



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**Ana Janaina Jeanine Martins de Lemos**

**Respostas da interação blastocisto-endométrio, fertilidade, fígado,  
rins e pulmões a doses subletais de formulações de inseticidas de  
origem biológica e sintética**

**Recife**

**2010**

**ANA JANAINA JEANINE MARTINS DE LEMOS**

**“Respostas da interação blastocisto-endométrio, fertilidade, fígado, rins e pulmões a doses subletais de formulações de inseticidas de origem biológica e sintética”**

**Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia.**

**Orientadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Wanderley Teixeira**

**Co-orientadores:**

**Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira**

**Prof. Dr. José Vargas de Oliveira**

**RECIFE**

**2010**

Ficha catalográfica

L557r Lemos, Ana Janaina Jeanine Martins de  
Respostas da interação blastocísto-endométrio, fertilidade,  
fígado, rins e pulmões a dose subletais de formulações de  
inseticidas de origem biológica e sintética / Ana Janaina Jeanine  
Martins de Lemos. -- 2010.  
93 f. : il.

Orientadora: Valéria Warderley-Teixeira.  
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de  
Morfologia e Fisiologia, Recife, 2010.  
Inclui referências e anexo.

1. Inseticida sintético 2. *Bacillus thuringiensis*  
3. Reprodução 4. Histologia 5. Fertilidade 6. Rata I. Warderley-  
Teixeira, Valéria, orientadora II. Título

CDD 591.824

**ANA JANAINA JEANINE MARTINS DE LEMOS**

**“Respostas da interação blastocisto-endométrio, fertilidade, fígado, rins e pulmões a doses subletais de formulações de inseticidas de origem biológica e sintética”**

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA:

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Wanderley Teixeira (Orientadora) - UFRPE**

---

**Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE**

---

**Prof. Dr. Herbert Álvaro Abreu de Siqueira- UFRPE**

---

**Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia - UFRPE**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, sobretudo, a Deus que sempre olhou por mim, por ter concedido saúde e boa educação familiar, possibilitando a minha constante formação pessoal, tendo desafios, decepções e alegrias, e reconhecendo todo meu esforço, me abençoando, colocando em meu caminho as barreiras necessárias para que eu buscasse pessoas maravilhosas que não hesitaram em me ajudar. Assim construíram-se boas amizades as quais cultivarei sempre, com muita alegria;

Agradeço a minha família, em especial minha mãe Ana Cristina, por ter sido sempre muito incentivadora de meus estudos e por ter me dado apoio e estímulo nos momentos de maior dificuldade, ao meu namorado por ter me alegrado e abdicado de finais de semana de festas, viagens, sempre muito compreensivo e à Dona Anita e demais familiares por terem sempre acreditado em meu potencial;

À minha segunda mãe, “que a primeira não tenha ciúmes”, professora Valéria, e ao professor Álvaro, meus orientadores, por terem sido sempre preocupados e acolhedores, tendo firmeza e segurança na condução do meu caminho acadêmico, e às vezes pessoal, fazendo com que eu produzisse com qualidade e estivesse sempre me superando, melhorando e crescendo. Graças a vocês estou atingindo meus objetivos e alcançando meus sonhos, serei eternamente grata por tudo, principalmente pelo carinho, consideração e amizade;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, por ser uma extensão de minha casa, ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal e todos os seus professores componentes, por terem sido sempre atenciosos com seus alunos, carinhosos, dispostos e prestativos, ao Departamento de Controle e Registro Acadêmico (DRCA) por estar sempre com suas portas abertas;

Ao Programa Conexões de Saberes e à Pró-reitoria de Atividades de Extensão por ter concedido bolsa acadêmica e por ter sido sempre compreensiva às minhas prioridades, e por ter proporcionado experiências de trabalho fundamentais ao meu crescimento pessoal quanto a valores e princípios morais, além de ter dado a mim, convívio a pessoas maravilhosas, como os professores Alexandre Tenório e João Moraes, e aos queridos Jacineide Arcanjo, Joseane Dourado, Thiago Sousa, Cláudio Castro, João Gonçalves, Aldenise Curvelo, José Brito entre outros integrantes do Programa;

Agradeço com muito respeito, carinho e admiração aos professores Gabriel Rivas de Melo, (Departamento de Estatística e Informática), Frederico C. Lyra Maia (Dep. de medicina Veterinária) e Herbert Álvaro A. de Siqueira (Dep. de Agronomia) por terem sido sempre muito atenciosos e dispostos em vários momentos não medindo esforços em ajudar;

Aos meus amigos do Laboratório da Área de Histologia pelo carinho e por terem sempre proporcionado muita descontração, além de palavras de torcida, como as ditas por Fernanda Silva, Franklin Magliano, Hilda Michelle, Thiago, Lílian, Ana Cláudia, Paulo Estevão, dentre outros, as inesquecíveis, Andresa Oliveira, Raiana Cabral, vocês são pessoas incríveis. Agradecimentos também a Marcos André pelo auxílio com os animais do Biotério do DMFA e a todos do meu convívio que interferiram direta ou indiretamente para o bom desenvolvimento de minhas atividades acadêmicas.

## RESUMO

A utilização de inseticidas microbianos, como uma alternativa ao uso de inseticidas sintéticos vem sendo ampliada, devido à baixa persistência no ambiente e a segurança aos organismos não-alvos, como mamíferos, pássaros, anfíbios e répteis. Porém, experimentos revelaram que as toxinas protéicas da bactéria *Bacillus thuringiensis* podem causar hipersensibilidade em alguns órgãos, como rins, fígado e pulmões, além de interferirem de maneira diferente em ratos machos e fêmeas. No entanto, são poucos os trabalhos que mostram os efeitos de doses subletais de inseticidas sintéticos sobre o aparelho reprodutor feminino e praticamente não há relatos sobre os efeitos dos inseticidas biológicos em mamíferos, principalmente em relação à histofisiologia reprodutiva. Assim, resolveu-se testar a hipótese se a administração dos inseticidas XenTari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*) e deltametrina (Decis® 25CE), em concentrações que não apresentem sinais clínicos de intoxicação materna, pode interferir na interação blastocisto-endométrio e afetar órgãos maternos em ratas albinas. Foram utilizadas 70 ratas albinas, *Rattus norvegicus albinus* divididas aleatoriamente em 14 grupos cada um constituído por cinco animais. Os animais foram submetidos a concentrações subletais do inseticida sintético, nas doses de 1, 2 e 4mg/Kg de deltametrina-(Decis® 25CE) e do inseticida biológico nas doses de 18,5, 185 e 370mg/100g do XenTari® WG. Os resultados revelaram que as ratas submetidas às maiores dosagens de ambos os inseticidas mostraram redução significativa do número de sítios implantados, alterações histopatológicas nesses sítios, caracterizadas pela presença de células trofoblásticas vacuolizadas, raros citotrofoblastos, acentuado infiltrado leucocitário, degeneração da região da decídua, além da presença de sangue no lúmen uterino. Histoquimicamente as decíduas dessas ratas apresentaram-se mais fibrosas, principalmente nas ratas tratadas com a maior dosagem do inseticida biológico. Nos órgãos maternos, observaram-se alterações histopatológicas nos rins, principalmente deposição de hemossiderina, necrose e degeneração vacuolar dos túbulos contorcidos e ductos coletores, além de glomerulonefrite; no fígado, reação de células de Kupffer e degeneração vacuolar dos hepatócitos; nos pulmões, peribronquiolite, perivascularite e pneumonia multifocal. Dessa forma, conclui-se que doses subletais do inseticida XenTari® produz

alterações qualitativas e quantitativas na interação endométrio-blastocisto, e nos órgãos maternos em ratas albinas, semelhantemente a doses subletais do inseticida deltametrina, geralmente envolvendo processos inflamatórios, comprometendo inclusive, o processo de implantação.

PALAVRAS-CHAVE: inseticida sintético; *Bacillus thuringiensis*; reprodução; histopatologia; fertilidade, rata.



## ABSTRACT

The use of microbial insecticides as an alternative to the use of synthetic insecticides has been increased due to the low environmental persistence and security to non-target organisms such as mammals, birds, amphibians and reptiles. However, experiments showed that the protein toxins of the bacterium *Bacillus thuringiensis* cause hypersensitivity in some organs such as kidneys, liver and lungs and differently interfere in male and female rats. However, few studies have shown the effects of sublethal doses of synthetic insecticides about female reproductive system and almost no reports on the effects of biological insecticides in humans, mainly related to reproductive histophysiology. So, decided to test hypothesis whether the administration of pesticides XenTari<sup>®</sup> WG (*Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai*) and deltamethrin (Decis<sup>®</sup> 25CE), at concentrations that do not show clinical signs of maternal intoxication, possibly interfere with blastocyst-endometrial interaction and organs maternal albino rats. We used 70 albino rats, *Rattus norvegicus albinos* randomly divided into 14 groups each consisting of five animals. The animals were subjected to sublethal concentrations of synthetic insecticide, in doses of 1, 2 and 4 mg/kg of deltamethrin-(Decis<sup>®</sup> 25CE) and biological insecticide in doses of 18.5, 185 and the 370mg/100g XenTari<sup>®</sup> WG. The results showed that the rats undergone highest doses of both insecticides showed significant reduction in the number and histopathological changes of sites deployed, characterized by the presence of vacuolated trophoblast cells, cytotrophoblasts rare, leukocyte infiltration, degeneration in the region decidua, and presence of blood in the uterine lumen. Histochemically the uterus' decidua rats showed more fibrous, especially in rats treated with highest dosage of the biological insecticide. In the mother's organs were observed histopathological changes in kidneys showing mainly hemosiderin deposition, necrosis and vacuolar degeneration of convoluted tubules and collecting ducts, and glomerulonephritis; liver, reaction of Kupffer cells and vacuolar degeneration of hepatocytes; lung, peribronchiolite, perivascularitis and multifocal pneumonia. Thus, it is concluded that sublethal doses of insecticide XenTari<sup>®</sup> produces qualitative and quantitative changes in endometrial-blastocyst interaction, and maternal organs similarly to sublethal doses of deltamethrin, usually involving inflammatory processes, including undermining the process of deployment albino rats.

KEYWORDS: synthetic insecticide, *Bacillus thuringiensis*; reproduction; histopathology; fertility; rat.

## SUMÁRIO

Capítulos		Pág.
1	INTRODUÇÃO.....	11
	REFERÊNCIAS.....	16
2	Resposta da interação blastocisto-endométrio em ratas albinas frente a doses subletais de inseticidas biológico e sintético .....	20
	RESUMO.....	20
	INTRODUÇÃO.....	21
	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
	RESULTADOS.....	26
	DISCUSSÃO.....	28
	REFERÊNCIAS.....	32
3	Toxicidade de doses subletais do <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Aizawai</i> e do inseticida deltametrina sobre a fertilidade e órgãos de ratas albinas prenhas.....	43
	RESUMO.....	43
	INTRODUÇÃO.....	44
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
	RESULTADOS.....	48
	DISCUSSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	56
	ANEXOS.....	67

(Norma da **Placenta**, ISSN: 0143-4004)

(Norma da **Clinica Chimica Acta**, ISSN:0009-8981)

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

Dentre os vários inseticidas sintéticos atualmente utilizados, podem-se citar os piretróides, os organofosforados e os carbamatos. São compostos lipofílicos amplamente utilizados no controle de pragas agrícolas e de interesse médico-veterinário. A exposição a esses produtos se dá pelos alimentos contaminados com resíduos tóxicos e, ainda, pela absorção dérmica e respiratória (CANTARUTTI, 2005).

Por serem considerados menos tóxicos para o homem que os inseticidas organoclorados e organofosforados, os piretróides têm múltiplas funções de uso na agricultura, na medicina veterinária, no controle de pragas domésticas e na saúde pública, principalmente para controle de vetores (BARLOW et al., 2001). Os piretróides pertencem a um grupo de inseticidas considerado moderno, pouco tóxico ao homem e muito eficiente no controle dos insetos. Tem notável efeito repelente o que inviabiliza, de certo modo, o seu uso na forma de isca (BOTTON, 2000).

Baseado na estrutura química e nos sinais e sintomas de intoxicação em animais, os piretróides sintéticos podem ser divididos em duas classes: piretróides do tipo I e do tipo II (WHO, 1990; RAY; FRY 2006). Em ratos, os compostos do tipo I provocam um quadro de agressividade, prostração, incoordenação e tremores, conhecido como “Síndrome T”. Os piretróides do tipo II provocam movimentos irregulares dos membros, contorções, salivações profusas e convulsões, que caracterizam a “Síndrome CS” (ECOBICHON, 1996; BURR; RAY 2004; ANADÓN et al., 2006).

Reys (2001) detalhou os efeitos de alguns inseticidas e mencionou que a deltametrina (piretróide do tipo II) teve efeito na função placentária e desregulou os anti-androgênicos. Braguini (2005) administrando doses de 0; 1,0; 2,0; e 4,0mg/kg de deltametrina em ratos verificaram uma diminuição do consumo de oxigênio nas mitocôndrias hepáticas e interferência no potencial elétrico da membrana desta organela. Já Andrade et al. (2002) observaram que

doses de 4,0mg/kg de deltametrina em ratos causa em machos adultos redução do peso do testículo, epidídimo e da produção espermática.

Existem também vários trabalhos de avaliação de risco tóxico de alguns inseticidas ao homem e toxicidade (hepatotoxicidade, carcinogênese, mutação) em ratos e outros animais (CALDAS; SOUZA 2000; CASTILLO et al., 2002; ANDERSEN et al., 2002); também foram mencionadas anormalidades ligadas ao sistema reprodutivo, em seres humanos, como aumento do número de casos de abortos, redução da libido, prejuízos na produção espermática, impotência, assim como maior incidência de tumores de testículo, próstata e mama (BAKER, 2001; SULTAN et al., 2001; GARRY et al., 2002).

Além dos inseticidas químicos empregados, o controle biológico tem assumido importância cada vez maior, devido à ênfase que vem sendo dada para a redução do uso de agrotóxico. Isto tem sido motivado por fatores econômicos que pressionam as indústrias, e pela preocupação do público em geral quanto aos efeitos danosos que alguns agrotóxicos têm apresentado (CAPALBO, 1998).

Dentre os microorganismos utilizados no controle biológico estão os fungos, bactérias e vírus, que podem ser cultivados em laboratório ou em escala industrial, já havendo disponibilidade de algumas formulações comerciais (BARRETO, 2005), como as à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), a qual é obtida através de processos fermentativos controlados em grande escala (MOINO JUNIOR, 2003).

*B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, aeróbia e formadora de esporos (ARONSON, 1994). Durante a fase de esporulação, sintetiza  $\delta$ -endotoxinas que são depositadas como inclusões intracelulares de geometria diversa e que são potencialmente tóxicas para mais de 18 espécies de insetos de importância agrícola (AUDTHO et al., 1999). Seu uso como bioinseticida tem várias vantagens, como a possibilidade de mesclar cepas com  $\delta$ -endotoxinas que reconhecem receptores diferentes, e desta forma, a probabilidade de seleção de populações resistentes em curto prazo diminui, consideravelmente (SIVASUPRAMANIAM et al., 2000). Além disso, essa bactéria vem sendo utilizada para controle de larvas de insetos vetores em

áreas de mananciais (BOISVERT; BOISVERT, 2000; ÖSTMAN; LUNDSTRÖM; PERSSON VINNERSTEN, 2008; TILQUIN et al., 2008)

O *Bt* tem como principal característica a produção de cristais inseticidas durante sua esporulação. Estes cristais são compostos por uma ou várias proteínas Cry ou Insecticidal Crystal Proteins (ICPs), codificadas por diferentes genes, os quais conferem ação tóxica de *Bt* ( $\delta$ -endotoxinas) a insetos de diversas ordens, principalmente Lepidoptera, há mais de 40 anos, e mais recentemente no controle de Diptera e Coleoptera. Tais proteínas são altamente tóxicas e específicas e por isso, inócuas para a maioria de outros organismos, incluindo insetos benéficos (HERRERO; OPPERT; FERRÉ 2001; SIEGEL, 2001; RAMOS et al., 2006).

Estudos realizados por vários autores utilizando essa bactéria resultaram em efeitos negativos em relação à toxicidade a ratos, coelhos e ovelhas (SIEGEL, 2001; MEHER et al., 2002; WILCKS et al., 2006), além de não provocar alterações na mucosa vaginal durante o ciclo estral (FIERROS; ORDÓNEZ; MORALES 2002). Porém, quando analisado mais especificamente, em outros experimentos, foram observadas alterações dos níveis antigênicos no sistema imune, através do método de estudo imunoenzimático, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) (VÁZQUEZ-PADRÓN et al., 2000; CALDERÓN et al., 2007). Além disso, segundo Jung et al. (2006), a toxina *Bt* também possui atividade citocida sobre algumas células cancerígenas humanas.

Dados recentes mostraram que o Brasil ultrapassou a Argentina como o segundo maior produtor mundial de culturas transgênicas. Um impressionante crescimento de 5,6 milhões de hectares para 21,4 milhões de hectares, um aumento de 35% em relação a 2008 (PARR, 2010).

A principal forma de contaminação por agrotóxicos é a ocupacional, que se caracteriza pela contaminação dos trabalhadores que manipulam essas substâncias. Esta contaminação é observada tanto no processo de formulação (mistura e/ou diluição dos agrotóxicos para uso), quanto no processo de utilização (pulverização, auxílio na condução das mangueiras dos

pulverizadores e descarte de resíduos e embalagens contaminadas (MOREIRA et al. 2002).

No Brasil o número de trabalhadores rurais que estão potencialmente expostos aos inseticidas sintéticos e biológicos é bastante expressivo (GARCIA; ALMEIDA 1991). Destes, a maioria pode se contaminar diretamente com alimentos contendo resíduos desses inseticidas. Além disso, pode haver intoxicações agudas e crônicas, através de contaminação de abastecimentos de água potável para consumo humano e animal, de rios, lagos e açudes, do leite materno e de vaca, de frutas, legumes e grãos (ARÃO, 2009). Além disso, durante a gravidez, a comunicação materno-fetal placentária pode levar resíduos de agrotóxicos aos tecidos fetais, pois a mesma possui células endócrinas que secretam hormônios esteróides e peptídicos, os quais são responsáveis pela sustentação e desenvolvimento fetal, além de manter a comunicação de nutrientes e dejetos entre a mãe e o feto (BAISDEN et al., 2007). A mão-de-obra feminina constitui, aproximadamente, 60% do total da mão-de-obra utilizada na produção de diversas culturas (BRANCO; VAINSENER 2001), o que leva ao aumento da exposição aos agrotóxicos.

Atualmente existem nove produtos formulados à base de *Bt*. Destes, as formulações comerciais Dipel® WG e XenTari® WG pertencem à classe toxicológica II (altamente tóxico), enquanto que a formulação comercial Deltametrina (Decis® 25 CE) pertence à classe toxicológica III (AGROFIT, 2007). As características de solubilidade dos piretróides facilitam a excreção de substâncias pelo leite e a passagem pela barreira placentária, favorecendo a exposição desses produtos no período perinatal. Assim, a exposição do neonato ao inseticida em concentrações que não apresentem sinais clínicos de intoxicação sistêmica materna, pode causar danos no indivíduo em desenvolvimento (CANTARUTTI, 2005). No entanto, são poucos os trabalhos que mostram os efeitos de doses subletais de inseticidas sintéticos sobre o aparelho reprodutor feminino e praticamente não há relatos sobre os efeitos dos inseticidas biológicos em humanos, principalmente em relação à

histofisiologia reprodutiva. Assim resolvemos testar a hipótese se a administração dos inseticidas XenTari<sup>®</sup> WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*) e deltametrina (Decis<sup>®</sup> 25CE), em concentrações que não apresentem sinais clínicos de intoxicação materna, pode interferir na interação blastocisto-endométrio e afetar órgãos maternos em ratas albinas.



## REFERÊNCIAS

- AGROFIT, SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Coordenação geral de Agrotóxicos e Afins*. DFIA/DAS. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> Acesso 14 dez. 2007.
- ANADÓN, A.; MARTYNEZ, M.; MARTYNEZ, M.A.; DYAZ, M.J.; MARTYNEZ-LARRANAGA, M.R. Toxicokinetics of lambda-cyhalothrin in rats. *Toxicology Letters*, v. 165 p. 47-56, 2006.
- ANDERSEN, H. R.; VINGGAARD, A. M.; RASMUSSEN, T. H.; GJERMANDSEN, I. M.; BONEFELD-JORGENSEN, E. C. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 179, p. 1-12, 2002.
- ANDRADE, A. J. M.; ARAÚJO, S.; SANTANA, G. M.; OHI, M.; DALSENTER, P. R. Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 36, n. 3, p. 310-317, 2002.
- ARÃO, I. R. *Percepção por trabalhadores rurais dos municípios de rio verde e catalão de riscos ambientais e à saúde em relação a defensivos agrícolas*. 2009. 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) Universidade Católica de Goiás(UCG) - Goiânia.
- ARONSON, A. I. *Bacillus thuringiensis* and its use as a biological insecticide. *Plant Breeding Review*, v. 12, p.19-45, 1994.
- AUDTHO, M; VALAITIS, A; ALZATE, O. Y.; DEAN, D. Production of chymotrypsin-resistant *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa1  $\delta$ -endotoxin by protein engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 4601-4605, 1999.
- BAISDEN, B.; SONNE, S.; JOSHI, R. M.; GANAPATHY, V.; SHEKHAWAT, P. S. Antenatal dexamethasone treatment leads to changes in gene expression in a murine late placenta. *Placenta*, v. 28, n. 10, p.1082-1090, 2007.
- BAKER, V. A. Endocrine disrupters - testing strategies to assess human hazard. *Toxicology in vitro*, v. 15, p. 413-419, 2001.
- BARLOW, S. M; SULLIVAN, F. M.; LINES, J. Risk assessment of the use of deltamethrin on bednets for the prevention of malaria. *Food Chemical Toxicology*, v. 39, p. 407-422, 2001.
- BARRETO, M. R. *Prospecção e caracterização de genes de Bacillus thuringiensis com potencial para o controle de insetos-praga da cultura da soja*. 2005. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BOISVERT, M.; BOISVERT, J. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis on target and non-target organisms: a review of laboratory and field experiments. *Biocontrol Science and Technology*, v. 10, p. 517–561, 2000.

BOTTON, M.; NAKANO, O.; KOVALESKI, A. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações de *Bonagota cranaodes* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) em regiões produtoras de maçã do Sul do Brasil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.29, p.633- 637, 2000.

BRAGUINI, W. L. *Efeitos da deltametrina e do glifosato, sobre parâmetros do metabolismo energético mitocondrial, sobre membranas artificiais e naturais e experimentos in vivo*. 2005. 174f. Tese (Doutorado em Ciências- Bioquímica) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BRANCO, A. M.; VAINSENER S. A. Imprescindíveis e Discriminadas: As Trabalhadoras Rurais na Fruticultura do Vale do São Francisco. *Fundação Joaquim Nabuco*, 2001 Disponível em: <<http://www.race.nuca.ie.ufrj.br>> Acesso 14 dez. 2007.

BURR, S. A.; RAY D. E. Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. *Toxicological Sciences*, v. 77, p. 341-346, 2004.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. de. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000.

CALDERÓN, M. E. R.; GONZÁLEZ, J. M. A.; MOLINA, M. A. F.; GUERRA, R. S. T.; Padilla, C. R. Adjuvant effects of crystal proteins from a Mexican strain of *Bacillus thuringiensis* on the mouse humoral response. *The International Association for Biologicals*, v. 35, p. 271-276, 2007.

CANTARUTTI, T. F. P. *Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos wistar*. 2005. 60f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CAPALBO, D. M. F. *Bacillus thuringiensis*: Este auxiliar ainda pouco conhecido. *Embrapa Meio Ambiente*. São Paulo. Jun. 1998. Disponível em: <<http://www.radiobras.gov.br>>. Acesso 14 dez. 2007.

CASTILLO, C. G. MONTANTE, M.; DUFOUR, L.; MARTÍNEZ, M. L.; JIMÉNEZ-CAPDEVILLE, M. E.; Behavioral effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats. *Neurotoxicology and Teratology*, vol. 24, p. 797–804, 2002.

ECOBICHON, D.J. Toxic effects of pesticides. In: KLASSEN, C.D. *Casarett & Doull's Toxicology*. The basic science of poisons. New York: McGraw-Hill, 1996, p. 643-689.

FIERROS, L. M.; ORDÓÑEZ, P. I.; MORALES, P. M. Slight influence of the estrous cycle stage on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* in mice. *Life Sciences*, v. 71, p. 2667-2680, 2002.

- GARCIA G. E.; ALMEIDA, W. Exposição dos trabalhadores rurais aos agrotóxicos no Brasil / Rural workers exposure to pesticides in Brazil. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, v.19, n.72, p.7-11, 1991.
- GARRY, V. F.; HARKINS, M.; LYUBIMOV, A.; ERICKSON, L.; LONG, L. Reproductive outcomes in women of the Red River Valley of the north. I. The spouses of pesticide applicators: pregnancy loss, age at menarche, and exposures to pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 65, n. 11, p. 769-786, 2002.
- HERRERO, S.; OPPERT, B.; FERRÉ, J. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 3, p. 1085-1089, 2001.
- JUNG, Y. C.; MIZUKI, E.; AKAO, T.; CÔTÉ, J. C., Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. *Journal of Applied Microbiology*, v.103, p. 65-79, 2007.
- MEHER, S. M.; BODHANKAR, S. L.; ARUNKUMAR; DHULEY, J. N.; KHODAPE, D. J.; NAIK, S. R. Toxicity Studies of Microbial Insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *kenyae* in Rats, Rabbits, and Fish. *International Journal of Toxicology*, v. 21, n. 2, p. 99-105, 2002.
- MOINO JUNIOR, A. Produção de fungos, vírus e bactérias entomopatogênicas. In: BUENO, V. H. P. *Controle biológico de pragas: Produção massal e controle de qualidade*. 02 ed. Lavras: UFLA, 2003, p. 175-184.
- MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F.; LIMA, J. S.; MEYER, A.; OLIVEIRA-SILVA, J. J.; SARCINELLI, P. N.; BATISTA, D. F.; EGLER, M.; CASTRO FARIA, M. V.; ARAÚJO, A. J.; KUBOTA, A. H.; SOARES, M. O.; ALVES, S. R.; MOURA, C. M.; CURTI, R. Integrated evaluation of the health impact of pesticide use in a community at Nova Friburgo, RJ. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.7, n. 2, p. 299-311, 2002.
- ÖSTMAN, Ö.; LUNDSTRÖM, J. O.; PERSSON VINNERSTEN, T. Z. Effects of mosquito larvae removal with *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) on natural protozoan communities. *Hydrobiologia*, v. 607, p. 231–235, 2008.
- PARR, C. Começa a segunda onda prevista de crescimento e desenvolvimento de biotecnologia: Os países em desenvolvimento reconhecem a biotecnologia como uma chave para a autossuficiência e a prosperidade do setor alimentício. *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications* (ISAAA). p. 1-5, 2010. Disponível em: < <http://www.isaaa.org>>. Acesso em: 03 mar. 2010.
- RAMOS, H. B., OLIVEIRA, G. R., BRUNETTA, P. S. F., BARBOSA, A. E. A. D., SILVA, M. C. M., GROSSI-DE-SÁ, M. F. Evolução molecular in vitro: prospecção de novas toxinas Cry com atividade melhorada para o bicudo-doalgodoeiro, *Anthonomus grandis*. *XI Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia* – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, n. 36, p. 80, 266 p., 2006.
- RAY, D. E.; FRY, J. R. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 111, p. 174 – 193, 2006.

REYS, L. L. Tóxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino. *Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa, Grupo de Medicina Preventiva e Ciências Sociais*. Série III, v.6, n.4, p.213-225, 2001.

SIEGEL, J. P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*- Based insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 77, n. 1, p. 13-21, 2001.

SIVASUPRAMANIAM, S.; KABUYE, V. T.; MALVAR, T.; GILMER, A. J. B.; PETERS, A.; COYLE D.; MOHAN K. S.; DEEBA F. Y.; RAVI, K. C. Hybrid *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin provide enhanced spectrun of activity on Lepidopteran pest of cotton. In: DUGGER P, RICHTER D. *Beltwide Cotton Conference Proceedings*, 2000. p. 837-840. Memphis: National Cotton Council.

SULTAN, C.; BALAGUER, P.; TEROUANNE, B.; GEORGET, V.; PARIS, F.; JEANDEL, C.; LUMBROSO, S.; NICOLAS, J. C. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 178, p. 99-105, 2001.

TILQUIN, M; PARIS, M.; REYNAUD, S.; DESPRES, L.; RAVANEL, P.; GEREMIA, R. A.; GURY, J. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis (bti) in mosquito natural habitats. *PLoS ONE*, v. 3, n. 10, p. e3432-e3441, 2008.

VÁZQUEZ-PADRÓN, R. I. V.; FIERROS, L. M.; BAZÁN, L. N.; GIL, A. F. M.; DE LA RIVA, G. A.; REVILLA, R. L. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice Immunogenicity of Cry1Ac. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 2, p. 147-155, 2000.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Deltamethrin, environmental health criteria, 97. *Geneva: World health organization*. IPCS, 1990. Disponível em: <[http://www.who.int/topics/environmental\\_health](http://www.who.int/topics/environmental_health)> Acesso 22 dez. 2007.

WILCKS, A., HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B.; LICHT; T. R. Persistence of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides in the gut of human-flora-associated rats. *FEMS Immunology Medical And Microbiology*, v. 48, n. 3, p. 410, 2006.

## CAPÍTULO II

Resposta da interação blastocisto-endométrio em ratas albinas frente a doses subletais de inseticidas biológico e sintético

A.J.J.M. Lemos<sup>a</sup>; V. Wanderley-Teixeira<sup>a\*</sup>; Á.A.C. Teixeira<sup>a</sup>; F.C.A. Silva<sup>a</sup>; J.V. Oliveira<sup>b</sup>; H.Á.A. Siqueira<sup>b</sup>

*<sup>a</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, Brasil*

*<sup>b</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, Brasil*

\*Autor para correspondência. UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

E-mail: [valeria@dmfa.ufrpe.br](mailto:valeria@dmfa.ufrpe.br) (V. Wanderey-Teixeira)

### RESUMO

Visando elucidar os efeitos de doses subletais de inseticidas biológico e químico sobre a histofisiologia reprodutiva em mamíferos, testou-se a hipótese dos inseticidas XenTari<sup>®</sup> e deltametrina (Decis<sup>®</sup> 25CE), administrados em concentrações que não apresentem sinais clínicos de intoxicação materna, poderem interferir na interação blastocisto-endométrio em ratas albinas, utilizando-se parâmetros morfológicos, histoquímicos e morfométricos. Utilizaram-se 35 ratas albinas, submetidas a doses

subletais dos inseticidas XenTari<sup>®</sup> (18,5; 185 e 370mg/100g) e deltametrina (1, 2 e 4mg/Kg). Os inseticidas foram administrados por gavagem, em doses diárias, e as ratas sacrificadas no sétimo dia de prenhez. As ratas submetidas às maiores dosagens dos inseticidas mostraram redução significativa do número de sítios implantados e alterações histopatológicas nos sítios, caracterizadas por células trofoblásticas vacuolizadas, raros citotrofoblastos, acentuado infiltrado leucocitário e sangue no lúmen uterino. As decíduas apresentaram-se mais fibrosas, principalmente nas ratas tratadas com a maior dosagem do inseticida XenTari<sup>®</sup>. Verificou-se aumento da vascularização nos sítios das ratas submetidas à maior dosagem de deltametrina. Assim, conclui-se que dose de 370mg/100g do inseticida XenTari<sup>®</sup> produz alterações qualitativas e quantitativas na interação endométrio-blastocisto em ratas, semelhantemente a dose de 4mg/Kg do inseticida deltametrina, comprometendo o processo de implantação.

Palavras-chave: inseticidas, sítio de implantação, prenhez, rata, histoquímica, morfometria.

## **1. Introdução**

A deltametrina, composto pertencente aos piretróides do tipo II, é amplamente utilizada tanto no controle de pragas agrícolas quanto de interesse médico-veterinário e na saúde pública. Porém, em casos de intoxicação ocasiona sintomas como contorções, salivações e convulsões, sintomas estes conhecidos como “Síndrome CS” [1-3].

Devido à crescente preocupação com a contaminação ambiental e deposição de substâncias prejudiciais aos seres vivos destes produtos, atualmente várias pesquisas têm enfatizado a utilização de substâncias sintéticas com o emprego de produtos de

origem biológica. Dentre os microorganismos utilizados no controle biológico estão os fungos, bactérias e vírus, que podem ser cultivados em laboratório ou em escala industrial, já havendo disponibilidade de algumas formulações comerciais [4], como o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Berliner, 1909), o qual é obtido através de processos fermentativos controlados em grande escala [5,6].

No Brasil o número de trabalhadores rurais que estão potencialmente expostos aos inseticidas é bastante expressivo [7]. Destes, a maioria pode se contaminar diretamente com alimentos contendo resíduos de inseticidas. Além disso, pode haver intoxicações agudas e crônicas, através de contaminação de abastecimentos de água potável para consumo humano e animal, de rios, lagos e açudes, do leite materno e de vaca, de frutas, legumes, grãos e carnes.

A mão-de-obra feminina constitui, aproximadamente, 60% do total de trabalhadores utilizados na produção de diversas culturas, entre as quais, a uva, a acerola e o tomate [8], o que leva ao aumento da exposição aos agrotóxicos. Durante a gravidez, a comunicação materno-fetal placentária pode levar resíduos de agrotóxicos aos tecidos fetais. Assim, a exposição do feto aos inseticidas em concentrações que não apresentem sinais clínicos de intoxicação sistêmica materna, pode causar danos no seu desenvolvimento [9-11].

Estudos mostraram uma relação entre alterações do nível de hormônios sexuais e a quantidade de substâncias piretróides eliminadas pela urina de homens com algum tipo de infertilidade [12,13]. Já Andrade et al.[14] observaram que doses de 4,0mg/kg de deltametrina em ratos machos adultos causa redução do peso do testículo, epidídimo e da produção espermática. Quanto ao produto de origem biológica, Vázquez-Padrón et al. [15] e Calderón et al. [16] relataram alterações dos níveis antigênicos no sistema

imune em ratos, após administração da toxina *Bt* Cry1Ac, na dosagem de 100µg/Kg, por via intragástrica, e da toxina *Bt* p 130, nas dosagens de 0,1 a 2,5 mg/Kg, por via intraperitoneal. Porém, poucos trabalhos tratam da avaliação dos efeitos desses produtos sobre o sistema reprodutor feminino.

Visando elucidar os possíveis efeitos de doses subletais de inseticidas biológico e químico sobre a histofisiologia reprodutiva em mamíferos, a presente pesquisa testou a hipótese se a administração dos inseticidas XenTari® WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*) e deltametrina (Decis® 25CE), em concentrações que não apresentem sinais clínicos de intoxicação materna, pode interferir na interação blastocisto-endométrio em ratas albinas, utilizando-se parâmetros morfológicos, histoquímicos e morfométricos.

## **2. Material e métodos**

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

### *2.1 Animais*

Foram utilizadas 35 ratas albinas *Rattus norvegicus albinus* com 90 dias de idade, virgens, pesando aproximadamente 200g, da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE.

Os animais foram mantidos em gaiolas com alimentação e água “*ad libitum*”, na temperatura de 22°C e iluminação artificial que estabeleceram o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 06:00 às 18:00 horas. Após um período de adaptação, foram colhidos esfregaços vaginais para a determinação



do ciclo estral. Os animais que apresentaram três ciclos estrais regulares foram acasalados e divididos nos seguintes grupos:

Grupo I - ratas prenhas que receberam placebo e sacrificadas no 7º dia de prenhez, para análise dos sítios de implantação. (controle).

Grupo II - ratas prenhas que receberam 18,5mg de XenTari® WG(1mg de toxina protéica)/100g e sacrificadas no 7º dia de prenhez, para análise dos sítios de implantação.

Grupo III - ratas prenhas que receberam 185mg de XenTari® WG (10mg de toxina protéica)/100g e sacrificadas no 7º dia de prenhez, para análise dos sítios de implantação.

Grupo IV - ratas prenhas que receberam 370mg de XenTari® WG (20mg de toxina protéica)/100g e sacrificadas no 7º dia de prenhez, para análise dos sítios de implantação.

Grupo V - ratas prenhas que receberam 1,0mg de deltametrina (0,4ml de Decis® 25CE)/kg e sacrificadas no 7º dia de prenhez, para análise dos sítios de implantação.

Grupo VI - ratas prenhas que receberam 2,0mg de deltametrina (0,8ml de Decis® 25CE)/kg e sacrificadas no 7º dia de prenhez, para análise dos sítios de implantação.

Grupo VII - ratas prenhas que receberam 4,0mg de deltametrina (1,6ml de Decis® 25CE)/kg e sacrificadas no 7º dia de prenhez, para análise dos sítios de implantação.

## *2.2 Administração dos inseticidas*

Os inseticidas XenTari® WG e deltametrina (Decis® 25CE) foram administrados por via oral (gavagem), a partir da confirmação do acasalamento, em doses diárias, de

acordo com a metodologia modificada de Shaban et al. [17] para o inseticida biológico, e de Andrade et al. [14] para o inseticida sintético. As ratas foram pesadas diariamente através do uso de uma balança digital, desde o primeiro dia de confirmação de acasalamento até o sétimo dia gestacional, para observação do ganho de peso e para conversão da medida proporcional da dosagem dos inseticidas.

### *2.3 Coleta dos sítios de implantação e histoquímica*

Ao final do experimento as fêmeas de todos os grupos foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular no sétimo dia de prenhez. Após a coleta do material, os animais sofreram eutanásia utilizando-se o T-61<sup>®</sup>, sendo administrado 0,2 mL/Kg, por via intravenosa. Os cornos uterinos contendo os sítios de implantação foram coletados e mergulhados imediatamente em líquido de Bouïn, permanecendo no mesmo por 48 horas. Posteriormente os cornos uterinos foram observados em uma lupa para contagem dos sítios de implantação, utilizando-se como referência às áreas dilatadas apresentadas pelos mesmos. Após esses procedimentos, os sítios de implantação foram processados para inclusão em parafina e os cortes submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H. E.) e pelo Tricrômico de Mallory.

### *2.4 Análise morfométrica*

Para quantificação da vascularização na região do sítio de implantação, utilizou-se um retículo de 121 pontos de intersecção (Marca Olympus, modelo U-OCMSQ10/10) acoplado a uma ocular de 10X e analisado com objetiva de 40X. Utilizaram-se cinco lâminas de cada grupo, onde foram escolhidos dez campos aleatórios, perfazendo um

total de 1.210 pontos por sítio de implantação, sendo contados os pontos que incidiram sobre o lúmen e parede dos vasos.

### *2.5 Análises estatísticas*

Os dados obtidos do peso materno, número de sítios de implantação e da morfometria da vascularização foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, a 95% de significância.

## **3. Resultados**

### *3.1 Contagem dos sítios de implantação*

A análise estatística do número de sítios de implantação dos grupos experimentais revelou que tanto o inseticida biológico como o sintético diferiu significativamente do grupo controle nas maiores dosagens administradas. Verificou-se ainda uma diferença significativa entre a menor (grupo V) e a maior dosagem (grupo VII) do inseticida sintético (Tabela 1).

### *3.2 Histopatologia e histoquímica*

Os sítios de implantação nas ratas do grupo controle apresentaram-se totalmente inseridos na parede do útero. Histologicamente esses sítios mostraram-se constituídos por trofoblastos, alguns com atividade mitótica, citotrofoblastos poliplóides e rica vascularização. O epitélio luminal apresentou-se característico do tipo simples colunar e na decídua foram visualizadas várias glândulas endometriais (Figuras 1A, 1B, 1C, 1D e

1E). As doses de 18,5 e 185mg/100g do inseticida biológico, bem como a dosagem de 1mg/Kg do inseticida sintético não ocasionaram alterações histológicas nos sítios e decídua (Figuras 1F, 2A e 2B). No entanto na dosagem 2mg/Kg do inseticida sintético verificou-se a presença de infiltrado leucocitário na região do sítio de implantação (Figura 2C). Alterações histológicas significativas foram visualizadas nas dosagens de 370mg/100g do inseticida biológico (Figuras 2D, 2E e 2F) e 4mg/Kg do inseticida sintético (Figuras 3A, 3B e 3C), caracterizadas pela presença de células trofoblásticas vacuolizadas, raros citotrofoblastos, grande quantidade de vasos sanguíneos, alguns com acentuado infiltrado leucocitário, degeneração da região da decídua, além da presença de sangue no lúmen uterino. A coloração pelo tricrômico de Mallory produziu reação variada na decídua dos grupos experimentais, sendo caracterizadas como pouco, moderada e muito fibrosa nos grupos I, VII e IV, respectivamente (Figuras 3D, 3E e 3F).

### *3.3 Aferição do peso dos animais*

Estatisticamente não houve diferenças significativas no peso das ratas dos grupos experimentais (Tabela 2).

### *3.4 Análise morfológica*

As doses subletais dos inseticidas biológico e sintético não interferiram no número de vasos sanguíneos dos sítios de implantação dos grupos experimentais ( $P>0,05$ ) (Tabela 3).

#### 4. Discussão

Embora seja conhecido que os piretróides apresentem características de solubilidade que facilitam a excreção de substâncias pelo leite e a passagem pela barreira placentária, favorecendo a exposição desses produtos no período perinatal, verificou-se na presente pesquisa que dose sub-letal de 2mg/Kg de deltametrina, uma concentração que não apresenta sinais clínicos de intoxicação sistêmica materna, já ocasionou o surgimento de áreas com infiltrados leucocitários na região dos sítios, o que corrobora com relatos de Righi et al. [19] que administrando doses de 1 a 3 mg/Kg do piretróide cialotrina, por gavagem, em ratos, observaram alterações das células do sistema imunológico nos níveis plasmáticos. No entanto, alterações histopatológicas drásticas nos sítios de implantação e redução do número desses sítios foram observadas com a dose sub-letal de 4mg/Kg.

Resultado ainda mais expressivo foi o observado para o inseticida biológico, pois várias pesquisas têm revelado efeitos negativos de *B. thuringiensis* em relação à toxicidade a ratos, coelhos e ovelhas [20-22], e que essa bactéria não provoca alterações na mucosa vaginal durante o ciclo estral [23]. Porém, os resultados revelaram que dose subletal de 370mg/100g do inseticida biológico XenTari<sup>®</sup>, ocasionou alterações histopatológicas também significativas nos sítios de implantação, bem como reduziu o seu número semelhantemente ao ocorrido com o inseticida sintético.

Na região dos sítios bem como na luz dos vasos sanguíneos foram visualizados infiltrados leucocitários, além de vacuolizações citoplasmáticas e degeneração. Histoquimicamente verificou-se que a região da decídua nas ratas que receberam as maiores dosagens dos inseticidas biológico e sintético apresentou-se mais fibrosa, principalmente nas ratas que receberam administração do inseticida biológico o que

pode ter reduzido a comunicação célula-célula, alterando a distribuição de nutrientes e fatores de desenvolvimento, além de interferirem na mobilidade celular, pela interação e resistência das fibras levando a uma rigidez do tecido, sugerindo que estas alterações impossibilitou a aderência e fixação do embrião, reduzindo assim, a capacidade de implantação nestas ratas pela redução da receptividade do endométrio, pois não foram observados locais de reabsorções. Outras duas hipóteses que poderiam justificar a redução do número dos sítios seriam: 1. Redução da ingestão de alimento em decorrência da administração diária dos inseticidas, porém não houve alterações significativas no peso ponderal das ratas durante o período da administração e 2. A capacidade, no caso dos inseticidas piretróides do tipo II, de agirem sobre o sistema reprodutor feminino, alterando o eixo hipotalâmico-hipófise-adrenal (H-H-A) e hormônios corticosteróides e sexuais, que estão envolvidos diretamente com a morfofisiologia do sistema reprodutor [24-26]. Sabe-se também, que o inseticida biológico age na fisiologia de animais machos e fêmeas, e que estas toxinas causam alterações nos níveis dos hormônios sexuais, tanto com organismos geneticamente modificados, quanto com aplicação direta da pró-toxina *Bt* [23,27].

As alterações histopatológicas mostram claramente que o inseticida biológico se comporta semelhantemente a administração da toxina Cry1Ac, pois de acordo com Vázquez-Padrón et al. [28] and Calderón et al. [16] alterações dos níveis antigênicos no sistema imune em ratos, foram visualizados após administração da dosagem de 100µg/Kg, por via intragástrica da toxina *Bt* Cry1Ac, e da toxina *Bt* p 130, nas dosagens de 0,1 a 2,5 mg/Kg, por via intraperitoneal. Também foi relatado estresse oxidativo, que caracteriza-se pelo acúmulo de radicais livres, os quais danificam a célula, levando a alterações do sistema imunológico e degeneração, quando administrado via

intraperitoneal ou oral, do inseticida biológico Dipel<sup>®</sup>, a base de *B. thuringiensis*, ou proteínas tóxicas de *Bt* [17,29], que produziu alterações semelhantes às da presente pesquisa.

No caso dos piretróides do tipo II, existem relatos quanto à capacidade de alterarem o funcionamento do transporte e permeabilidade de membranas, levando a uma ação imediata das células de defesa, tanto nos tecidos quanto a níveis plasmáticos [19,30]. Interferem também nos canais protéicos de sódio, magnésio e cálcio, além de induzirem a ativação de algumas subfamílias do citocromo P<sub>450</sub>, que têm função de defesa contra toxinas, principalmente nas mitocôndrias e retículo endoplasmático liso das células de órgãos de defesa, além de interferirem no funcionamento das esterases e oxidases, e estarem envolvidos na síntese de esteróides, alterando a fisiologia hormonal do desenvolvimento reprodutivo [31-34]. Estas alterações na fisiologia da membrana podem levar a formação de vacúolos citoplasmáticos e conseqüente degeneração como foi percebido na presente pesquisa, pois, o aumento da vacuolização é uma manifestação comum de degeneração celular [35,36]. Além disso, procedimentos experimentais mostraram que estes inseticidas sintéticos levam a alteração da expressão da proteína P53, a qual está diretamente relacionada a apoptose [37,38]. Alterações semelhantes também foram observadas por Khan et al. [39], que após imergirem cabras diariamente em piretróide cipermetrina, nas concentrações de 0,0% a 1,6% por 1 a 2 minutos durante 75 dias, observaram diferenças altamente significativas nos hepatócitos quando comparadas ao grupo controle.

A capacidade do *B. thuringiensis* de interferir na matriz extracelular foi mencionada por Tsai et al. [29] e Tsai et al. [40] que administraram a bactéria *Bt* HD-199 subespécie *Darmstadiensis*, na dose de 3,2 mg/Kg via intratraqueal em ratos,

verificando estresse oxidativo, depósito de colágeno, além do aumento da reação de interleucinas 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), dos níveis do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e aumento da fibronectina. Estas reações induzidas pela proteína *Bt* levaram ao aumento da presença de colágeno na região antimesometrial, a qual é constituída por células que mantêm características estruturais e ultra-estruturais de um fibroblasto comum, sendo estimuladas pelo TNF- $\alpha$  e interleucinas IL1- $\alpha$  e IL1- $\beta$ , que são elevadas pela bactéria em questão, resultando em diferenças nos volumes nucleares e compartimentos citoplasmáticos, e conseqüente aumento da sua principal função, a síntese de colágeno [41]. Erdogan et al. [42] evidenciaram aumento de fibras colágenas no estroma de pulmão de ratos, utilizando spray em aerossol de deltametrina diluída nas doses de 6 e 12mg/m<sup>3</sup> por 30 minutos diários durante 45 dias, além de outros efeitos, como acumulação de macrófagos espumosos e focos de hemorragia.

Apenas nas ratas que receberam a maior dosagem de deltametrina, grupo VII, foi observado presença de sangue no lúmen uterino, indicando um processo hemorrágico. Porém, quando analisado morfometricamente, o número de vasos sanguíneos, não diferiu estatisticamente entre os grupos experimentais. Em experimentos com ratos tratados com cipermetrina na dosagem de 14,5mg/Kg e deltametrina na dosagem 15mg/Kg mostraram inchaço gastrointestinal acompanhado de hemorragia e congestão de vasos sanguíneos em vários órgãos [43,44]. Isto mostra um agravante quanto ao uso de doses subletais de inseticidas piretróides, os quais além de levarem a uma reação tóxica-inflamatória, levam a processos hemorrágicos, sendo então, mais um fator que pode levar à redução de implantações embrionárias durante a concepção.

Em conclusão, o inseticida biológico na dose subletal de 370mg/100g (XenTari<sup>®</sup> WG, *B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*) produz alterações qualitativas e quantitativas na



interação endométrio-blastocisto em ratas albinas, semelhantemente a dose subletal de 4mg/Kg do inseticida sintético deltametrina (Decis<sup>®</sup> 25CE), comprometendo assim, o processo de implantação.

### **Agradecimentos**

Agradecemos a todos os participantes, sem os quais este trabalho não seria possível.

### **Referências**

- [1] Burr SA, Ray DE. Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. *Toxicol Sci* 2004;77:341-6.
- [2] Anadón A, Martynez M, Martynez MA, Dyaz MJ, Martynez-Larranaga MR. Toxicokinetics of lambda-cyhalothrin in rats. *Toxicol Lett* 2006;165:47-56.
- [3] Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *Review Vet J* 2009;182:7-20.
- [4] Barreto MR. Prospecção e caracterização de genes de *Bacillus thuringiensis* com potencial para o controle de insetos-praga da cultura da soja. Thesis; 2005.
- [5] Sivasupramaniam S, Kabuye VT, Malvar T, Gilmer, AJB, Peters, A, Coyle D, et al. Hybrid *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin provide enhanced spectrun of activity on Lepidopteran pest of cotton. In: Dugger P, Richter D, editors. Beltwide Cotton Conference Proceedings, Memphis: National Cotton Council; 2000, p. 837-840.
- [6] Moino Junior A. Produção de fungos, vírus e bactérias entomopatogênicas. In: Bueno VHP editors. Controle biológico de pragas: Produção massal e controle de

- qualidade. Lavras-MG: Universidade Federal de Lavras; 2003, p. 175-184.
- [7] Garcia GE, Almeida W. Rural workers exposure to pesticides in Brazil. *Rev Bras Saúde Ocup* 1991;19:7-11.
- [8] Branco AM, Vainsencher SA. Imprescindíveis e Discriminadas: As Trabalhadoras Rurais na Fruticultura do Vale do São Francisco. Fundação Joaquim Nabuco.2001. Disponível em: <<http://www.race.nuca.ie.ufrj.br>> Acesso em 14 dez. 2007.
- [9] Cantarutti TFP. Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos Wistar. Dissertation; 2005.
- [10] Myllynen P, Pasanen M, Pelkonen O. Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta* 2005;26(5):361-71.
- [11] Lopez-Espinosa MJ, Granada A, Carreno J, Salvatierra M, Olea-Serrano F, Olea N. Organochlorine pesticides in placentas from southern Spain and some related factors. *Placenta* 2007;28(7):631-8.
- [12] Xia Y, Han Y, Wu B, Wang S, Gu A, Lu N, et al. The relation between urinary metabolite of pyrethroid insecticides and semen quality in humans. *Fertil Steril* 2008;89:1743-50.
- [13] Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Pyrethroid insecticide metabolites are associate with serum hormone levels in adult men. *Reprod Toxicol* 2009;27:155-60.
- [14] Andrade AJM, Araújo S, Santana GM, Ohi M, Dalsenter PR. Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002;36:310-7.
- [15] Vázquez-Padrón RI, Fierros LM, Neri-Bazán L, de la Riva GA, López-Revilla R. Intra-gastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus*

- thuringiensis* induce systemic and mucosal antibody response in mice. Life Sci 1999;64:1897-912.
- [16] Calderón MER, González JMA, Molina MAF, Guerra RST, Padilla CR. Adjuvant effects of crystal proteins from a Mexican strain of *Bacillus thuringiensis* on the mouse humoral response. Biologicals 2007;35:271-6.
- [17] Shaban NZ, Helmy MH, El-Kersh MAR, Mahmoud BF. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin on hepatic lipid peroxidation and free-radical scavengers in rats given alpha-tocopherol or acetylsalicylate. Comp Biochem Physiol 2003;135:405-14.
- [18] Braguini WL. Efeitos da deltametrina e do glifosato, sobre parâmetros do metabolismo energético mitocondrial, sobre membranas artificiais e naturais e experimentos *in vivo*. Thesis; 2005.
- [19] Righi DA, Xavier FG, Palermo-Neto J. Cyhalothrin increased c-fos immunoreactivity at the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats, and suppressed macrophage activity in an adrenal-dependent fashion. Environ Toxicol Pharmacol 2009;27:96-102.
- [20] Siegel JP. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*- Based insecticides. J Invertebr Pathol 2001;77:13-21.
- [21] Meher SM, Bodhankar SL, Dhuley JN, Khodape DJ, Naik SR. Toxicity studies of microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* var. *kenyae* in rats, rabbits, and fish. Int J Toxicol 2002;21:99-105.
- [22] Wilcks A, Hansen BM, Hendriksen NB, Licht TR. Persistence of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides in the gut of human-flora-associated rats. FEMS Immunol Med Microbiol 2006;48:410-8.

- [23] Fierros LM, Ordóñez PI, Morales PM. Slight influence of the estrous cycle stage on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* in mice. *Life Sci* 2002;71:2667-80.
- [24] Andersen HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermansen IM, Bonefeld-Jorgensen EC. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;179:1-12.
- [25] Righi DA, Palermo-Neto J. Behavioral effects of type II pyrethroid cyhalothrin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;191:167-76.
- [26] Righi DA, Xavier FG, Palermo-Neto J. Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on rat innate immunity: A flow cytometric study. *Int Immunopharmacol* 2009;9:148–52.
- [27] Schroder M, Poulsen M, Wilcks A, Kroghsbo S, Miller A, Frenzel T, et al. A 90-day safety study of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 2007;45:339-49.
- [28] Vázquez-Padrón RIV, Fierros LM, Bazán LN, Gil AFM, de la Riva GA, López-Revilla R. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice Immunogenicity of Cry1Ac. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:147-55.
- [29] Tsai SF, Liu BL, Liao JW, Wang JS, Hwang JS, Wang SC, et al. Pulmonary toxicity of thuringiensin administered intratracheally in Sprague-Dawley rats. *Toxicol.* 2003;186:205-16.
- [30] Lamfon HA. Effect of silymarin against deltamethrin - induced histological and

- biochemical changes in liver of albino rats. *Indian J Exp Biol* 2007;3:165-9.
- [31] Braguini WL, Cadena SMSC, Carnieri EGS, Rocha MEM, Oliveira MBM. Effects of deltamethrin on functions of rat liver mitochondria and on native and synthetic model membranes. *Toxicol Lett* 2004;152:191-202.
- [32] Bronisz I, Debinska I, Pasternak K, Sztanke MG, Borzecki A. Magnesium and calcium concentration in mouse tissue receiving deltamethrin. *Magnes Res* 2005;18:135-40.
- [33] Meacham CA, Brodfuehrer PD, Watkins JA, Shafer TJ. Developmentally-regulated sodium channel subunits are differentially sensitive to  $\alpha$ -cyano containing pyrethroids. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008;231:273-81.
- [34] Yang D, Wang X, Chen YT, Deng R, Yan B. Pyrethroid insecticides: Isoform-dependent hydrolysis, induction of cytochrome P450 3A4 and evidence on the involvement of the pregnane x receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;237:49–58.
- [35] Al-Jahdali MO, Bisher ASB. Testicular histopathological alterations in rats treated with sumithion<sup>®</sup> NP 25/2.5 EC, insecticide. *J Biol Sci* 2007;7:520-5.
- [36] Sayım F. Histopathological effects of Dimethoate on testes of rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 2007;78:479-84.
- [37] Wu A, Liu Y. Apoptotic cell death in rat brain following deltamethrin treatment. *Neurosci Lett* 2000;279:85-8.
- [38] Wu A, Ren T, Hu Q, Liu Y. Deltamethrin induces altered expression of P53, Bax and Bcl-2 in rat brain. *Neurosci Lett* 2000;284:29-32.
- [39] Khan A, Faridi HAM, Ali M, Khan MZ, Siddique M, Hussain I, et al. Effects of cypermethrin on some clinico-hemato-biochemical and pathological parameters in male dwarf goats (*Capra hircus*). *Exp Toxicol Pathol* 2009;61:151-60.

- [40] Tsai SF, Yang C, Liu BL, Hwang JS, Ho SP. Role of oxidative stress in thuringiensin-induced pulmonary toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;216:347-53.
- [41] Turner NA, Mughal RS, Warburton P, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. Mechanism of TNF $\alpha$ -induced IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: Effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovasc Res* 2007;76:81-90.
- [42] Erdogan S, Zeren EH, Emre M, Aydin O, Gumurdulu D. Pulmonary effects of deltamethrin inhalation: an experimental study in rats *Ecotoxicol Environ Saf* 2006;63:318–23.
- [43] Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK, Das S. Repeated dose toxicity of alfa-cypermethrin in rats. *J Vet Sci* 2004;5:241-5.
- [44] Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK, Das S. Repeated dose toxicity of deltamethrin in rats. *Indian J Pharmacol* 2005;37:160-4.

**Tabela 1**

Média ( $\pm$  desvio padrão) do número de sítios de implantação dos grupos experimentais.

Grupos	GL	N	*Média	$F^P$
	6			4,004 <sup>0,0051</sup>
G I-		5	14,0 $\pm$ 1,58a	
G II		5	11,2 $\pm$ 0,83abc	
G III		5	11,2 $\pm$ 2,28abc	
G IV		5	9,4 $\pm$ 1,14bc	
G V		5	13,0 $\pm$ 1,23ab	
G VI		5	11,6 $\pm$ 1,14abc	
G VII		5	8,20 $\pm$ 4,71c	

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $P > 0,05$ ). Número de repetições por tratamento (N); Grau de liberdade (GL).

**Tabela 2**

Média ( $\pm$  desvio padrão) do peso das ratas (g) dos grupos experimentais.

Grupos	GL	N	*Média	$F^P$
	6			9,804 <sup>0,1331</sup>
G I-		5	258,70 $\pm$ 3,80a	
G II		5	256,30 $\pm$ 5,49a	
G III		5	257,10 $\pm$ 6,27a	
G IV		5	261,90 $\pm$ 6,12a	
G V		5	259,50 $\pm$ 6,79a	
G VI		5	258,90 $\pm$ 7,23a	
G VII		5	261,40 $\pm$ 8,78a	

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $P > 0,05$ ). Número de repetições por tratamento (N); Grau de liberdade (GL).

**Tabela 3**

\*Médias ( $\pm$  desvio padrão) do número de vasos sanguíneos nos sítios de implantação dos grupos experimentais.

Grupos	GL	N	*Média	$F^P$
	6			9,361 <sup>0,1543</sup>
G I-		5	58,16 $\pm$ 1,59a	
G II		5	55,82 $\pm$ 2,47a	
G III		5	57,22 $\pm$ 4,10a	
G IV		5	61,60 $\pm$ 2,10a	
G V		5	59,46 $\pm$ 2,50a	
G VI		5	57,70 $\pm$ 1,88a	
G VII		5	59,04 $\pm$ 5,28a	

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $P > 0,05$ ). Número de repetições por tratamento (N); Grau de liberdade (GL).



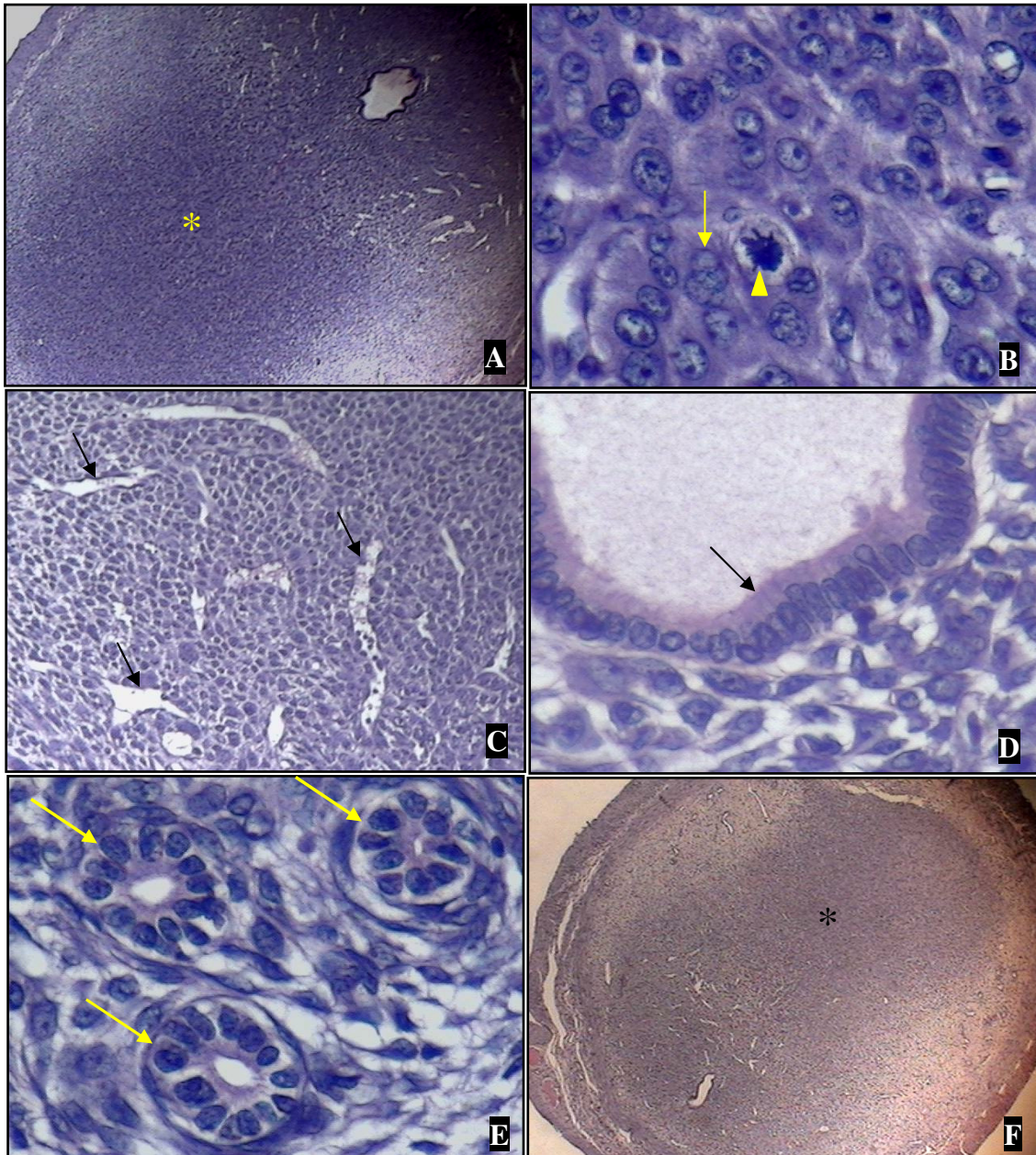


Figura 1: A) Sítio de implantação (\*) de ratas do grupo controle totalmente inserido na parede do útero. H.E.  $\pm$  42X. B) Trofoblasto em mitose (ponta de seta) e citotrofoblasto poliplóide (seta). H.E  $\pm$  428X. C) Vasos sanguíneos (setas). H.E.  $\pm$  107X. D) Epitélio luminal (seta). H.E  $\pm$  428X. E) Glândulas endometriais (setas). H.E  $\pm$  428X. F) Sítio de implantação (\*) de ratas tratadas com 18,5mg/100g do inseticida biológico XenTari<sup>®</sup>. H.E.  $\pm$  42X.

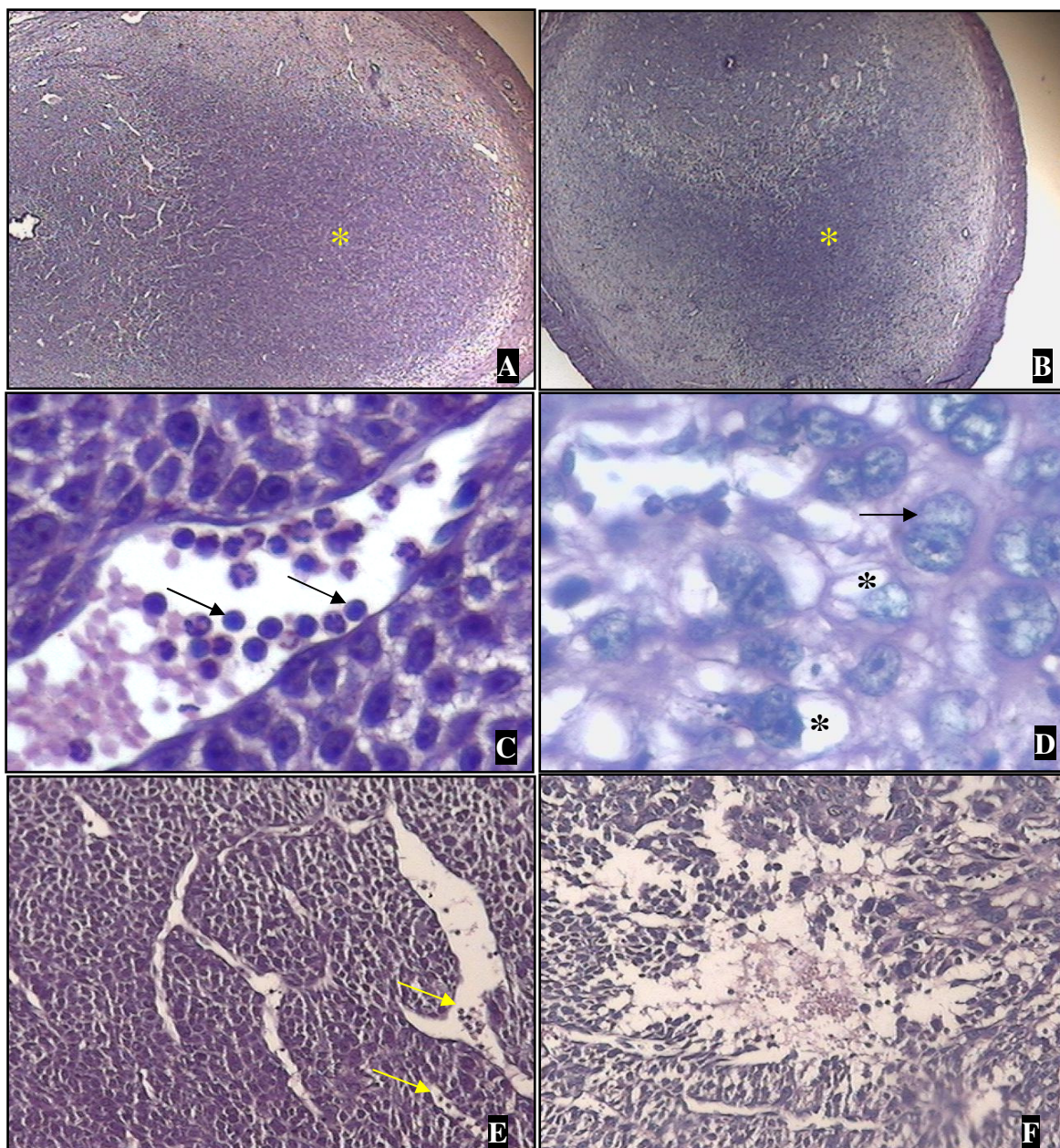


Figura 2: A) Sítio de implantação (\*) de ratas tratadas com 185mg/100g de XenTari. H.E.  $\pm$  42X. B) Sítio de implantação (\*) de ratas tratadas com 1mg/Kg de deltametrina. H.E.  $\pm$  42X. C) Infiltrado leucocitário em vaso do sítio em rata tratada com 2mg/Kg de deltametrina. H.E.  $\pm$  428X. D) Trofoblastos vacuolizados (\*) e citotrofoblasto (seta) em rata tratada com 370mg/100g de XenTari. H.E.  $\pm$  428X. E) Vasos sanguíneos com discreto infiltrado leucocitário, tratamento com 370mg/100g de XenTari. H.E.  $\pm$  107X. F) Degeneração decidual em rata tratada com 370mg/100g de XenTari. H.E.  $\pm$  107X.

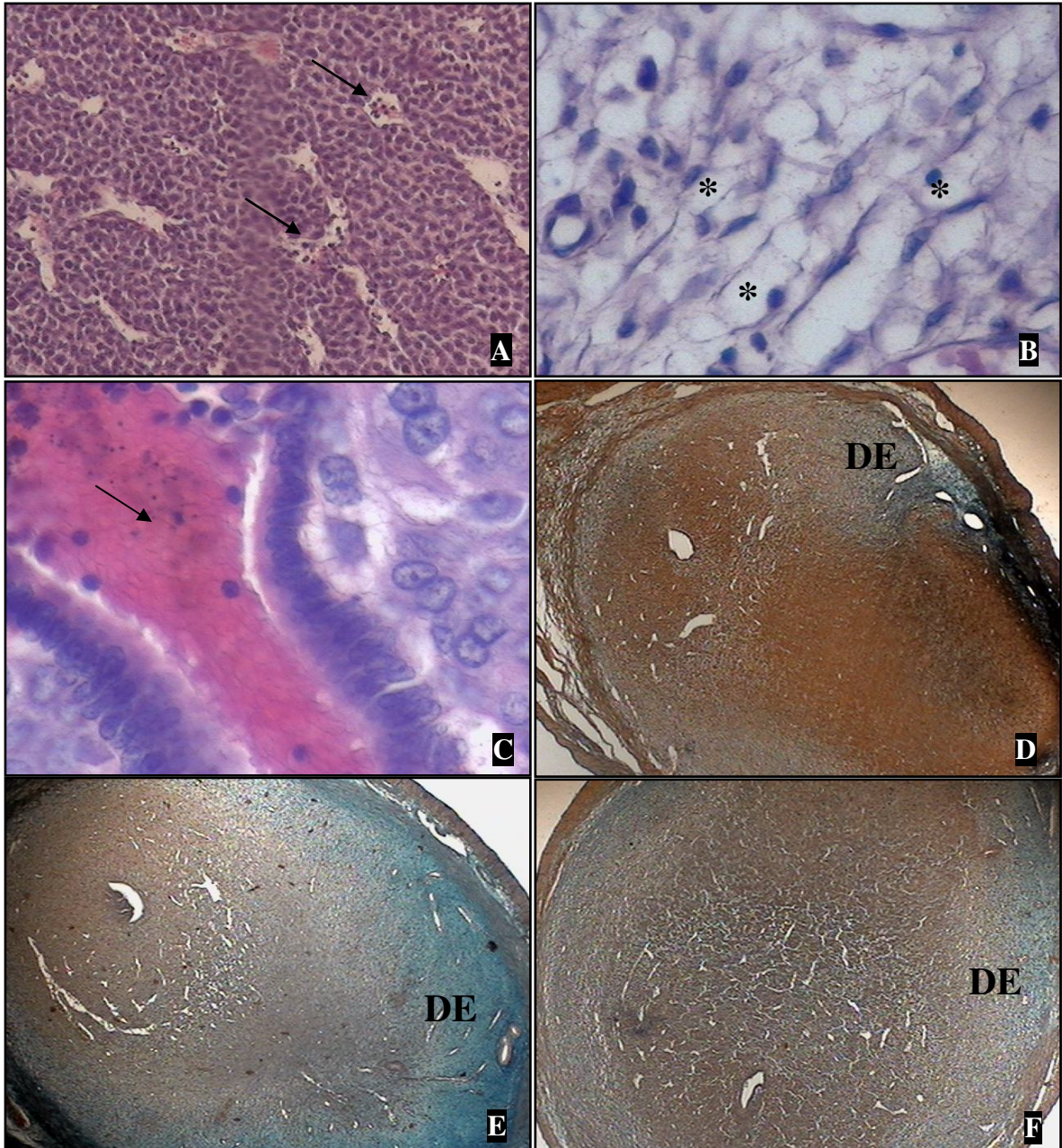


Figura 3: A) Infiltrado leucocitário (setas), B) Degeneração decidual (\*) e C) Lúmen uterino com sangue (seta) em rata tratada 4mg/Kg de deltametrina. H.E.  $\pm$  107, 428 e 428X respectivamente. D) decídua (DE) pouco fibrosa grupo controle. Tricrômico de Mallory.  $\pm$  42X. E) decídua (DE) muito fibrosa em rata tratada com 370mg/100g de XenTari. Tricrômico de Mallory.  $\pm$  42X. F) decídua (DE) moderadamente fibrosa em rata tratada com 4mg/Kg de deltametrina. Tricrômico de Mallory.  $\pm$  42X.

### CAPÍTULO III

Toxicidade de doses subletais do *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai* e do inseticida deltametrina sobre a fertilidade e órgãos de ratas albinas prenhas

Ana J. J. M. Lemos<sup>a</sup>; Herbert A. A. Siqueira<sup>b</sup>; Valéria Wanderley-Teixeira<sup>c\*</sup>; Frederico C.L.Maia<sup>d</sup>; Álvaro A. C. Teixeira<sup>c</sup>; Edson J. Silva<sup>c</sup>; José V. Oliveira<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Mestranda do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE- Brasil.

<sup>b</sup>Professores do Departamento de Agronomia - UFRPE- Brasil.

<sup>c</sup>Professores do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE- Brasil.

<sup>d</sup>Professor do Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE- Brasil.

Palavras-chave: Inseticidas, histopatologia, fígado, rins, pulmão, ratas.

\* Autor para correspondência. Tel.: +55 81 3320.6389. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife, PE, CEP 52171-900.

E-mail: valeria@dmfa.ufrpe.br (Wanderley-Teixeira, V.)

#### RESUMO

*Contexto:* Produtos à base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) assim como inseticidas sintéticos têm sido amplamente utilizados contra importantes vetores de doenças humanas, porém poucos trabalhos estudam a aplicação dessas substâncias em doses que não apresentam sintomas clínicos de intoxicação, sobre o aparelho reprodutor feminino durante a prenhez.

*Métodos:* Foram utilizadas 70 ratas albinas prenhas para análise da fertilidade e histopatologia dos rins, fígado e pulmões, além de morfologia dos neonatos. As ratas foram submetidas a três doses subletais dos inseticidas biológico, XenTari<sup>®</sup> WG -(*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*) e sintético, deltametrina (Decis<sup>®</sup> 25CE). Os inseticidas foram administrados por via oral, a partir da confirmação do acasalamento, por sete dias ou durante toda a prenhez.

*Resultados:* A análise ao microscópio de luz revelou alterações histopatológicas em todos os órgãos em ambos os tratamentos. Não foram observados abortos e os neonatos não apresentaram indícios de malformação na cabeça, membros, tórax e abdome, porém houve redução do número de filhotes nos grupos que receberam as maiores dosagens dos inseticidas em relação ao controle.

*Conclusão:* Ambos inseticidas atuaram de maneira semelhante nos rins, fígado e pulmões produzindo lesões semelhantes, além de reduzirem a fertilidade em ratas quando administrados em doses subletais sem sintomas clínicos de intoxicação materna.

## **1. Introdução**

Formulações à base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) têm sido amplamente utilizadas como agentes controladores de insetos praga por mais de 40 anos sem evidências de danos a seres humanos [1,2]. Seus cristais protéicos (Cry) são uma excelente alternativa tanto contra insetos praga na agricultura quanto contra importantes vetores de doenças humanas [3,4]. Porém, existem relatos de casos sobre efeitos alergênicos, além de asma, náuseas e dores abdominais nos aplicadores e moradores das proximidades das áreas de cultivo após a aplicação aérea de inseticida biológico a base das subespécies *B. thuringiensis kurstaki* (*B.t.k.*) e *israelensis* (*B.t.i.*) [5,6].

Os testes realizados para liberação dos produtos *Bt* e protocolos de desenvolvimento de toxicidade são muito superficiais, além de não serem realizados estudos distintos entre fêmeas prenhas e não prenhas [7,8].

Em relação aos inseticidas químicos, a deltametrina, um dos mais utilizados da classe dos piretróides do tipo II, muito importante por ser considerado de baixa persistência, é aplicado nos cultivos agrícolas, na medicina veterinária e na saúde pública [9]. Pesquisas desenvolvidas em mamíferos abordam principalmente o efeito no sistema nervoso, e a toxicidade destes produtos [10-12]. Além disso, utilizam doses baseadas na DL<sub>50</sub>, sendo poucos os trabalhos que estudam a aplicação dessas substâncias em doses que não apresentam sintomas clínicos sobre o aparelho reprodutor feminino e durante a prenhez [8].

Sabe-se que a deltametrina aplicada via oral pode inibir o citocromo P<sub>450</sub>, enzima envolvida no metabolismo de drogas e substâncias tóxicas a qual, além de poder alterar a fisiologia hormonal do desenvolvimento reprodutivo, também está envolvida no funcionamento dos tecidos do fígado, rins, pulmão, intestino e endométrio uterino de mamíferos [13-16].

No Brasil o número de trabalhadores rurais que estão potencialmente expostos aos inseticidas é bastante expressivo [17]. Destes, a mão-de-obra feminina constitui, aproximadamente, 60% do total de trabalhadores utilizados na produção de diversas culturas, entre as quais, a uva, a acerola e o tomate [18], o que concorre para o aumento da exposição aos agrotóxicos. Desta forma, objetivou-se testar a hipótese de que a administração de inseticidas XenTari<sup>®</sup> WG (*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*) e deltametrina (Decis<sup>®</sup> 25CE), em concentrações que não apresentem sinais clínicos de

intoxicação materna, possam interferir na histologia dos rins, fígado e pulmões de ratas no início da prenhez, bem como na fertilidade.

## 2. Materiais e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizadas 70 ratas albinas *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar com 90 dias de idade, pesando aproximadamente 200g, procedentes do Biotério do mesmo Departamento.

### 2.1 Instalação do bioensaio

Os animais foram mantidos em gaiolas com alimentação e água “*ad libitum*”, na temperatura de 22°C e iluminação artificial que estabeleceram o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 06:00 às 18:00 horas.

Após um período de adaptação, foram colhidos esfregaços vaginais para a determinação do ciclo estral. As ratas que apresentaram três ciclos estrais regulares foram divididas, ao acaso, em 7 grupos, cada um constituído por 10 fêmeas, sendo 5 tratadas até o sétimo dia de prenhez para análise dos rins, fígado e pulmões e as restantes durante toda a gestação para análise da fertilidade. Os animais constituíram os seguintes grupos:

Grupo I - ratas prenhas que receberam placebo;

Grupo II - ratas prenhas que receberam 18,5mg de XenTari<sup>®</sup> WG(1mg de toxina protéica –*B. thuringiensis* subsp. *Aizawai*-)/100g.

Grupo III - ratas prenhas que receberam 185mg de XenTari<sup>®</sup> WG (10mg de toxina protéica)/100g.

Grupo IV - ratas prenhas que receberam 370mg de XenTari<sup>®</sup> WG (20mg de toxina protéica)/100g.

Grupo V - ratas prenhas que receberam 1,0mg de deltametrina (0,4ml de Decis<sup>®</sup> 25CE)/kg.

Grupo VI - ratas prenhas que receberam 2,0mg de deltametrina (0,8ml de Decis<sup>®</sup> 25CE)/kg.

Grupo VII - ratas prenhas que receberam 4,0mg de deltametrina (1,6ml de Decis<sup>®</sup> 25CE)/kg.

Após análise da ciclicidade estral de todos os grupos, as fêmeas que estavam ciclando foram acasaladas na proporção de um macho para duas fêmeas, sempre no início da noite (18:00h). Na manhã (06:00h) do dia seguinte, foram realizados exames colpocitológicos para a confirmação do acasalamento, tomando-se como parâmetro a presença de espermatozóides nos esfregaços corados pelo método Shorr-Harris.

## *2.2 Administração dos inseticidas*

Os inseticidas XenTari<sup>®</sup> WG e deltametrina (Decis<sup>®</sup> 25CE) foram administrados por via oral (gavagem), a partir da confirmação do acasalamento, em doses diárias, de acordo com a metodologia modificada de Shaban et al. [19] para o inseticida biológico, e de Andrade et al. [20] para o inseticida sintético. As ratas foram pesadas diariamente através de uma balança digital, a partir da confirmação do acasalamento, para observação do ganho de peso e conversão da medida proporcional da dosagem dos inseticidas. As doses de deltametrina utilizadas foram estabelecidas a partir da dose NOEL (No Observed Effect Level) para toxicidade materna, ou seja, a maior dose de deltametrina que não causa nenhum efeito adverso (não provoca toxicidade). Segundo a



Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), a NOEL dose para deltametrina em ratos é de 3.3 mg/kg [21].

### *2.3 Análise histopatológica e macroscópica*

Para análise dos órgãos das fêmeas, cinco ratas de cada grupo foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular para eutanásia ao sétimo dia de prenhez. A seguir, foi realizada a abertura da cavidade abdominal até as costelas, com abertura da caixa torácica para serem retirados os rins, fígado e pulmões, estes foram mergulhados imediatamente em líquido de Bouin, permanecendo no mesmo por 48 horas. Após esses procedimentos, os órgãos foram clivados, desidratados em álcool etílico (concentrações crescentes), diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos pela parafina. A seguir, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035) ajustado para 5 µm e submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H. E.) para análise em microscópio de luz e fotomicrografia.

Para análise morfológica dos neonatos, as demais ratas foram acompanhadas por um período de 21 dias, ou seja, até o nascimento dos filhotes, os quais foram contados, pesados em balança analítica, medidos desde a cabeça a ponta da cauda, analisados macroscopicamente quanto a presença de malformação visível na cabeça, tronco ou membros, dados estes, que foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, a 95% de significância.

## **3. Resultados**

### *3.1 Histopatologia*

O presente estudo investigou os efeitos tóxicos de doses subletais de inseticidas biológico e sintético sobre os rins, fígado e pulmões de ratas no início da prenhez e sobre a fertilidade. Os resultados indicaram que ambos os inseticidas interferiram na histofisiologia dos órgãos e que as alterações mostraram ser dose-dependente.

Nos rins, foi observada deposição de hemossiderina, necrose e degeneração vacuolar dos túbulos contorcidos e ductos coletores, glomerulonefrite membranosa e proliferativa, além da redução significativa do espaço de Bowman (Figs. 1B-1F) nos rins das ratas que receberam 4,0mg de deltametrina (1,6ml de Decis<sup>®</sup> 25CE)/kg de peso animal, grupo VII, e nas ratas tratadas com XenTari<sup>®</sup>, 370mg/100g, que corresponde à dosagem de 20mg/100g de animal, da prótoxina (Cry subespécie *Aizawai*), grupo IV, neste grupo observou-se ainda acentuada hipertrofia e hiperplasia com estratificação do epitélio dos túbulos coletores (Fig. 2A), os quais normalmente apresentam-se do tipo simples cúbico.

No fígado foi observado discreto aumento dos espaços sinusóides devido à congestão, necrose focal nodular do tipo coagulativa com intensa reação de células de Kupffer e escassas células mononucleares nas ratas tratadas com doses de 185 e 370 mg/100g de XenTari<sup>®</sup> WG, correspondendo a 10 e 20 mg de toxina protéica, respectivamente (Fig. 2C), já nas ratas tratadas com 2,0 e 4,0 mg de deltametrina/Kg correspondendo 0,8 e 1,6 ml de Decis<sup>®</sup> 25CE, respectivamente, além de congestão, havia degeneração vacuolar dos hepatócitos, hiperplasia das células de Kupffer com focos nos espaços porta, os quais apresentam colangite (Fig. 2D-2F).

Nos pulmões foi observada reação inflamatória com presença de macrófagos e predomínio de polimorfonucleados, caracterizando bronquiolite purulenta com exudato no interior, peribronquiolite e perivasculite com processo inflamatório por macrófagos e

linfócitos nas ratas tratadas com doses de 185 e 370mg/100g de XenTari<sup>®</sup> WG (Fig. 3B e 3C). Já nas ratas tratadas com 2,0 e 4,0mg de deltametrina/kg foi observado espessamento dos septos caracterizando moderada pneumonia intersticial, com reação inflamatória ao redor dos bronquíolos e vasos, apresentando infiltrado peribronquiolar bem característico; além disso, também foi diagnosticada pneumonia multifocal por macrófagos, distribuída em várias áreas do lóbulo (Fig. 3D, 3E e 3F) quando comparadas ao grupo controle (Fig. 3A).

### *3.2 Morfologia dos neonatos e fertilidade*

A análise macroscópica dos neonatos não mostrou nenhum indício de malformação na cabeça, membros, tórax e abdome. Também não foram observados abortos. Na tabela 1 constam os dados referentes às médias do número, comprimento e peso dos neonatos. Não houve diferença estatística significativa para os parâmetros comprimento e peso dos neonatos, porém verificaram-se diferenças com relação ao número de neonatos, onde as maiores dosagens dos dois inseticidas analisados ocasionaram redução significativas em relação ao controle e ao grupo tratado com dose de 18,5mg de XenTari<sup>®</sup>.

## **4. Discussão**

Dados contraditórios foram observados na presente pesquisa, pois foi evidenciado que doses subletais do inseticida biológico produziram alterações histopatológicas expressivas nos rins, fígado e pulmões de ratas tratadas no início da prenhez, semelhantemente às doses subletais do inseticida sintético, caracterizadas por processos inflamatórios. Também houve redução no número de filhotes justamente nos grupos que receberam as maiores dosagens experimentais.

As alterações produzidas pelo inseticida biológico nos rins refletem os efeitos das toxinas sobre o sistema imunológico pela proliferação das células mesangiais e infiltração destas no tecido o que levaram a diminuição ou ausência dos espaços de Bowman caracterizando a glomerulonefrite membranoproliferativa reduzindo assim, a capacidade funcional dos néfrons. A atuação da toxina do *Bt* sobre o sistema imune é reportada por Hayakawa et al. [22], que verificaram em culturas de células renais humanas submetidas a cepas da bactéria *Bt*, estímulo para a ativação de células linfocitárias. Além disso, outras pesquisas relataram também alterações histológicas na cápsula de Bowman e diâmetro dos glomérulos, levando a diminuição das funções renais da prole da terceira geração de ratas alimentadas durante a prenhez e lactação, com milho transgênico e toxinas *Bt* [23,24].

Pesquisas têm revelado também que as toxinas *Bt* atuam em cultura de hepatócitos de mamíferos aumentando a produção de lactato desidrogenase (LDH), que danifica as células endoteliais dos sinusóides levando à dilatação do lúmen sinusoidal em doses de aproximadamente 2,0ng/ml após 24 e 48h de incubação [25,26]. Este fato pode justificar o discreto aumento dos espaços sinusóides observado no presente estudo, ocasionado por ingestão de doses subletais de 185 e 370 mg/100g de XenTari<sup>®</sup>. Outras pesquisas têm mostrado que o inseticida Dipel<sup>®</sup> (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) tem a capacidade de alterar o comportamento de defesa das células do fígado, induzir o estresse oxidativo, estimular a peroxidação lipídica, devido à formação de radicais livres, e danificar as membranas celulares dos hepatócitos em ratos, levando conseqüentemente à reação inflamatória e atividade das células de Kupffer após aplicação na mesma dosagem experimental utilizada no presente estudo [19,27].

A necrose focal nodular do tipo coagulativa com intensa reação e hiperplasia difusa das células de Kupffer, resultou da ação inflamatória das toxinas do *Bt*, pois essas células são macrófagos residentes que têm como funções metabolizar eritrócitos velhos, digerir hemoglobina, secretar proteínas relacionadas com o sistema imunológico, ou seja, atuam como células de defesa no fígado [28].

Com relação ao inseticida sintético a literatura reporta testes toxicológicos para doses bem acima das utilizadas no presente estudo, dando ênfase aos aspectos fisiopatológicos sem levarem em consideração as alterações morfológicas, como por exemplo, Manna et al. [29], que citaram aumento do número de neutrófilos, linfócitos e monócitos nos rins levando posteriormente a glomerulonefrite e hemorragia em ratos quando submetidos ao piretróide da mesma classe que a deltametrina, a cipermetrina, na dose de 14,5mg/Kg (1/10 da DL<sub>50</sub>) durante 30 dias. Doses orais de deltametrina de 5,6mg/Kg e 18mg/Kg durante 15 dias, também levaram a diminuição da glutathione (GSH), que é extremamente importante para desintoxicação nos rins, fígado e pulmões. Esta diminuição da GSH reflete em aumento da peroxidação lipídica e vulnerabilidade do organismo quanto ao funcionamento do sistema imunológico, levando conseqüentemente a doenças oportunistas, além de estresse oxidativo [30]. Devemos mencionar ainda que além da diminuição desta substância, foi identificado por Eraslan et al. [31], o aumento dos níveis de creatinina e fósforo no sangue de ratos que receberam de 7,5mg/Kg a 30mg/Kg de deltametrina no alimento. O aumento na concentração sanguínea da creatinina corresponde a diminuição da taxa de filtração glomerular e disfunção dos néfrons. A deltametrina também tem como característica causar alteração da diferença de potencial dos canais de sódio das membranas celulares, causando disfunção renal [32,33].

Fetoui et al. [34] quando utilizaram deltametrina na dosagem de 668ppm (1/10 da DL50) via intraperitoneal evidenciaram além da dilatação do lúmen dos sinusóides, infiltração de células inflamatórias, degeneração dos hepatócitos e aumento da enzima LDH. O efeito causado pela deltametrina observado por estes pesquisadores justifica a colangite dos espaços porta, que são agregações de células inflamatórias, especialmente ao redor de ductos biliares e presença de fibrose, a qual ocorre no fígado como resposta à necrose e à inflamação, que pode ser seguida por uma fibrose como consequência de uma agressão tóxica ou inflamatória [35]. Outra hipótese para justificar essas lesões no fígado em decorrência da deltametrina são alterações das hidrolases e biotransformação das vesículas microsossomais, além de aumento dos níveis de aspartato transmitase (AST), alanina transmitase (ALT), Lactato desidrogenase, que são substâncias que indicam sintomas de intoxicação, dano ou disfunção no tecido hepático ou pneumócitos. Estas substâncias foram observadas quando ratos foram submetidos a doses orais de 12mg/Kg 4 vezes por semana por três semanas ou quando cabras foram banhadas em soluções de 0,8 a 1,6% uma vez ao dia durante 75 dias [36,37]. Além disso, doses baixas de deltametrina, de 1,28mg/Kg via oral em ratos durante 30 dias ocasionaram insuficiência hepática levando à diminuição da albumina e globulina, as quais atuam como transportadoras de hormônios e outras substâncias fundamentais para o funcionamento normal do organismo [38].

Nas ratas tratadas com doses de 185 e 370 mg/100g de XenTari<sup>®</sup> WG, e nas ratas tratadas com 2,0 e 4,0mg de deltametrina/kg, observou-se alterações histopatológicas nos pulmões bastante expressivas, caracterizadas por bronquiolite purulenta, peribronquiolite e perivasculite, pneumonia intersticial, infiltrado peribronquiolar e pneumonia multifocal por macrófagos.

Alterações semelhantes também foram percebidas nos pulmões de ratos que receberam intratraquealmente unidades formadoras de colônias de  $3,9 \times 10^5$  a  $1,2 \times 10^7$  de proteína *Bt* purificada nas doses de 0,4mg/Kg a 9,6mg/Kg em única dose, resultando em alterações histológicas dose dependentes e alterações como inflamação nos bronquíolos e alvéolos com infiltrado celular e aglomerados de neutrófilos [39,40]. Sabe-se também que as toxinas desta bactéria levam ao aumento sérico das substâncias pró-inflamatórias, podendo levar até a morte dos animais, se as doses de esporos forem dadas acima de  $10^8$  esporos intranasalmente, induzindo a hemorragia e infiltração inflamatória pulmonar [41,42].

Já o inseticida sintético é relatado em pesquisas por possuir, além de atividade pró-inflamatória, alteração sobre os pneumócitos do tipo II levando a hiperplasia destas células, as quais são responsáveis pela produção do surfactante pulmonar e estão envolvidas na limpeza do tecido. A aplicação de deltametrina spray aerossol por 30 minutos diários durante 45 dias nas doses de 06 e  $12 \text{mg/m}^3$  promoveram além de pneumonia intersticial, bronquíolos respiratórios com substância vascular e edema perivascular e hiperplasia peribronquiolar do tecido linfóide [43], danos semelhantes observados na atual pesquisa com as doses de 2,0 e 4,0mg/Kg administradas por apenas 7 dias via oral. Já outras pesquisas revelaram além da alteração sobre os pneumócitos, sintomas pró-inflamatórios, quando foram aplicadas doses próximas à aguda, de 125 a 225mg/kg, levando à conclusão pelos autores, após 30 dias de pesquisa, que a deltametrina causa enfisema pulmonar e é capaz de elevar os níveis de AST, LDH, ALT etc, substâncias que indicam intoxicação [44], justificando desta maneira a presença de infiltrado peribronquiolar e pneumonia multifocal por macrófagos nos lóbulos pulmonares.

Interessante mencionar que pesquisa recente aplicando-se deltametrina mostrou diferença quanto à deposição nos tecidos, sendo dose dependente quanto à distribuição pelos tecidos, mas não proporcional à dose, assim justificando, de certa maneira, reações semelhantes entre os diferentes tratamentos quando se observou o tecido adiposo, muscular esquelético, epitelial e gastrintestinal em ratos nas doses entre 0,4; 2 e 10mg/Kg intravenoso [45].

Pôde ser observado que houve processo inflamatório nos animais submetidos tanto ao inseticida sintético quanto ao biológico, nos rins, fígado e pulmões. Também houve redução no número de filhotes justamente nos grupos que receberam as maiores dosagens experimentais, quando foram aplicados os inseticidas durante toda a prenhez. Esta redução pode ser justificada pelo fato de os inseticidas terem causado processo pró-inflamatório nas ratas, pois, segundo Fierros et al. [46], toxinas protéicas *Bt Cry1Ac* podem provocar respostas do sistema imunológico a nível sistêmico em diversos locais, como no aparelho reprodutor, após aplicação de 100µg via intraperitoneal e intravaginal. Também foi observado que esta mesma toxina é um potente indutor específico da resposta imune em tecidos mucosos [47].

Assim, da mesma maneira que os inseticidas biológicos a base de *Bt*, inseticidas piretróides do tipo II são também considerados pró-inflamatórios, pesquisadores comprovaram que estes inseticidas podem levar a alteração dos níveis de hormônios corticosteróides no plasma em doses de 3mg/Kg de cialotrina por 7 dias em ratos [48], e alterar os níveis de hormônios sexuais, como FSH e LH, sendo estes de maneira proporcional em relação a quantidade de substâncias piretróides eliminadas pela urina e a nível sérico de homens adultos [12], mostrando a capacidade destes inseticidas atuarem sobre o sistema reprodutor.



Como se sabe, o sucesso da implantação depende de diversos fatores, entre eles a expressão temporariamente definida de moléculas específicas. A implantação do blastocisto é sempre precedida por um aumento da permeabilidade vascular para formação dos sítios de implantação, o que aumenta o contato do útero com todas as substâncias presentes a nível vascular. Além da importância da atuação hormonal, como a progesterona na manutenção da decidualização e desenvolvimento do processo de implantação, pois todos estes fatores são primordiais ao bom estabelecimento gravídico do animal [49].

Em conclusão, percebeu-se que tanto o inseticida biológico, quanto o químico ocasionaram lesões caracterizadas por reações inflamatórias, inclusive levando a redução do número da prole, indicando assim que ambos os inseticidas atuam de maneira semelhante nos rins, fígado e pulmões, bem como na fertilidade quando aplicadas doses que não ocasionam sintomas clínicos de intoxicação em ratas albinas.

## **Referências**

- [1] Siegel JP. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*- Based insecticides. *J Invert Pathol* 2001; 77:13-21.
- [2] Juberg DR, Herman RA, Thomas J, Brooks KJ, Delaney B. Acute and repeated dose (28 day) mouse oral toxicology studies with Cry34Ab1 and Cry35Ab1 *Bt* proteins used in coleopteran resistant DAS-59122-7 corn. *Regulat Toxicol Pharmacol* 2009; 54:154-163.
- [3] Bravo A, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use In: *Comprehensive molecular insect science*. Elsevier BV, Amsterdam. 2005; 175-206.

- [4] Bravo A, Gill SS, Soberón, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 2007; 49:423-435.
- [5] Tayabali AF, Seligy VL. Human cell exposure assays of *Bacillus thuringiensis* commercial insecticides: Production of *Bacillus cereus*-Like cytolytic effects from outgrowth of spores environmental health perspectives 2000; 108:1-10.
- [6] Levin DB, Côté JC, Otvos IS, Schwartz JL, Vincent C. Human Health Impact Assessment after Exposures to *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki*. 6th Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Environmental Impact, Victoria B. C. 2005; 61-63.
- [7] Domingo JL. Health risks of GM foods: Many options but few data. *Science* 2000; 288:1748-1749.
- [8] Janer G, Slob W, Hakkert BC, Vermeire T, Piersma AH. A retrospective analysis of developmental toxicity studies in rat and rabbit: What is the added value of the rabbit as an additional test species? *Regul Toxicol Pharmacol* 2008; 50:206-217.
- [9] Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. Review. *Vet J* 2009; 182:7-20.
- [10] Breckenridge CB, Holden L, Sturgess N, et al. Evidence for a separate mechanism of toxicity for the Type I and the Type II pyrethroid insecticides. *NeuroToxicol* 2009; 30S:S17-S31.
- [11] Elhalwagya MEA, Zakib NI. Comparative study on pesticide mixture of organophosphorus and pyrethroid in commercial formulation. *Environment Toxicol Pharmacol* 2009; 28:219-224.
- [12] Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men. *Reprod Toxicol* 2009; 7:155-160.

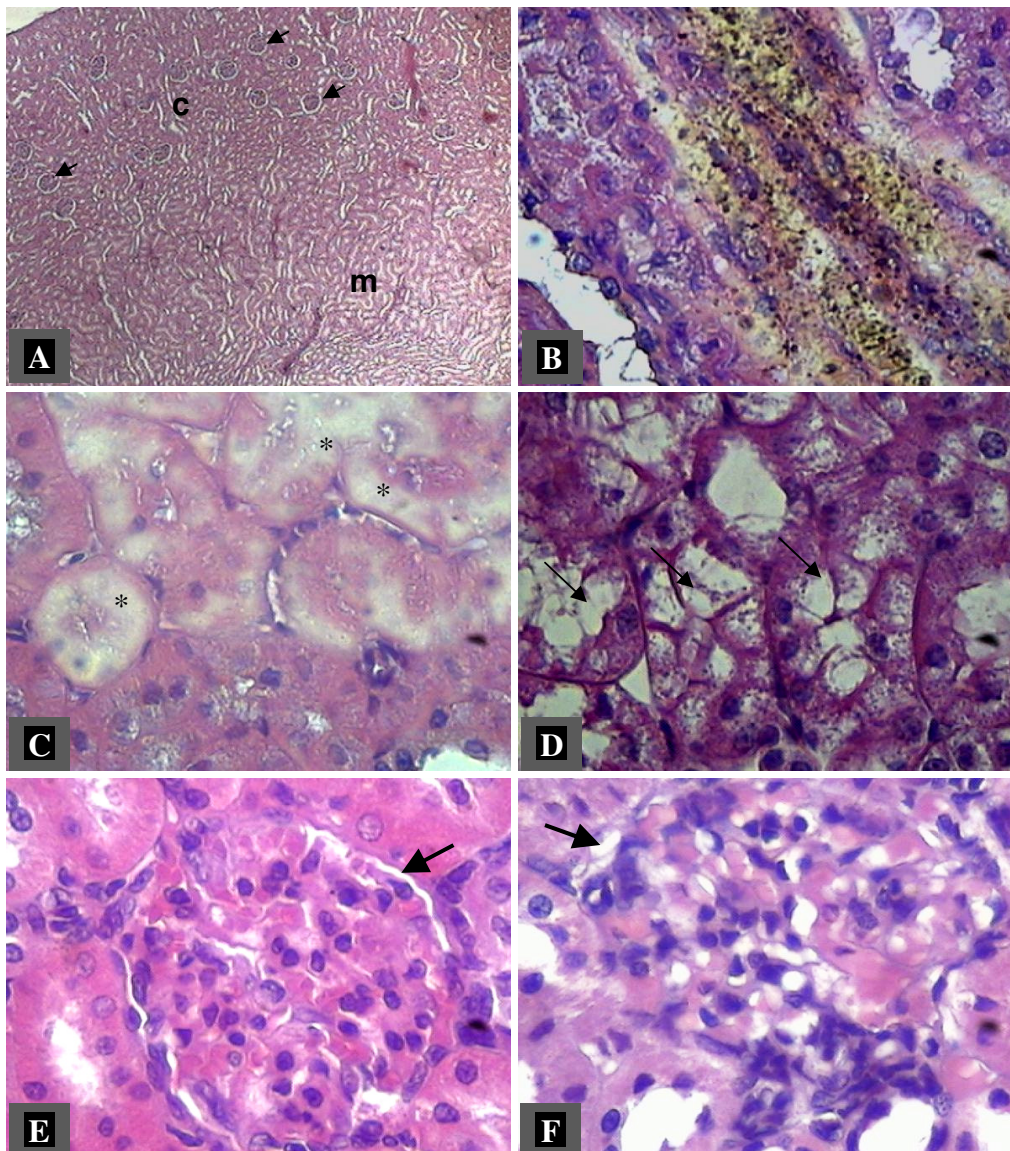
- [13] Miksys S, Lerman C, Shields PG, Mash DC, Tyndale RF. Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain. *Neuropharmacol* 2003; 45:22-132.
- [14] Anand SS, Bruckner JV, Haines WT, Muralidharaa S, Fisher JW, Padilla S. Characterization of deltamethrin metabolism by rat plasma and liver microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 212:156-166.
- [15] Hodgson E, Rose RL. The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals. *Pharmacol Therap* 2007; 113:420-428.
- [16] Yang D, Wang X, Chen YT, Deng R, Yan B. Pyrethroid insecticides: Isoform-dependent hydrolysis, induction of cytochrome P450 3A4 and evidence on the involvement of the pregnane X receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 237:49-58.
- [17] Garcia GE, Almeida W. Rural workers exposure to pesticides in Brazil. *Rev. Bras Saúde Ocup* 1991; 19:7-11.
- [18] Branco AM, Vainsencher SA. Imprescindíveis e discriminadas: As trabalhadoras rurais na fruticultura do Vale do São Francisco. Fundação Joaquim Nabuco. 2001. Disponível em: <<http://www.race.nuca.ie.ufrj.br>> Acesso 14 dez. 2007.
- [19] Shaban NZ, Helmy MH, El-Kersh MAR, Mahmoud BF. Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin on hepatic lipid peroxidation and free-radical scavengers in rats given alpha-tocopherol or acetylsalicylate. *Comp Biochem Physiol Part C* 2003; 135:405-414.
- [20] Andrade AJM, Araújo S, Santana GM, Ohi M, Dalsenter PR. Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Regul Toxicol Phamacol* 2002; 36:310-317.

- [21] Environmental Protection Agency - EPA - U.S. Notice of filing a pesticide petition to establish a tolerance for certain pesticide chemicals in or on food. Federal Register Document 65. 2000; 8143-8149.
- [22] Hayakawa T, Kanagawa R, Kotani Y, et al. Parasporin-2ab, a newly isolated cytotoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. Current Microbiol 2007; 55:278-283.
- [23] Séralini GE, Cellier D, DeVendomois JP. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. Arch Environ Contam Toxicol 2007; 52:596-602.
- [24] Kiliç A, Akay MT. A three generation study with genetically modified *Bt* corn in rats: Biochemical and histopathological investigation. Food Chem Toxicol 2008; 46:1164-1170.
- [25] Shimada N, Kim YS, Miyamoto K, Yoshioka M, Murata H. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells. J vet Med Sci 2003; 65:187-191.
- [26] Sun X, Kimura T, Kobayashi T, et al. Viability of liver grafts from fasted donor rats: relationship to sinusoidal endothelial cell apoptosis. J Hep Bill Pancr Surg 2001; 8:268-273.
- [27] Ito A. Cytocidal Actions of Parasporin-2, an Anti-tumor Crystal Toxin from *Bacillus thuringiensis*. Biol Chem 2006; 281:26350-26360.
- [28] Takiya CM, Borojevic R. Hepatócitos. In: Carvalho, H. F.; Collares-Buzato, C. B. Células: Uma abordagem multidisciplinar. Barueri, SP: Manole, 2005; 12:146-155.
- [29] Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK, Das S. Repeated dose toxicity of alfa-cypermethrin in rats. J Vet Sci 2004; 5:241-245.

- [30] Rehman H, Ali M, Atif F, Kaur M, Bhatia K, Raisuddin S. The modulatory effect of deltamethrin on antioxidants in mice. *Clin Chim Acta* 2006; 369:61-65.
- [31] Eraslan G, Bilgili A, Essiz D, Akdogan M, Sahindokuyucu F. *Pest Biochem Physiol* 2007; 87:123-130.
- [32] Meacham CA, Brodfuehrer PD, Watkins JA, Shafer TJ. Developmentally-regulated sodium channel subunits are differentially sensitive to  $\alpha$ -cyano containing pyrethroids. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 231:273-281.
- [33] Peng F, Mellor IR, Williamson MS, Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR. Single channel study of deltamethrin interactions with wild-type and mutated rat Na<sub>v</sub>1.2 sodium channels expressed in *Xenopus oocytes*. *NeuroToxicol* 2009; 30:358-367.
- [34] Fetoui H, Garoui EM, Zeghal N. Lambda-cyhalothrin-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: Ameliorative effect of ascorbic acid. *Exp Toxic Pathol* 2009; 61:189-196.
- [35] Maclachlan NJ, Cullen JM. Fígado, sistema biliar e pâncreas exócrino. In: Carlton WW, Mcgavin MD. *Patologia veterinária de Thomson*. 02.ed. Porto Alegre: Artmed, 1995; 2:95-131.
- [36] Lamfon HA. Effect of silymarin against deltamethrin - induced histological and biochemical changes in liver of albino rats. *Indian J Exp Biol* 2007; 3:165-169.
- [37] Khan A, Faridi HAM, Ali M, et al. Effects of cypermethrin on some clinico-hemato-biochemical and pathological parameters in male dwarf goats (*Capra hircus*). *Experiment Toxicol Pathol* 2009; 61:151-160.
- [38] Yousef MI, Awad TI, Mohamed EH. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicol* 2006; 227:240-247.

- [39] Tsai SF, Liu BL, Liao JW, et al. Pulmonary toxicity of thuringiensin administered intratracheally in Sprague-Dawley rats. *Toxicol* 2003; 186:205-216.
- [40] Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti EF, Senesi S. *Bacillus thuringiensis* pulmonary infection: critical role for bacterial membrane-damaging toxins and host neutrophils. *Microb Infect* 2007; 9:591-598.
- [41] Hernandez E, Ramisse F, Cruel T, Vagueresse R, Cavallo JD. *Bacillus thuringiensis* serotype H34 isolated from human and insecticidal strains serotypes 3a3b and H14 can lead to death of immunocompetent mice after pulmonary infection. *Federation of European Microbiological Societies - FEMS Immunol. Med Microbiol* 1999; 24:43-47.
- [42] Tsai SF, Yang C, Liu BL, Hwang JS, Ho SP. Role of oxidative stress in thuringiensin-induced pulmonary toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 216:347-353.
- [43] Erdogan S, Zeren EH, Emre M, Aydin O, Gumurdulu D. Pulmonary effects of deltamethrin inhalation: an experimental study in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006; 63:318-323.
- [44] Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK, Das S. Repeated dose toxicity of deltamethrin in rats. *Indian J Pharmacol* 2005; 37:160-164.
- [45] Kim KB, Anand SS, Kim HJ, White CA, Bruckner JV. Toxicokinetics and tissue distribution of deltamethrin in adult Sprague-dawley rats. *Toxicol Sci* 2008; 101:197-205.
- [46] Fierros LM, Ordóñez PI, Morales PM. Slight influence of the estrous cycle stage on the mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* in mice. *Life Sci* 2002; 71:2667-2680.

- [47] Vázquez-Padrón RIV, Fierros LM, Bazán LN, Gil AFM, DeLaRiva GA, Revilla RL. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice Immunogenicity of Cry1Ac. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33:147-155.
- [48] Righi, D. A.; Palermo-Neto, J. Behavioral effects of type II pyrethroid cyhalothrin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 191:167-176.
- [49] Zorn TMT. Células decíduais. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB. *Células. Uma abordagem multidisciplinar*. Barueri, SP: Manole. 2005; 27:346-356.



Figural: Rins das ratas dos grupos experimentais. A) Região cortical (c) e medular (m) do rim bem preservadas (grupo controle). H.E.  $\pm$  42X. B) Deposição de hemossiderina nos túbulos coletores nos rins de ratas tratadas com 185mg/100g de XenTari<sup>®</sup>. H.E.  $\pm$  428X. C) Necrose dos túbulos contorcidos (\*) caracterizados por ausência dos núcleos e coloração pálida das células, ratas tratadas com 370mg/100g de XenTari<sup>®</sup>. H.E.  $\pm$  428X. D) Degeração vacuolar dos túbulos contorcidos (seta), ratas tratadas com 370mg/100g de XenTari<sup>®</sup>. H.E.  $\pm$  428X. E) Glomerulonefrite membranoproliferativa com redução dos espaços de Bowman (18,5 e 185mg/100g XenTari<sup>®</sup> e 1 e 2mg/Kg deltametrina). H.E.  $\pm$  428X. F) Glomerulonefrite membranoproliferativa com ausência dos espaços de Bowman (370mg/100g XenTari<sup>®</sup> e 4mg/Kg deltametrina). H.E.  $\pm$  428X.



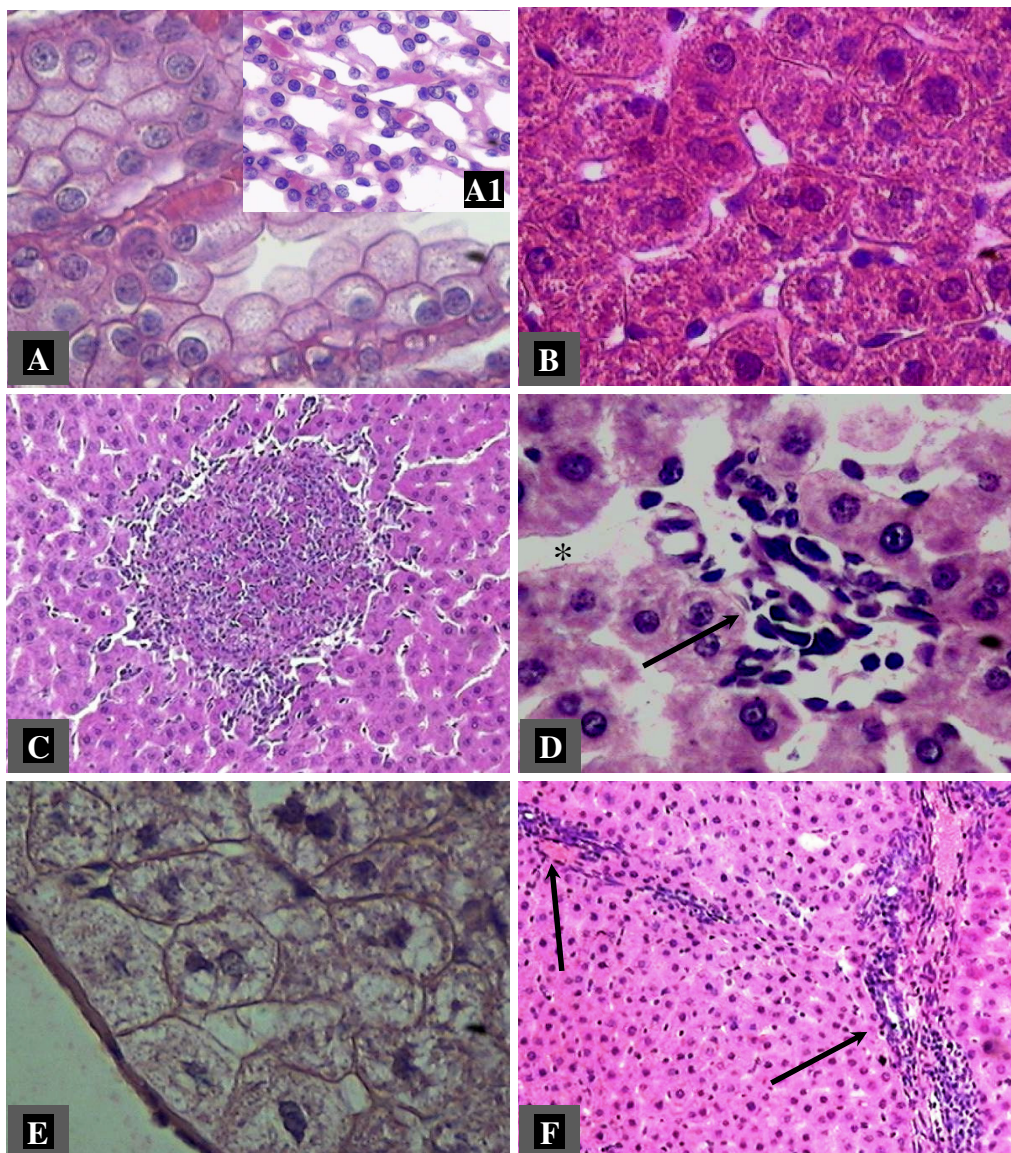


Figura 2: Rins e fígado das ratas dos grupos experimentais. A) Hipertrofia e hiperplasia com estratificação das células dos túbulos coletores nos rins das ratas tratadas com 370mg/100g de XenTari<sup>®</sup>. Aspecto normal de túbulos coletores, epitélio simples cúbico [A1]. H.E.  $\pm$  428X. B) Fígado do grupo controle bem preservado. H.E.  $\pm$  428X. C) Necrose focal nodular do tipo coagulativa com intensa reação de células de kupffer e escassas células mononucleares (185 e 370mg/100g XenTari<sup>®</sup>). H.E.  $\pm$  107X. D) Discreto aumento dos espaços sinusóides característica de congestão(\*) e hiperplasia difusa das células de Kupffer [seta] (370mg/100g XenTari<sup>®</sup>). H.E.  $\pm$  428X. E) Degeneração vacuolar dos hepatócitos (2 e 4mg/Kg deltametrina). H.E.  $\pm$  428X. F) Colangite dos espaços porta [setas] (2 e 4mg/Kg deltametrina) característico de reação inflamatória. H.E.  $\pm$  107X.

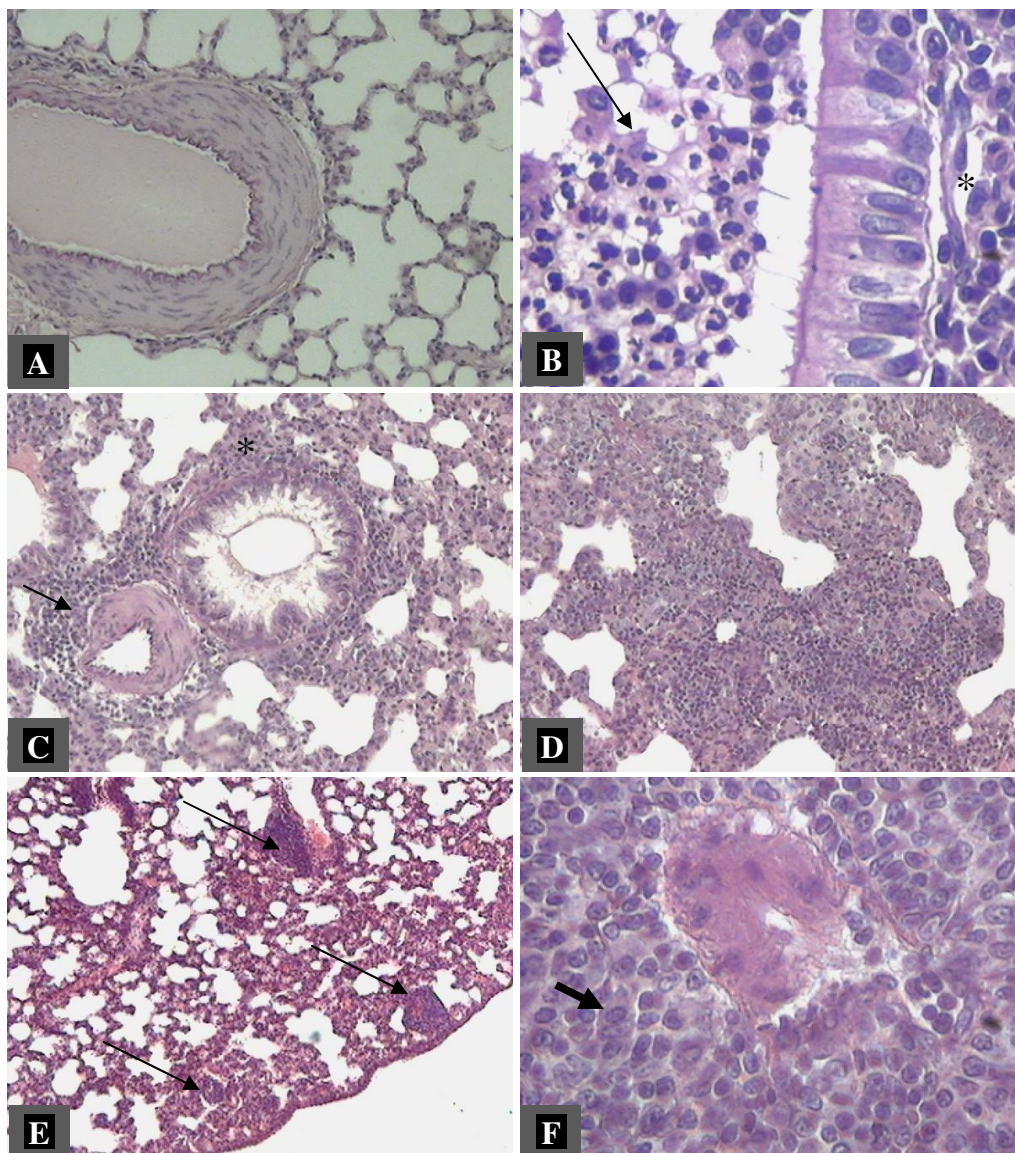


Figura 3: Pulmões das ratas dos grupos experimentais. A) Região vascular e alvéolos normais do grupo controle. H.E.  $\pm$  107X. B) Bronquiolite purulenta, mostrando exsudato com células polimorfonucleares (seta) e peribronquiolite (\*) (185 e 370mg/100g XenTari<sup>®</sup>). H.E.  $\pm$  428X. C) Peribronquiolite (\*) e perivascularite [seta] (185 e 370mg/100g XenTari<sup>®</sup>). H.E.  $\pm$  107X. D) Espessamento dos septos caracterizando pneumonia intersticial (2,0 e 4,0mg/Kg deltametrina). H.E.  $\pm$  107X. E) Pneumonia multifocal [setas longas] (2,0 e 4,0mg/Kg deltametrina). H.E.  $\pm$  107X. F) Detalhe do foco de pneumonia constituído por macrófagos [seta larga] (2,0 e 4,0mg/Kg deltametrina). H.E.  $\pm$  107 e 428X.

**Tabela 1**

Média ( $\pm$  desvio padrão) do número, comprimento e peso dos neonatos nos grupos experimentais.

Grupos	Número	Comprimento	Peso
G I-	12,00 $\pm$ 1,58a	6,17 $\pm$ 0,28a	6,14 $\pm$ 0,41a
G II	11,60 $\pm$ 0,89a	5,92 $\pm$ 0,37a	5,57 $\pm$ 0,34a
G III	8,60 $\pm$ 1,67ab	6,30 $\pm$ 0,05a	5,80 $\pm$ 0,31a
G IV	6,20 $\pm$ 1,09b	6,16 $\pm$ 0,69a	5,97 $\pm$ 0,96a
G V	8,20 $\pm$ 2,20ab	6,15 $\pm$ 0,95a	6,19 $\pm$ 0,56a
G VI	7,80 $\pm$ 1,48ab	6,32 $\pm$ 0,26a	6,10 $\pm$ 0,30a
G VII	4,80 $\pm$ 2,58b	6,52 $\pm$ 0,35a	6,31 $\pm$ 0,84a
Estatística <sup>1</sup>			
F <sup>P</sup>	24,489 <sup>0,0004</sup>	9,489 <sup>0,1479</sup>	6,606 <sup>0,3589</sup>

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ( $P > 0,05$ ).

## Anexos

---



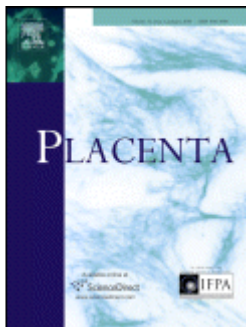
<http://www.elsevier.com>

[Browse Journals](#) > [Placenta](#) > Guide For Authors

## Placenta

The Official Journal of the [International Federation of Placenta Associations](#) incorporating the following:






- Australia and New Zealand Placenta Research Association
- European Placenta Group
- Japanese Placenta Association
- the Placenta Association of the Americas



ISSN: 0143-4004

Imprint: ELSEVIER

Actions

-  [Submit Article](#)
-  [Order Journal](#)
-  [Free Sample Issue](#)
-  [Recommend to Friend](#)
-  [Bookmark this Page](#)

Statistics

[Impact Factor:](#) 2.775

[Issues per year:](#) 12

**Additional Information**

- [Related Publications](#)

- [Editorial Board](#)
- [Contact the Publisher](#)
- [Login to Editorial System](#)
- [Journal Online](#)
- [Reproductive and Women's Health Resource Online](#)
- [Advertisers Media Kit](#)

## Readers

- [Order Journal](#)
- [Access Full-Text](#)
- [Free Sample Issue](#)
- [Volume/Issue Alert](#)
- [Free Tables of contents and abstracts](#)

## Authors

- [Authors Home](#)
- [Submit an Article](#)
- [Track Your Accepted Articles](#)
- [Guide for Authors](#)
- [Artwork instructions](#)
- [Authors Rights](#)
- [Funding Bodies Compliance](#)

## Librarians

- [Librarians Home](#)
- [Ordering Information and Dispatch Dates](#)
- [Abstracting/Indexing](#)

## Editors

- [Editors Home](#)
- [Article Tracking for Editors](#)
- [Ethics Questions \(PERK\)](#)

## Reviewers

- [Reviewers Home](#)

## Advertisers/Sponsors

- [Advertisers Home](#)

## Societies

- [Society Home](#)

- [IFPA](#)

## Guide for Authors

The Official Journal of the [International Federation of Placenta Associations](#) incorporating the following:

- Australia and New Zealand Placenta Research Association
- European Placenta Group
- Japanese Placenta Association
- the Placenta Association of the Americas

INCLUDES [TROPHOBLAST RESEARCH](#), the Annual Supplement that is available for free online.

### INTRODUCTION

- [Types of papers](#)
- [Contact details for submission](#)

### BEFORE YOU BEGIN

- [Ethics in Publishing](#)
- [Policy and ethics](#)
- [Conflict of interest](#)
- [Submission declaration](#)
- [Contributors](#)
- [Copyright](#)
- [Retained author rights](#)
- [Role of the funding source](#)
- [Funding body agreements and policies](#)

- [Language and language services](#)

- [Patient details](#)

- [Submission](#)

- [Referees](#)

### PREPARATION

- [Use of wordprocessing software](#)

- [LaTeX](#)

- [Article structure](#)

- [Essential title page information](#)

- [Abstract](#)

- [Keywords](#)

- [Abbreviations](#)

- [Acknowledgements](#)

- [Nomenclature and units](#)

- [Accession numbers](#)

- [Footnotes](#)

- [Artwork](#)

- [Tables](#)

- [References](#)

- [Supplementary and multimedia data](#)

- [Submission checklist](#)

### AFTER

### ACCEPTANCE

- [Use of the Digital Object Identifier](#)

- [Proofs](#)

- [Offprints](#)

### AUTHOR INQUIRIES



## Introduction

PLACENTA invites submission of full-length papers and short communications of high quality research that provide novel insight into any aspect of placental biology. Technical notes are welcome if a new technique or methodology is described that

clarifies or expands experimental studies. Case reports are acceptable if they illustrate a key point about placental biology, yet should not include an extensive literature review. Book reviews and letters to the Editors are selectively published. Letters to the Editors may comment on any issue important to placentology, including comments about articles published in *PLACENTA* or may communicate isolated findings that do not justify publication as a short communication. Reviews (Current Topics) and topic overviews (Current Opinion) are usually solicited by the Editors.

*PLACENTA* covers all aspects of the human and animal placenta including evolution, development, histology, physiology, metabolism, endocrinology, microbiology, pathology, immunology, pharmacology, cell biology, biochemistry, and molecular mechanisms underlying placental function. We welcome articles describing clinical aspects of placental structure or function and studies of implantation, comparative placentation, fetoplacental interactions, trophoblastic neoplasia and placental vascular biology. Authors should justify use of cell lines as models for trophoblast function.

All manuscripts should be written in English and each will be evaluated in a similar manner, irrespective of country of origin. Neither the journal, nor the publisher will assume any responsibility for statements in the articles, which are the sole responsibility of the authors.

Unless requested otherwise, manuscripts from Africa and Europe will be handled by Graham Burton (Cambridge, UK) and those from the Americas, Asia and Australia by D. Michael Nelson (St. Louis, USA)

### **Types of papers**

*Original articles:* a full-length report of original basic or clinical investigation that provides novel insight and places the findings in a mechanistic, functional, or evolutionary context (2000-3000 words, up to 45 references, and up to 6 tables and/or figures). A structured abstract of no more than 250 words with the following sections (objectives, study design, main outcome measures, results, conclusions) is required. The rest of the paper should be structured as follows: Introduction, Methods, Results, Discussion, References.

*Short communications/Technical notes:* descriptive studies or methodological advances must not exceed 1,000 words with no more than two (2) tables or illustrations and twenty-five (25) references. An unstructured abstract of no more than 100 words is required. The text should also be structured in four parts: Introduction, Methods, Results and Discussion, but the Results and Discussion sections may be combined.

*Review articles:* a comprehensive review of prior publications relating to an important clinical subject (2000-3000 words and 30-50 references). An unstructured abstract of no more than 250 words is required. The Introduction should indicate why the topic is important and should state the specific objective(s) of the review. The Conclusion should include the clinical implications and observations regarding the need for additional research. Systematic reviews should follow the QUOROM guidelines. Meta-analysis of observational studies should follow the MOOSE guidelines.



*Case reports*: must not exceed 1,000 words and ten (10) references and two (2) tables and/or figures.

*Letters to the Editor*: a question or challenge to an article published recently in the journal. Letters must be received within 6 weeks of publication of the article to which they refer and should be no longer than 250 words with up to 7 references and 1 figure and/or table.

### **Contact details for submission**

Submission of manuscripts proceeds entirely online at [⇒http://ees.elsevier.com/plac](http://ees.elsevier.com/plac)



### **Before You Begin**

### **Ethics in Publishing**

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see [⇒http://www.elsevier.com/publishingethics](http://www.elsevier.com/publishingethics) and [⇒http://www.elsevier.com/ethicalguidelines](http://www.elsevier.com/ethicalguidelines).

### **Policy and ethics**

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* [⇒http://www.wma.net/e/policy/b3.htm](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm); *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments* [⇒http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm); *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* [⇒http://www.icmje.org](http://www.icmje.org). This must be stated at an appropriate point in the article.

### **Conflict of interest**

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

### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other

language, without the written consent of the copyright-holder.

## **Contributors**

Submission of multi-authored manuscripts to this journal requires the consent of each author and all have to sign the covering letter. All authors of, and all contributors (including medical writers and editors) must specify their individual contributions at the end of the text. The following format is suggested: 'I declare that I participated in the (here list contributions made to the study) and that I have seen and approved the final version. I have the following conflicts of interest' (list here all relevant conflicts and source of funding). This should be listed in the 'Comments' field in EES.

## **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

## **Retained author rights**

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

## **Role of the funding source**

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

## **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more

about existing agreements and policies please visit

☞ <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Language and language services**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit

☞ <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at

☞ <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

### **Patient details**

Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission. For further information see ☞ <http://www.elsevier.com/patientphotographs>.

### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal, ☞ <http://ees.elsevier.com/plac>, you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editors' decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

### **Referees**

To expedite the review process Authors are required to provide the editorial office with the names and email addresses of up to 5 potential Referees that are able to competently review the article submitted for possible publication. The Referees are not to be associated with or involved with the article in any way or be from the same institution as the Author(s) involved with the article.



## **Preparation**

### **Use of wordprocessing software**

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed

"graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier:

⇒<http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

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

## **LaTeX**

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively the standard document class "article".

The Elsevier LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: ⇒<http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

## **Article structure**

### ***Introduction***

The Introduction should describe the question addressed by the report, the relevant background and must state the objective of the research. The literature review should be relevant but not detailed.

### ***Materials and methods***

The Methods section should describe the research methodology in sufficient detail that others could reasonably be expected to be able to duplicate the work. However, if the methodology has been previously published, the appropriate reference should be cited, and a full description is not required. The sequences of oligonucleotides, if not previously published, should be provided. Novel DNA or protein sequences should be deposited in an appropriate database (eg, Genbank, EMBL, SWISS-PROT), with the accession numbers included in the manuscript (see below). Provide suppliers' names for all antibodies used. Methods of statistical analysis should be identified and, when appropriate, the basis for their selection stated. Statistical software programs used should be cited in the text. *P* values should be expressed to no more than three decimal places. Reports in which statistical difference is lacking must provide some indication of the study's power to detect such differences, and this information must be included in the abstract.

### ***Results***

The Results section should present the findings in appropriate detail. Tables and figures may be used, but duplication between text and tables or figures is to be avoided.

### ***Discussion***

The Discussion section should be used to critically appraise the implications of the findings and to compare them with those of other studies. Repetition of the results section should be avoided.

### ***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.

### **Essential title page information**

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- ***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.

### **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.).

### **Nomenclature and units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents:

☞ <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

### **Accession numbers**

Accession numbers are unique identifiers in bioinformatics allocated to nucleotide and protein sequences to allow tracking of different versions of that sequence record and the associated sequence in a data repository [e.g., databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine ('GenBank') and the Worldwide Protein Data Bank]. There are different types of accession numbers in use based on the type of sequence cited, each of which uses a different coding. Authors should explicitly mention the *type of accession number together with the actual number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article. Please use the following format: accession number type ID: xxxx (e.g., MMDB ID: 12345; PDB ID: 1TUP). Note that in the final version of the *electronic copy*, accession numbers will be linked to the appropriate database, enabling readers to go directly to that source from the article.

### **Footnotes**

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

#### *Table footnotes*

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

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

#### *General points*

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

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

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

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

#### *Formats*

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

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

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

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

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

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

#### **Please do not:**

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

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

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

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to

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

## **Tables**

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

## **References**

Authors are responsible for the accuracy of references. The 'Vancouver' style is used. References appearing for the first time in a table or figure should be cited in the text where the table or figure is mentioned. References cited must have been published in peer-reviewed publications.

### ***Citation in text***

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

### ***Web references***

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

### ***Reference style***

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In:



Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 1999, p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (J Am Med Assoc 1997;277:927-934) (see also

☞[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

### ***Journal abbreviations source***

Journal names should be abbreviated according to

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

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

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

### **Supplementary and multimedia data**

Elsevier accepts electronic supplementary and multimedia data to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ☞<http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at

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

### **Submission checklist**

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One Author designated as corresponding Author:

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

All necessary files have been uploaded

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

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"

- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at

☞ <http://epsupport.elsevier.com>.



## After Acceptance

### Use of the Digital Object Identifier

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

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

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

### Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves.

Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from

☞ <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site:

☞ <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately.

Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

## Offprints

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



## Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

This is a spacer...

[↑ Top of Page](#)



ELSEVIER

<http://www.elsevier.com>

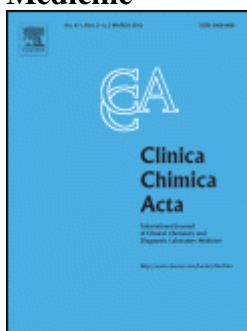
[Browse Journals](#) > [Clinica Chimica Acta](#) > Guide For Authors

## Clinica Chimica Acta

### Clinica Chimica Acta

International Journal of Clinical Chemistry and Diagnostic Laboratory






Medicine



ISSN: 0009-8981

Imprint: ELSEVIER

Actions

-  [Submit Article](#)
-  [Order Journal](#)
-  [Free Sample Issue](#)
-  [Recommend to Friend](#)
-  [Bookmark this Page](#)

Statistics

**[Impact Factor:](#)** 2.960

**[5-Year Impact Factor:](#)** 2.806

**[Issues per year:](#)** 24

### Additional Information

- [Related Publications](#)
- [Editorial Board](#)
-  [Login to Editorial System](#)
-  [Advertisers Media Information](#)

### Readers

- [Order Journal](#)

- [⇄Access Full-Text](#)
- [⇄Free Sample Issue](#)
- [⇄Volume/Issue Alert](#)
- [Free Tables of contents and abstracts](#)

## Authors

- [Authors Home](#)
- [⇄Submit an Article](#)
- [⇄Track Your Accepted Articles](#)
- [Guide for Authors](#)
- [Artwork instructions](#)
- [Authors Rights](#)
- [Funding Bodies Compliance](#)

## Librarians

- [Librarians Home](#)
- [Ordering Information and Dispatch Dates](#)
- [Abstracting/Indexing](#)

## Editors

- [Editors Home](#)
- [⇄Article Tracking for Editors](#)
- [Ethics Questions \(PERK\)](#)

## Reviewers

- [Reviewers Home](#)

## Advertisers/Sponsors

- [Advertisers Home](#)
- [Reprints Information](#)

## Societies

- [Society Home](#)
- [CSCC Website](#)
- [Assoc. of Clinical Biochemists](#)
- [Int. Ass. of Drug Monitoring](#)
- [Hong Kong Clin. Chem. Soc.](#)

## Guide for Authors

Clinica Chimica Acta

*Clinica Chimica Acta* publishes original Research Communications in the field of clinical chemistry and laboratory medicine, defined as the application of chemistry, biochemistry, immunochemistry, biochemical aspects of hematology, toxicology, and molecular biology to the study of human disease in body fluids, cells or tissues. The objective of the journal is to publish novel information leading to a better understanding of biological mechanisms of human diseases, their prevention, diagnosis, and patient management. Reports of an applied clinical character are also welcome. Papers concerned with normal metabolic processes or with constituents of normal cells or body fluids, such as reports of experimental or clinical studies in animals, are considered when they are clearly and directly relevant to human disease. Development and evaluation of novel analytical methodologies where applicable to clinical chemistry and laboratory medicine, including point-of-care testing, and topics on laboratory management and informatics will also be considered.

## **PUBLICATIONS**

**Original Research Communications:** Peer-reviewed, high-quality, concise research investigations that represent new and significant contributions to science.

**Letters to the Editor:** commenting on papers published in *Clinica Chimica Acta* - these should be less than 400 words and may include 1 illustration or 1 table.

**Invited Critical Reviews** of recent central developments in medical biochemistry and laboratory medicine.

**Case reports** involving interesting or novel clinical laboratory data.

**Meeting announcements.**

Consensus recommendations or guidelines on the use of laboratory test for clinical practice will be considered if they are compiled by a recognized organization or expert panel (e.g. IFCC, IUPAC, AACC, etc). Please contact the appropriate Editor-in-Chief for consideration. The responsibility for such material remains with the originating body.

## **Manuscript submission**

Manuscripts should be submitted to the CCA web site at <http://ees.elsevier.com/cca>

Submission is only possible online through this web site. Authors are required to transmit the text and art of the manuscript in electronic form to this address. A manuscript is accepted for consideration for publication in *Clinica Chimica Acta* with the understanding that it has not been published previously (except in abstract form or as part of a public lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication has been approved by all the authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors-in-Chief and the Publisher. Reference should be made to previously published abstracts, etc. in the introductory section. **Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.**

Relevant ethical approval must be noted for investigations involving human or animal subjects. Authors are invited to consult any member of the Editorial Board, if in doubt about any aspect of scope, format or content of a proposed paper.

A submission letter should always accompany the submitted paper, providing the following information:

- (a) The full name and address of the corresponding author (including telephone and fax numbers and E-mail address).
- (b) Any known changes of address within a period of six months after submission of the paper.
- (c) The type of paper (Original Research communication, Short communication, Letter to the Editor, Critical Review etc).
- (d) The full title of the submitted paper.
- (e) The names, addresses and telephone, fax and e-mail details (where possible) of three suitable, potential reviewers. If there are compelling reasons for excluding some individuals as potential reviewers, these may be mentioned. However, the ultimate reviewer selection is at the Editors-in-Chief's discretion.

We assume that all of the authors have approved the submitted manuscript. If this assumption turns out to be incorrect, the manuscript will be withdrawn and will not be published.

Closely related papers that are in press or that have been submitted elsewhere must be included with the manuscript.

Submitted manuscripts will generally be published within a week of acceptance and thus be made public.

*For the Americas, Japan and Asia:*

**Alan H. Wu**

**San Francisco General Hospital**

*For Europe, Australia and all other territories:*

**Joris Delanghe University Hospital Gent**

*Reviews from all areas:*

**Greg S. Makowski**

**Hartford Hospital**

The Editors-in-Chief are responsible for the professional review of the manuscripts. Receipt of manuscripts by the Editors-in-Chief will be acknowledged. All materials submitted becomes the property of CCA.

**Language Editing** : Authors who are unsure of correct English usage should have their manuscript checked by someone proficient in the language. Manuscripts in which the English is difficult to understand may be returned to the author for revision before scientific review. The external services offered on our website are for your consideration only:

☞ [www.elsevier.com/locate/languagepolishing](http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing)

With Asia Science Editing, Elsevier has negotiated a rate of EUR 0.024 per word (ca

EUR 6 per page). A EUR 10 handling fee per manuscript is added, if payment is by credit card. Different rates apply for mathematic-based manuscripts. Turnaround time is typically 5 days.

For all third party language editing recommendations, all interaction and responsibility is between the Author and the Language Editor. Language editing should not be confused with the copy-editing that takes place during the production process after a manuscript has been accepted.

**Ethics of Experimentation:** Scientific investigations involving humans or animals must have approval of the appropriate ethics committee. When conducting scientific research using human tissue and which is intended for publication in CCA, authors should follow procedures that are in accordance with the ethical standards as formulated in the Helsinki Declaration of 1975 (revised 1983). When conducting experiments on animals, these be carried out in accordance with the EU (86./609/EEC), NIH guidelines, or local or national requirements for the care and use of laboratory animals. A statement that informed consent was obtained from all subjects must accompany investigations involving humans.

#### **Revision and publication dates**

Manuscripts requiring revision and/or condensation will be returned to the authors by the Editors-in-Chief, specifying the requested alterations and including the (anonymous) referee reports. Authors are requested to resubmit the revised manuscript within three months. Papers not resubmitted within three months will be treated as new submissions.

#### **Proofreading**

Authors of Original Research Communications, Review articles and Case Reports will receive proofs as a PDF file by e-mail. As acceptance is based upon the submitted version of the paper, it is essential that no new material be inserted in the text at the time of proofreading; furthermore, no alterations to style or meaning will be permitted at this stage. Any new material that the authors may wish to introduce, for reasons of scientific accuracy, will be checked by the Editors-in-Chief and a charge may be made for corrections. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurate as possible. *Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication.* Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

**Page charges: There are no submission fees or page charges**

#### **Offprints**

The corresponding author will be provided with a free electronic offprint, as a PDF, or alternatively twenty five printed offprints. An offprint order form, price list and copyright transfer form are sent upon receipt of the manuscript at the Publisher so that (extra) offprints may be ordered if required. It is essential that copyright be transferred at this stage.

#### **Publication**



For enquiries relating to the submission of articles please visit the journal's homepage at <http://www.elsevier.com/locate/cca> or <http://ees.elsevier.com/cca/>. From there you can also track accepted articles (<http://www.elsevier.com/trackarticle>) and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

## **PREPARATION OF PAPERS**

Authors should consult a recent issue of the journal to make themselves familiar with the conventions and layout of articles.

The entire text, including figure and table legends and the reference list, should be double-spaced, leaving margins of approximately 3 cm (1 inch). All pages should be numbered consecutively and carry a running title, in the upper right corner, starting with the title page of the manuscript. Every new paragraph should be clearly indented. Do not use right-hand justification.

**Title page.** Page 1 should be concise, descriptive and informative. It should include:

- (1) The title of the article;
  - (2) The authors' full names (first name, middle initial(s), and surname);
  - (3) Affiliations (the name of department (if any), institution, city and state or country where the work was done), indicating which authors are associated with which affiliation;
  - (4) Acknowledgement of grant support and of individuals who were of direct help in the preparation of the study;
  - (5) Disclaimers, (if any);
  - (6) The name, address, telephone and fax numbers and E-mail address of the corresponding author
- Authors are requested to select a maximum of six key words and to present them on the title page of the typescript. They should cover precisely the contents of the submitted paper and should give readers sufficient information as to the relevance of the paper to his/her particular field.

**Abstract.** Page 2 of the typescript should be reserved for the Abstract which should have no more than 200 words. This should follow a structured format, sub-divided into subsections entitled "Background"; "Methods"; "Results"; and "Conclusions". Each subsection should be brief and informative, emphasizing those points that are unique to the paper. Since summaries are increasingly used by abstracting services which will cut off after a fixed number of words, it is important not to exceed the maximum number of words and to avoid bibliographic references and non-standard abbreviations.

**Text.** After the Abstract, Original Research Communications should be organized in the following format: Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, List of abbreviations, References.

**Introduction** This is a short section in which the authors should clearly state the reasons for and aims of the investigation. Summarise the rationale for the study and hypothesis

tested by it, with brief reference to relevant previous work.

*Materials and methods* The section Materials and methods should be detailed enough for readers to reproduce the experiments. Authors should always refer to other work on the same subject, indicating whether or not their experimental results are in agreement with previous work. Conclusions drawn from experiments described in the tables or figures can often appear most conveniently in the Results section.

*Result and Discussion* The overall conclusions based on the work reported should be given in the Discussion. In some cases, Results and Discussion sections may more appropriately be combined than separated (at the author's discretion). Every effort should be made to avoid jargon, to spell out all non-standard abbreviations the first time they are mentioned and to present the contents of the study as clearly and concisely as possible.

Reports of new or improved methods should be as brief as is consistent with clarity (up to about 1000 words). They should unequivocally identify the element of novelty claimed and the advantages over existing technology. Performance characteristics, including effects of interfering substances, comparisons with results of accepted methods and reference values based on appropriate population samples should be documented by adequate data. Citing of earlier publications is preferred to repetition of details for reagents, procedures, etc., which are always in print. Nevertheless, the information provided must suffice to allow readers to duplicate the work or to compare the technique with current practice. Instrument and kit evaluations usually will not be accepted unless a new principle is involved.

#### *Acknowledgements*

Only persons who have made substantial contributions to the work should be acknowledged. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

The source(s) of support in the form of grants, equipment, drugs, or all of these should be acknowledged here.

#### *References*

Type references **double-spaced** and number them consecutively in the order in which they are first quoted in the text. Identify references in text, tables and legends by arabic numerals [square brackets]. References cited only in tables or in legends to figures should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification in the text of the particular table or illustrations. Please note that all authors should be listed when six or less; when seven or more, list only the first three and add et al. The names of journals should be abbreviated according to the list of serial title word abbreviations (ISDS, Paris, 1985, ISBN 2-904938-02-8). Do not include references to personal communications, unpublished data or manuscripts either 'in preparation' or 'submitted for publication'. Reference to a paper as 'in press' implies that it has been accepted for publication. **Recheck references in the text against the reference list after your manuscript has been revised and renumber accordingly.** Incomplete references can result in publication delay.

Examples of correct forms of references are as follows:

[1] Lott JA, Curtis LW, Thompson A, Gechlik GA, Rund DA. Reported alcohol consumption and the serum carbohydrate-deficient transferrin test in third-year medical students. *Clin Chim Acta* 1998; 276:121-128

[2] Strunk W, White EB, *The elements of style*, third ed. New York: Macmillan, 1979.

[3] Kennedy L. Glycation of haemoglobin and serum proteins. In: Alberti KGMM, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P, editors. *International textbook of Diabetes Mellitus*. Chichester: John Wiley, 1992: 985-1007.

## Tables

Tables should be used sparingly; they should be used only when the data cannot be presented clearly in the text. Each table, and every column should be provided with an explanatory heading, with units of measure clearly indicated. The heading of the table should make its general meaning understandable without reference to the text. Authors are requested to consult recent issues of CCA for the proper table layout. Cite each table in the text in consecutive order. The Editor-in-Chief, on accepting a manuscript, may recommend that additional tables containing important backup data, too extensive to be published in the article, may be published as supplementary material (see below) or deposited with the National Auxiliary Publications Service or made available by the author(s). In that event, an appropriate statement will be added to the text. Submit such tables for consideration with the manuscript.

## Figures

Figures should be used to illustrate experimental results clearly. Illustrations for reproduction should normally be about twice the final size required as figures are often reduced to a one-column width. Symbols, lettering and lines should be sufficiently large and clear to be legible after reduction. Photographs of tissues, cells, or subcellular components should be included only when they are essential. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at

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

### *Colour Figures*

Colour figures may be included in the article in the printed issue, but generally this expense must be borne by the authors. However, if, together with your accepted article, you submit usable colour figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at ☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. [Please note: Because of technical complications that can arise in converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print), please submit in addition usable black-and-white files corresponding to all the colour illustrations.] As only one figure caption may be used for both colour and black and white versions of figures, please ensure that figure captions are meaningful for both

versions, if applicable.

*Figure Legends.* Legends should be collated, typed double-spaced, numbered with Arabic numerals corresponding to the illustrations, and submitted on a separate page. When symbols, arrows, numbers, or letters are used to identify parts of the illustrations, each should be explained clearly in the legend. For photomicrographs, the internal scale markers should be defined and the method of staining should be given. The legends should permit the figures to be understood without reference to the text. If the figure has been previously published, a credit line should be included and a permission letter supplied by the author.

*Figures.* Figure legends should be provided as text, placed after the reference section in the main manuscript file. Number figures consecutively with Arabic numerals. When creating your figures, use font sizes and line weights that will reproduce clearly and accurately when figures are sized to the appropriate column width. The minimum line weight is 0.5 point. Thinner lines will not reproduce well. Eliminate all excess white space from the borders of each figure. Do not include figure legends or other extraneous text in a graphic file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Quantities and units**

These should be in conformity with international practice relating to the use of SI units: thus concentrations of solutes of known molecular mass should normally be stated in mol/l or recognized submultiples thereof (nmol/l, etc.). Other solutes should be expressed in g/l, mg/l, etc. Reagent composition may be specified either in molar terms or in mass or volume of each solute per liter of final solution (% or w% should not be used). Enzyme activities should be reported in katal or U/l whenever possible and should be accompanied by a reference to, or a description of, the procedure used for the measurements.

### **PREPARATION OF SUPPLEMENTARY MATERIAL**

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer additional possibilities for publishing supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips, and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

### **PUBLICATION**

**Copyright Transfer:** Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a "Journal Publishing Agreement" (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) 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.

### **US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy.**

Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://publicaccess.nih.gov>) by submitting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, immediately after final publication. Please e-mail us at [NIHauthorrequest@elsevier.com](mailto:NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH grant/project number(s), as well as name and e-mail address of the Principal Investigator(s)) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for public access posting 12 months after the final publication date. 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 to PubMed Central, and any such posting is prohibited (although Elsevier will not request that manuscripts authored and posted by US government employees should be taken down from PubMed Central). Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

**Proofs** will be sent to the corresponding author of an article by email in a PDF file. The proof should be checked carefully and corrections (including replies to a Query Form) should be returned in an e-mail to Elsevier using the "reply" button within 2 days of receipt. Only printer's errors may be corrected: no changes in or additions to the edited manuscript will be allowed at this stage.

**E-Offprints.** The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

### **Author's rights**

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on [elsevier.com](http://elsevier.com))
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)

- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Updated April 2006 - for the latest version please check the journal's web site:

☞ [www.elsevier.com/locate/cca](http://www.elsevier.com/locate/cca)

This is a spacer...

↑ [Top of Page](#)

---

© Copyright 2010 Elsevier | <http://www.elsevier.com>