C. Gomes, Claudio S. L. Barros, Ricardo A.A. Lemos

Ingestão de frutos de *Enterolobium contortisiliquum* causa fotossensibilização hepatógena em bovinos

Paula V. Leal^{a*}, Rayane C. Pupin^a, Stephanie C. Lima^b, Gleice Kelli A. Melo^a, Marcelo A. Araújo^c, Danilo C. Gomes^c, Claudio S. L. Barros^c, Ricardo A.A. Lemos^c

Leal P.V.^{a*}, Pupin R.C.^a, Lima S.C.^b, Mello G. K. A.^a, Araújo M. A.^c, Gomes D.C., Barros. C. S.L.& Lemos, R. A. A.^c

^aPrograma de pós graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Av. Senador Felinto Muller,2443, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil

^bPrograma de pós graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Av. Senador Felinto Muller,2443, Campo Grande, MS, 79070-900, Brazil

^cFAMEZ, UFMS, Campo Grande, MS, Brazil

* Autor para correspondência

Endereços de email:paulavleal@hotmail.com (Leal, P.V.)*, rayane.pupin@gmail.com (Pupin, R.C.), stephanie_k_lima@hotmail.com (Lima, S, C), gleiceayardes@gmail.com (Melo, G. A.) marcelo.augusto@ufms.br (Araújo, M.A.),danilo.gomes@ufms.br (Gomes, D.C.) claudioslbarros@uol.com.br(Barros, C.S.L) ricardo.lemos@ufms.br (Lemos R. A. A)

RESUMO

Enterolobium contortisiliquum (Leg. Mimosoidae) é uma planta toxica responsabilizada por quadros de fotossensibilização e fotodermatite, distúrbios digestivos e abortos. Até o momento a reprodução clínica de fotossensibilização não foi reproduzida ou apenas foi relacionada a apresentações muito discretas. O objetivo deste estudo foi reproduzir em bovinos o quadro clinico patológico de fotossensibilização associada a ingestão de favas de *E. contortisiliquum*. Os frutos foram coletados de uma propriedade com histórico de surtos de fotossensibilização e aborto em bovinos. Seis bovinos de 24 meses de idade, canulados foram utilizados no experimento, sendo destes dois utilizados como controle negative. Os frutos foram administrados por via intrarruminal. Na primeira fase so experimento doses diárias de 30g/kg/PV e 20g/kg/PV foram administradas aos bovinos 1 e 2 respectivamente, por três dias consecutivos. Na segunda fase, iniciada após quatro dias após o último dia que os bovinos receberam a planta, estes foram desafiados com a mesma dose e outros dois (Bovinos 3 e 4) receberam doses 15g/kg/PV, todos por três dias consecutivos. Nas duas fases os bovinos apresentaram sinais clínicos compatíveis com

acidose ruminal, sendo mais graves os quadros na segunda fase do experimento. Três e cinco dias após o término da administração dois bovinos apresentaram sinais de fotossensibilização, caracterizados por hiperemia e edema da pele do dorso do pescoço, na pele tricotomizada ao redor da cânula, na mufla e na orelha. As lesões evoluíram para necrose da pele, com posterior desprendimento, retração cicatricial e espessamento da pele. Ulceração da mucosa exposta ao sol foi observada. Todos os bovinos que receberam frutos tiveram alterações significativas de gama-glutamil transferase (GGT) e aspartato-amino transferase (AST). Os valores mantiveram-se elevados por até 12 dias após a administração da planta. Alterações histopatológicas hepáticas detectadas por biópsias hepáticas foram tumefação e necrose hepatocelular individual aleatória e multifocal. O presente estudo apresenta confirmação experimental de que a ingestão de *E. contortisiliquum* induz lesões de fotossensibilização hepatogênica em bovinos.

Palavras chaves: doenças de ruminantes, plantas tóxicas, fotodermatite, *Enterolobium contortisiliquum*.

ABSTRACT

Enterolobium contortisiliquum (Leg. Mimosoidae) is reported as a poisonous plant related to photosensitization and photodermatitis, digestive disturbs and abortion. To date, the clinical and pathological features of photosensitization has not been reproduced or only reproduced associated with very mild presentations. The objective of this study was to reproduce in cattle the clinicopathological features of photosensitization associated with the ingestion of the pods of *E. contortisiliquum*. The pods were harvested from a property with a history of an ongoing outbreak photosensitization and abortion in cattle. Six 24-month steers were cannulated and used in the experiment, two of them served as negative controls. *E. contortisiliquum* pods were administered to four steers through ruminal cannula. In the first phase of the experiment, daily doses of 30 g/kg/body weight (bw) and 20g/kg/bw were administered to Bovines 1 and 2 respectively, for three consecutive days. In the second phase, starting four days after the last daily feeding of the pods, these two bovines were challenged with the same doses of the pods for three consecutive days and another two steers (Bovines 3 and 4) were fed 15g/kg/bw each for three consecutive days. In the two phases, the steers developed signs compatible with ruminal acidosis which were more severe during the second phase. Three and five days

after the administration of the pods, two steers presented photodermatitis characterized by hyperemia and edema on the skin of the dorsum of the neck, of the shaved skin around the cannula, of muzzle and ear. Lesions evolved to dermal necrosis with sloughing and subsequent scar retraction and dermal thickening. Ulceration of mucosae exposed to sunlight was also observed. All the steers which received the pods had significant elevations in the serum activities of gamma-glutamyl transferase (GGT) and aspartate aminotransferase (AST). The levels of GGT and AST remained elevated for up to 12 days after the administration of the pods was discontinued. Histopathological hepatic changes detected by liver biopsies were hepatocellular swelling and randomly scattered individual hepatocellular necrosis. The current study presents solid experimental evidence that the ingestion of *E. contortisiliquum* definitely induces the classical lesions of hepatogenous photosensitization in cattle.

Key words: Diseases of ruminants, poisonous plants, photodermatitis, *Enterolobium contortisiliquum*

1. Introdução

Enterolobium contortisiliquum (Leg. Mimosoideae) é uma árvore amplamente distribuída no Brasil e conhecida por vários nomes populares como timbaúva, timbaúba, tamboril, tamboril-da-mata (Tokarnia, et al 2012), ximbuva (Purisco&Lemos, 2008). A planta é utilizada com diversos fins na indústria madeireira e para recuperação as florestas degradadas. Embora as vagens de *E. contortisiliquum* sejam supostamente utilizadas como forragem para gado (Braga 1960) casos fatais de intoxicação espontânea são associados a ingestão dos frutos (Tokarnia et al., 2012). Sinais digestivos agudos, abortos e fotossensibilização em bovinos são reportados em bovinos naturalmente intoxicados (Tokarnia, 1960; Purisco et al., 1998; Dantas 2001; Grecco et al., 2002; Medeiros et al., 2004; Dias et al., 2011; Mendonça et al., 2009; Shons, 2011; Bezerra et al., 2012; Olinda et al., 2015) e abortos foram reproduzidos em cobaias (Bonel-Raposo et al., 2008), porém não em outras espécies. Estas plantas contém altas doses de carboidratos altamente fermentáveis (Bacha et al., 2016) e ovelhas que ingerem altas doses de frutos desenvolvem acidose ruminal fatal (Pupin et al., 2017). No entanto, apenas a fotodermatite leve foi reproduzida em bovinos experimentalmente intoxicados com as favas de *E. contortisiliquum* (Purisco et al., 1998, Grecco et al., 2002, Shons, 2011). Com

base nisso, a capacidade de *E. contortisiliquum* causar a fotodermatite hepatógena, comumente observada em intoxicações espontâneas são contestadas.

Nossa hipótese é que o desenvolvimento da fotossensibilização relatada nos casos espontâneos ocorreria em ruminantes que não se desenvolveram ou se recuperaram de acidose ruminal aguda. Portanto o objetivo deste estudo foi estabelecer os aspectos clinicopatológicos das lesões hepáticas e da fotossensibilização hepatógena por meio da administração intrarruminal de frutos de *E. contortisiliquum*, mediante controle da acidose láctica ruminal aguda em bovinos.

2. Material e métodos

Seis bovinos de 24 meses, sem raça definida, identificados pelos números 1-6 foram canulados e utilizados no experimento, dois deles utilizados como controles negativos. Os controles foram mantidos com os outros quatro novilhos. Todos os novilhos tiveram acesso livre à água, feno de Tifton, sal mineral e 1,2% PV de ração concentrada, durante todo o período experimental. Os novilhos foram mantidos no curral durante o período do experimento e posteriormente soltados em área cercada, mantidos sob as mesmas condições. Os frutos foram colhidos de uma propriedade com histórico de surto de fotossensibilização e aborto em bovinos. Uma amostra da planta foi enviada à Universidade Federal do Mato Grosso do Sul para identificação e arquivada sob o protocolo no herbário da UFMS-CG/MS 44247. Antes da administração, os frutos foram quebrados manualmente em pequenos pedaços e administrados através da cânula ruminal para os bovinos 1-4.

O experimento foi dividido em duas fases. Na primeira fase foram administradas doses diárias de 30g/kg/ PV (peso vivo) e 20 g/kg/PV durante três dias consecutivos, respectivamente, aos bovinos 1 e 2. A segunda iniciou após 4 dias da última administração da planta aos bovinos 1 e 2. Nessa fase, os bovinos 1 e 2 receberam as mesmas doses de frutos de *E. contortisiliquum* pelo mesmo período da fase 1. Adicionalmente, dois novilhos (bovinos 3 e 4) foram alimentados cada 15 g / kg / pv dos frutos durante três dias (Tabela 1).

Diariamente, às 8h, foram avaliados os seguintes parâmetros para os seis bovinos: pH ruminal, utilizando um medidor de pH eletrônico, coloração de mucosas e motilidade, frequências cardíacas e respiratórias. Foi realizada coleta de sangue a partir da veia jugular para a determinação das atividades séricas de gamma-glutamil transferase (GGT)

e aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina. Para comparação, o sangue dos animais controles e dos quatro novilhos experimentais foi colhido imediatamente antes da primeira dose administradas (dia zero [D0]) e após diariamente durante 33 dias.

As biópsias hepáticas foram realizadas com uma agulha de Menghini, guiada por ultrassom, nos seis bois apenas no D0 e, em seguida, repetidas nos quatro novilhos que receberam os frutos nos D7 e D14. A agulha de biópsia foi inserida no 11º espaço intercostal onde um quadrado de 10x10cm na pele foi previamente tricotomizado e anestesiado com cloridrato de lidocaína (Xilestesin2%®).

Para avaliar a ocorrência de lesões cutâneas características de fotossensibilização, isto é hiperemia e edema que evoluíram para necrose dérmica com desprendimento e posterior retração cicatricial e espessamento dérmico, os bovinos foram avaliados diariamente três vezes ao dia. Foi também observada ulceração das mucosas expostas aos raios solares. As lesões foram classificadas em discretas, moderada e graves, de modo que lesões discretas se restringem a sinais brandos de fotodermatite até lesões graves que seriam assim classificados em casos de morte ou necessidade de eutanásia *in extremis*.

Os novilhos que desenvolveram uma redução de pH para $\leq 5,5$ associada a sinais clínicos de acidose láctica ruminal descritos anteriormente (Pupin et al., 2017) foram tratados com NaHCO_3 1 g/kg/PV através da cânula ruminal.

Este experimento foi aprovado pelo Comitê Ético de Uso Animal em experimentos da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, sob o protocolo 731/215-CEUA / UFMS.

3. Resultados

Na primeira fase do experimento, os bovinos que receberam os frutos apresentaram hipotonia ruminal, diarreia esverdeada e fétida, queda no pH ruminal e elevação significativa nas atividades séricas de AST (Figura 1) e GGT (Figura 2). Os aumentos nas atividades séricas dessas enzimas estavam muito acima dos valores de referência para a espécie (Kaneko, et al., 2008) e os valores individuais no D0 nos controles. Esta é uma indicação confiável de insuficiência hepática.

Na segunda fase do experimento, os bovinos 1, 3 e 4 manifestaram sinais clínicos de acidose ruminal e necessitaram de tratamento intrarruminal com NaHCO_3 . Devido a sinais clínicos graves, o bovino 3 foi adicionalmente de tratamento com 10 ml de flunixin meglumine intramuscular e fluido ruminal diluído intrarruminal para melhorar os sinais de desidratação (Tabela 1). O tratamento foi introduzido com o objetivo de permitir que os bovinos se recuperassem da fase aguda da acidose ruminal, a fim de comprovar nossa

hipótese mencionada na Introdução. Após os distúrbios digestivos terem diminuído, os novilhos foram mantidos em um piquete, exposto à luz solar e continuaram a ter acesso livre à água, feno Tifton, minerais e de concentrado na proporção de 1,2% do peso corporal.

Três a seis dias após a recuperação da acidose ruminal, os bovinos 2 e 3 desenvolveram fotodermatite caracterizada por hiperemia e edema da pele do dorso do pescoço, do focinho (Figura 3), da área da pele quadrada raspada no local da biópsia hepática (Figura 4) e da pele ao redor da cânula e da ponta das orelhas (Figura 5). As lesões evoluíram para necrose dérmica com desprendimento e posterior retração cicatricial e espessamento dérmico (Figura 6). O bovino 1 desenvolveu icterícia discreta. O aumento das atividades séricas de GGT e AST foi observado a partir do D2 do experimento e permaneceu até D12 e os níveis normais foram atingidos apenas no D17. Não houve variação significativa nos níveis de ureia e creatinina. O soro dos quatro bovinos que receberam os frutos de *E. contortisiliquum* apresentaram índice icterico alto (Figura 7). As biópsias hepáticas revelaram tumefação e necrose hepatocelular individual aleatoriamente multifocal em todos os animais que receberam o fruto.

4. Discussão

A fotossensibilização hepatógena tem sido como associada a surtos espontâneos de intoxicação por *E. contortisiliquum* em ruminantes, mas foram geralmente discretas ou ausentes nos experimentos com *E. contortisiliquum* realizados em ruminantes. Nesses experimentos sobressaíram-se os distúrbios gastrointestinais (Tokarnia et al., 1999, Grecco et al. 2002, Shons, 2011, Pupin et al., 2017). Isso levantou dúvidas sobre as reais propriedades hepatotóxicas dos frutos de *E. contortisiliquum*. Recentemente, foi sugerido (Bacha et al., 2016) e posteriormente demonstrado (Pupin et al., 2017) pelo nosso grupo de pesquisa que os distúrbios gastrointestinais associados com *E. contortisiliquum* foram devidos a acidose ruminal aguda, geralmente fatal, tanto em intoxicações espontâneas quanto em experimentais. No presente experimento, nossa hipótese era de que somente os ruminantes que sobrevivessem à fase aguda da intoxicação (acidose ruminal), poderiam desenvolver uma segunda fase da intoxicação quando a fotossensibilização ocorre, uma vez que a fotossensibilização é de desenvolvimento tardio (Mauldin e Peters-Kennedy, 2016). Os bovinos do experimento que desenvolveram acidose ruminal foram tratados, permitindo assim o desenvolvimento dos sinais clínicos de fotossensibilização.

A elevação das atividades séricas de GGT e AST em todos os bovinos, exceto para os dois controles, é evidência aceita de insuficiência hepática. A insuficiência hepática associada a lesões hepáticas e a fotossensibilização hepatógena foi claramente demonstrada em dois bovinos que receberam os frutos de *E. contortisiliquum*. A degeneração hepatocelular difusa e a necrose prejudicam a excreção biliar em vários níveis resultando em colestase ou icterícia (Cullen e Stalker, 2016). O índice de icterícia acentuado encontrado no soro de 4 bovinos experimentais é indicativo de colestase. Adicionalmente, o bovino 2 tinha icterícia observada clinicamente. A colestase hepatocelular pode ser atribuída à diminuição da captação, metabolismo, secreção ou transporte de componentes biliares. A colestase obstrutiva relacionada à obstrução do fluxo biliar no nível dos principais ductos biliares ou vesícula biliar (Cullen e Stalker, 2016). É evidente que a patogênese da colestase nos bovinos deste experimento é do tipo hepatocelular.

A fotossensibilização hepatógena geralmente acompanha a colestase de mais de alguns dias de duração em herbívoros mantidos à luz do sol e ingerem forragem. Os catabólitos de porfirinas de plantas, isto é, as fitoporfirinas (anteriormente conhecidas como filoeritrinas), principalmente da clorofila, são geradas pela microflora alimentar, o absorvidas no intestino e normalmente excretadas na bile pelos mesmos transportadores que eliminam a bilirrubina (Cullen e Stalker, 2016). A lesão hepatocelular em herbívoros pode aumentar a retenção de fitoporfirina no sangue e deposição adicional nos tecidos, incluindo a pele, resultando em fotodermatite em áreas não pigmentadas da pele expostas aos raios solares por vários dias. Esta é a forma mais comum de fotossensibilização em herbívoros domésticos e ocorre associada a lesões hepatocelulares primárias (Mauldin e Peters-Kennedy, 2016) como foi o caso dos bovinos deste experimento.

As lesões macroscópicas descritas para a fotossensibilização são semelhantes às observados nos dois bovinos afetados deste experimento. As lesões ocorrem nas áreas da pele mais expostas à luz solar e protetor desprovidas da proteção dos pelos ou da pigmentação da pele. A pele relativamente sem pelos do focinho é frequentemente afetada (Mauldin e Peters-Kennedy, 2016). Isto pode ser observado nos bovinos que desenvolvem a dermatite de fotossensibilização neste experimento. É interessante notar que a fotodermatite com necrose dérmica e desprendimento da porção necrótica ocorreu como área quadrática geométrica focal que foi tricotomizada para a realização da biópsia hepática e consequentemente perda da barreira protetora de pelos.

Os vários relatos de surtos espontâneos em bovinos mencionam três apresentações clínicas: distúrbios alimentares, dermatite de fotossensibilização e abortos (Tokarnia, 1960, Purisco et al., 1998, Dantas et al., 2001, Grecco et al., 2002, Medeiros et al., 2004, Dias et al., 2008, Mendonça et al., 2009, Shons, 2011, Bezerra et al., 2012, Olinda et al., 2015). Demonstrou-se que os distúrbios alimentares foram devidos a altos teores de carboidratos dos frutos de *E. contortisiliquum*, resultando em acidose ruminal, que foi muitas vezes fatal (Bacha et al., 2016, Pupin et al. 2007).

Neste experimento, a fotossensibilização hepatógena foi determinada como sendo uma manifestação retardada nos ruminantes tratados para a fase aguda de acidose ruminal. Os abortos ainda restam para ser provados como parte da intoxicação pelos frutos *E. contortisiliquum*, pois foram reproduzidas somente em cobaias (Bonel-raposo, et al 2008).

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT / CNPq - Grant 15/2014 - PRONEM -MS - Grant 59 / 300.126 / 2015) e pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT / CAPES 05/2014 - PVMS - 59 / 300.032 / 2015).

Referências

- Bacha F.B., Pupin R.C., Leal P.V., Carvalho N.M., Franco G.L., Ítavo C.C.B.F., Riet-Correa F., Lemos R.A.A. 2016. Experimental intoxication by *Enterolobium contortisiliquum* in sheep. Pesq. Vet. Bras. (In Press)
- Bezerra, C.W.C., Medeiros, R.M.T., Rivero, B.R.C., Dantas, A.F.M., Amaral, F.R.C., 2012. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos na microrregião do Cariri Cearense. Ciencia Rural. 42, 1070 -1076
- Bonel-Raposo J., Riet-Correa F., Guim T.N., Schuch I.D., Grecco F.G. e Fernandes C.G. 2008. Intoxicação aguda e abortos em cobaias pelas favas de *Enterolobium contortisiliquum* (Leg. Mimosoideae). Pesq. Vet. Bras. 28:593-596.
- Braga R. 1960. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 2ª. ed. Imprensa Oficial, Fortaleza.

- Cullen, J.M., Stalker M.J. 2016. Hepatic dysfunction. In: Maxie, M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer, sixth ed. Vol. 2. Elsevier, St. Louis, pp. 290-295.
- Dantas A.F.M. 2001. Intoxicação por *Enterolobium contortisiliquum* em bovinos. 10º. Enapave, Pirassununga, SP.
- Dias A.C.S., Franklin F.L.A.A., Carvalho C.J.S., Fonseca L.S. & Silva M.M.S. 2011. Intoxicação experimental pelas favas de *Enterolobium* sp. em caprinos. Disponível em <http://leg.ufpi.br/20sic/Documentos/RESUMOS/Modalidade/Vida/dc5c768b5dc76a084531934b34601977.pdf>. Acesso dia 07/10/2015.
- Grecco F.B., Dantas A.F.M., Riet-Correa F., Leite C.G.D. & Raposo J.B. 2002. Cattle intoxication from *Enterolobium contortisiliquum* pods. Vet. Human Toxicol. 44:60-162.
- Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. 2008. Clinical biochemistry of Domestic Animals. 6th ed. Academic Press, San Diego. P.882-884.
- Mauldin E.A., J.M., Peters-Kennedy J. 2016. Photosensitization dermatitis. In: Maxie, M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer, sixth ed. Vol. 1. Elsevier, St. Louis pp. 578-295.
- Medeiros R.M.T., Riet-Correa F., Barbosa R.C., Lima E.F., Neto S.A., Tabosa I.M. 2004. Toxic plants for domestic animals in the state of Paraíba, Northeastern Brazil, In: Acamovic T., Stewart C.S., & Pennicott T.W. (Eds) Poisonous plants Toxicants. CAB international, Glasgow. p. 151-156.
- Mendonça, F.S., Evencio-Neto, J., Baratella-Evencio, L., Doria, R.G.S., Freitas, S.H., Pelegrini, L.F., Cruz, R.A.S., Ferreira, E.V., Colodel, E.M., 2009. Natural and experimental poisoning of cattle by *Enterolobium contortisiliquum* pods (Fabaceae Mimosoideae) in Central-Western Brazil. Acta Veterinaria 78, 621 - 625.
- Olinda R.G., Medeiros R.M.T., Dantas A.F.M., Lemos R.A.A. & Riet-Correa F. 2015. Intoxicação por *Enterolobium contortisiliquum* em bovinos na região Nordeste do Brasil. Pesq. Vet. Bras. 35:44-48.
- Pupin RC, Leal PV, Lima SC, Melo GKM, Pott A, Araújo MA, Barros CSL, Lemos R.A.A. 2017. *Enterolobium contortisiliquum* is a cause of acute ruminal acidosis in sheep. Tox. n.126 p.90-95
- Purisco E., Lemos R.A.A, Nakazato, L., Dutra I.S. 1998. Intoxicação por *Enterolobium contortisiliquum*, 307-315. In: Lemos R.A.A. (Ed.) Principais Enfermidades de Bovines de Corte do Mato Grosso do Sul. Reconhecimento e Diagnóstico. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

- Purisco E. & Lemos R.A.A. 2008. Plantas que causam fotossensibilização hepatógena,. In: Lemos R.A.A. & Leal C.R.B (Eds). Doenças de impacto econômico em bovinos de corte – perguntas e respostas. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. p.231-241.
- Schons S.V. 2011. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos na região central de Rondônia. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pelotas. 78p.
- Tokarnia C.H., Canella C.F.C. & Döbereiner J. 1960. Intoxicação experimental pela fava “Timbaúba” (*Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.) em bovinos. Arquivos do Instituto Biológico v3 p.3-81.
- Tokarnia C.H., Döbereiner J., Dutra I.S., Chagas B.R., França T.N. e Brust L.A.G. 1999. Experimentos em bovinos com favas de *Enterolobium contortisiliquum* E. timboubapara verificar propriedades fotossensibilizantes e/ou abortivas. Pesq. Vet. Bras. v.19 p.39-45.
- Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p.139-144

Legendas das Figuras

Figura 1. Atividades séricas de aspartato aminotransferase em quatro bovinos intoxicados com *Enterolobium contortisiliquum* e nos controles.

Figura 2. Atividades séricas de gamma-glutamil transferase em quatro bovinos intoxicados com *Enterolobium contortisiliquum* e nos controles.

Figura 3. Bovinos 3. Fotodermatite focal com necrose dérmica e descamação da porção necrótica do focinho. Áreas sem desprovidas de pelos são mais vulneráveis à ação dos raios solares.

Figura 4. Bovinos 2. Fotodermatite focal com necrose dérmica e descamação da porção necrótica na parede torácica lateral direita. O formato geométrico da lesão é devido à perda da proteção de pelo na área tricotomizada para a realização da biópsia hepática.

Figura 5. Bovinos 3. Lesão crônica. Cicatriz por fibrose causou retração da ponta da orelha, que apresenta espessamento dérmico dorsal.

Figura 6. Bovinos 3. Fotodermatite da pele da orelha. A porção necrótica da ponta da orelha é separada do tecido viável por área inflamada vermelha irregular. A porção necrótica é seca e de aspecto coriáceo. Esta porção eventualmente se desprende.

Figura 7. Soros bovinos. O soro de Bovino 3 (à direita) é marcadamente amarelo contrastando com o soro incolor do animal controle (à esquerda)

Tabela 1. Delineamento experimental e resultados obtidos

	Fase 1				Intervalo	Fase 2				
	Dose (g/kg/PV)	Dias	Dose total (g/kg)	Alterações		Dias	Dose total (g/kg)	Alterações	Tratamento	Evolução
Bovino 1	30	3	90	Diarreia, hipotonia ruminal, redução do pH elevações de GGT e AST	4	2	60	Diarreia, hipotonia ruminal, redução do pH elevações de GGTe AST	NaHCo3 (1g/kg)	
Bovino 1	20	3	60	Diarreia, hipotonia ruminal, redução do pH elevações de GGT e AST	4	3	60	Diarreia, hipotonia ruminal, redução do pH elevações de GGT e AST	Não foi tratado	Fotossensibilização (lesões leves na orelha, crostas no pescoço tórax e abdômen)
Bovino 3	15	-	-	-	-	3	45	Diarreia, atonia ruminal, desidratação acentuada, redução do pH elevações de GGT e AST	NaHCo3(1g/kg) + Flunexin meglumine	Fotossensibilização (ulceração na mufla, retração da ponta de orelha, crostas no pescoço e abdômen)
Bovino 4	15	-	-	-	-	3	45	Diarreia, hipotonia ruminal, redução do pH elevações de GGT	NaHCo3 (1g/kg)	

- Não receberam planta

Figura 1. Níveis séricos de Aspartato-aminotransferase

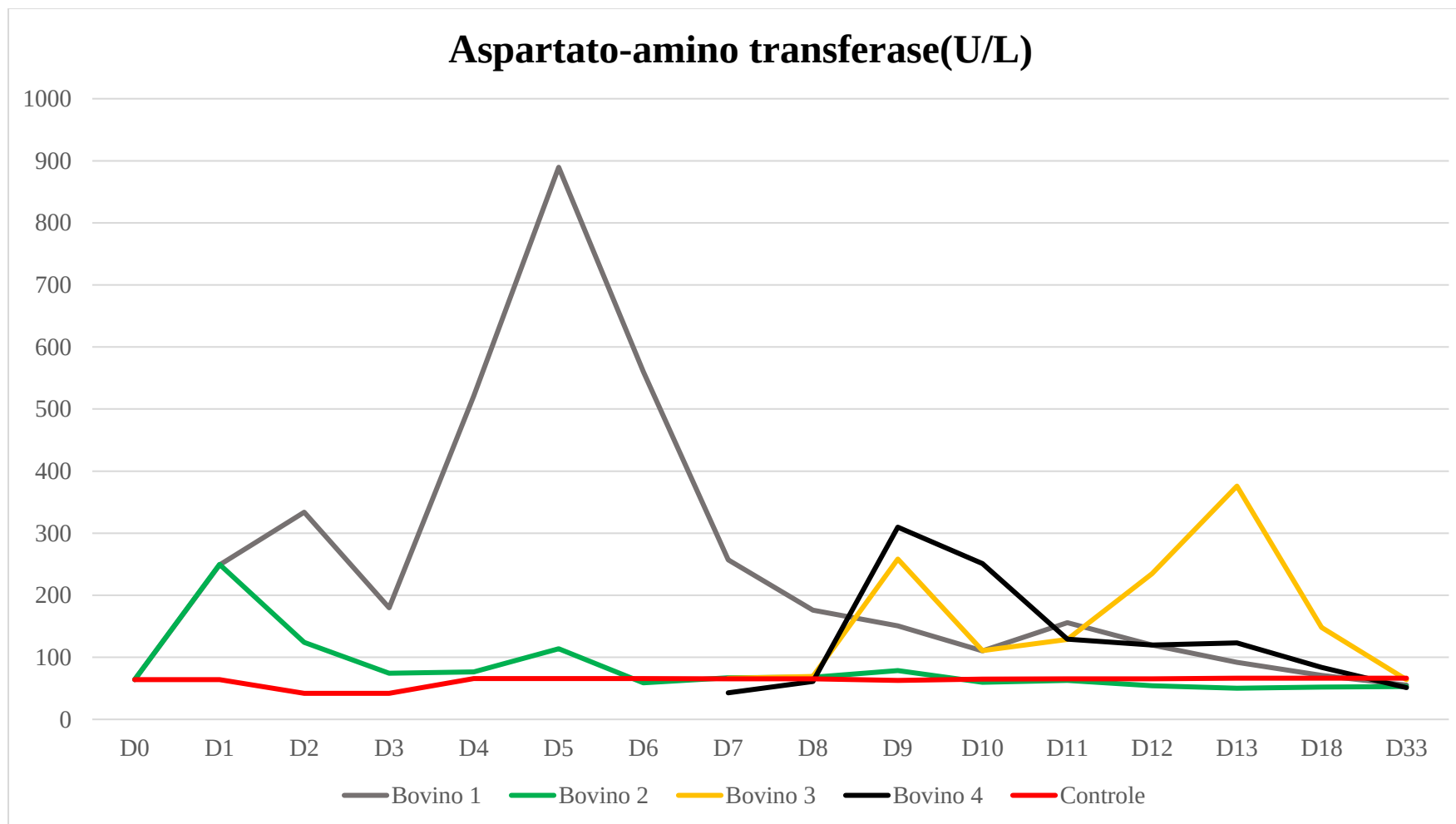


Figura 2- Níveis séricos de Gama-glutamilttransferase

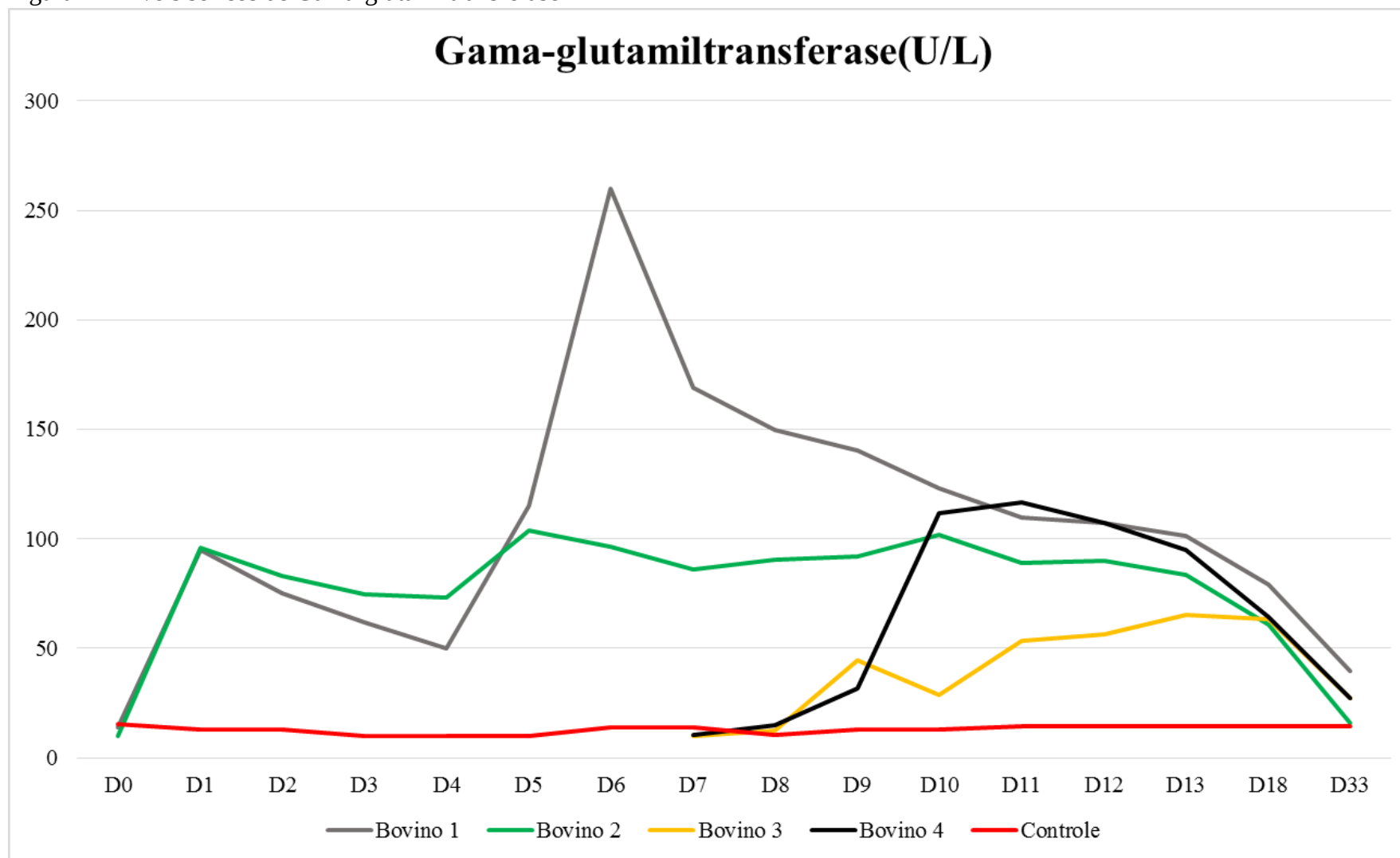


Figura 3

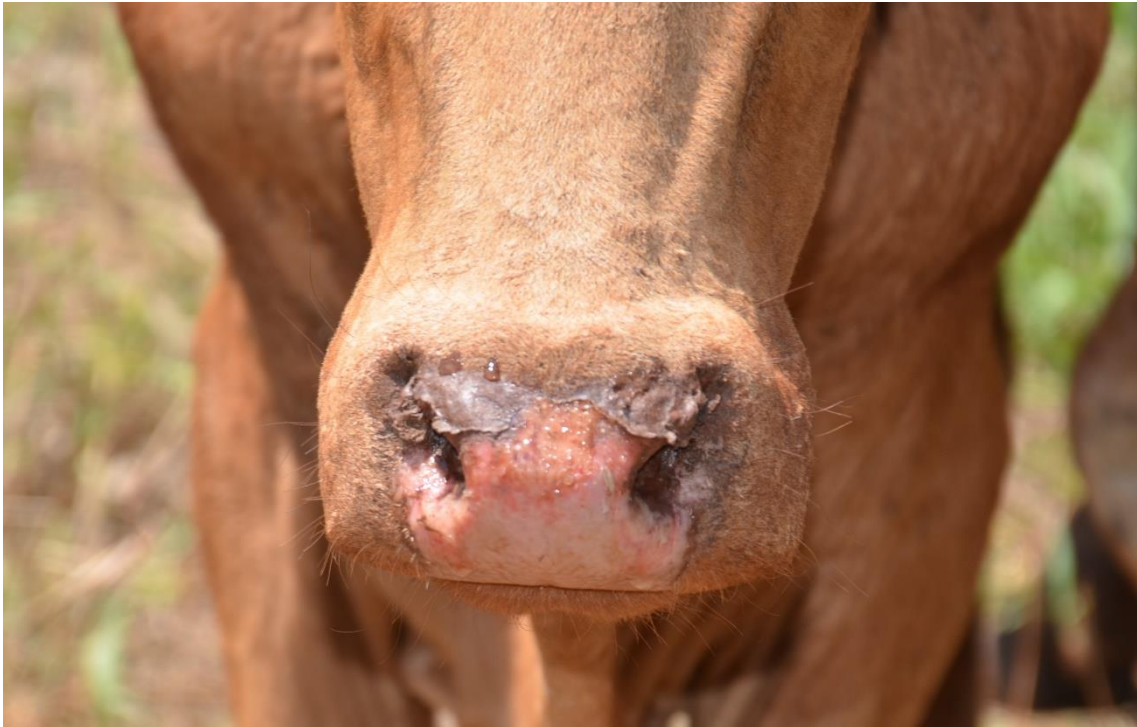


Figura 4



Figura 5



Figura 6



Figura 7





TOXICON

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

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.2
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.3
•	Guide for Authors	p.5



ISSN: 0041-0101

DESCRIPTION

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

To publish:

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

And

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

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

Types of paper

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

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

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

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

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

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

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

Classic Toxins: The main aim of these articles is to educate and inform both the experienced scientist and new scientists entering the field of toxinology. These articles should serve as a reference guide for anyone using toxins. Please contact Dr. Ed Rowan with your suggestions for inclusion in the 'classic toxins' feature.

AUDIENCE

Toxicologists, toxinologists, molecular biologists and chemists.

IMPACT FACTOR

2015: 2.309 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

ABSTRACTING AND INDEXING

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

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

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

Honorary Editors

Philip Rosenberg

Review Editor

Peter N. Strong, Sheffield, England, UK

Mini-Review Editors

Yara Cury, Lab. de Fisiopatologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brazil, 1500, 05503-900, São Paulo, Brazil

Raymond S. Norton, Medicinal Chemistry and Drug Action, Inst. of Pharmaceutical Sciences, Fac. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Monash University, Parkville Campus, 381 Royal Parade, Parkville, VIC 3052, Victoria, Australia

Classic Toxins Review Editor

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

Editorial Council

K. Aktories, Freiburg, Germany

I. Asuzu, Nsukka, Nigeria

G.L. Boyer, Syracuse, New York, USA

B.W. Brooks, Waco, Texas, USA

J.J. Calvete, Valencia, Spain

C.R. Carlini, Porto Alegre RS, Brazil

E.E. Creppy, Bordeaux Cedex, France

F. Ducancel, Gif-Sur-Yvette, France

M. Ederly, Paris Cedex 05, France

J.W. Fox, Charlottesville, Virginia, USA

P. Gopalakrishnakone, Singapore

J.M. Gutiérrez, San José, Costa Rica

R.A. Harrison, Liverpool, UK

W.C. Hodgson, Clayton, Victoria, Australia

R.J. Huxtable, Tucson, Arizona, USA

G.K. Isbister, Callaghan, New South Wales, Australia

M. Ismail, Cairo, Egypt

E. Kalapothakis, Belo Horizonte, MG, Brazil

W.R. Kem, Gainesville, Florida, USA

G.F. King, St. Lucia, Queensland, Australia

R.M. Kini, Singapore, Singapore

I. Krizaj, Ljubljana, Slovenia

M. Lazdunski, Valbonne, France

R.J. Lewis, St Lucia, Queensland, Australia

F.S. Markland Jr., Los Angeles, California, USA

M.-F. Martin-Eauclaire, Marseille, France

D. Mebs, Frankfurt, Germany

E. Moczydlowski, Albuquerque, New Mexico, USA

C. Montecucco, Padova, Italy

B.A. Neilan, Sydney, New South Wales, Australia

G.M. Nicholson, Sydney, Australia

B.M. Olivera, Salt Lake City, Utah, USA

S. Pflugmacher, Berlin, Germany

M.A. Poli, Ft. Detrick, Maryland, USA

L.D. Possani, Cuernavaca, Mexico

S.M.T. Serrano, Sao Paulo, Brazil

W.T. Shier, Minneapolis, Minnesota, USA

K. Sivonen, Helsinki, Finland

T. Tamiya, Tokyo, Japan

A. Tubaro, Trieste, Italy

J. Tytgat, Leuven, Belgium

D.A. Warrell, Oxford, UK

J. White, North Adelaide, South Australia, Australia

Y. Zhang, Kunming, China

R.B. Zingali, Rio de Janeiro, Brazil

International Society on Toxinology

Secretary-Treasurer

Professor Julian White, Toxinology Department, Women's & Children's Hospital; North Adelaide SA 5006, Australia; www.toxinology.org; Phone: +(61)(0)8-8161 7000, Fax: +(61)(0)8-81618024

GUIDE FOR AUTHORS

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

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

To publish:

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

And

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

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

Types of paper

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

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

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

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

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

There is another category of review articles which aims to educate and inform both the experienced scientist and new scientists entering the field of toxinology. These articles should serve as a reference guide for anyone using toxins. Please contact Dr. Ed Rowan with your suggestions for inclusion in this review article feature.

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

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)
- Relevant declarations of interest have been made
- 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 pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Conflict of Interest

Toxicon follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission: All third-party financial support for the work in the submitted manuscript. All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript. All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission. Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported. Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued). Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.

As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org>. The form for conflict of interest disclosure

can be downloaded [here](#), or at http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from the popup menu.)

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy 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 [CrossCheck](#).

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.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

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.

Funding Body Agreements and Policies

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

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

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

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3300**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public

access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

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 WebShop.

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.

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

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 layout 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 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

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

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

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced and has consecutive line numbering– this is an essential peer review requirement.

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.

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.

Article structure

Subdivision - numbered sections

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

Introduction

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

Material and methods

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

Experimental

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

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. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-

case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that 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.

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

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

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

Highlights

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

Keywords

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

Abbreviations

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

Acknowledgements

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

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.

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 encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. 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*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. 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](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor 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.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/toxicon>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

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 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 should be listed first alphabetically, then chronologically.

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

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

Examples:

Reference to a journal publication:

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

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

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. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

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

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 files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. 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.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly

as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

RESEARCH DATA

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, *Data in Brief*. 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.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). [More information and a full list of supported databases](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

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 WebShop](#). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>